

Vom HIV-1 Glykoprotein gp120 abgeleitete Peptide als potentielle
Immunogene zur Erzeugung Virus-neutralisierender Antikörper

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Marek Mössl

geb. am 31.01.1982 in Heidelberg

Gutachter:

- Prof. Dr. Jutta Eichler (FAU)
- Prof Dr. Heinrich Sticht (FAU)
- Prof. Dr. Frank Bordusa (MLU)

Tag der Verteidigung: 17.09.2015

Meinen Eltern.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	i
2	Abkürzungsverzeichnis.....	iii
3	Einleitung.....	1
3.1	Humanes Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1).....	1
3.1.1	Von der Entdeckung zur Pandemie	1
3.1.2	Genom und Morphologie.....	1
3.1.3	Replikationszyklus.....	2
3.2	Therapeutische und präventive Strategien gegen HIV-1	3
3.2.1	Antiretrovirale Therapie.....	4
3.2.2	Impfstoffentwicklung gegen HIV-1	4
3.3	Peptide	13
3.3.1	Synthetische Peptide	13
3.3.2	Peptide als Therapeutika	15
3.3.3	Peptide in der HIV-1 -Forschung.....	17
3.3.4	Peptide als Immunogene und Impfstoffe.....	19
4	Zielsetzung	22
5	Material und Methoden.....	23
5.1	Material.....	23
5.1.1	Geräte	23
5.1.2	Chemikalien	24
5.1.3	Verbrauchsmaterialien	29
5.2	Methoden und Durchführung.....	30
5.2.1	Peptidsynthese.....	30
5.2.2	Immunisierungen.....	45
5.2.3	Testung der Peptide und Antikörper bzw. Seren	48
6	Ergebnisse und Diskussion	56
6.1	Monoklonale Antikörper durch Immunisierung von Mäusen mit CD4bs-M	56
6.2	b12epi-M: ein Mimetikum des b12-Epitops von HIV-1 gp120	61
6.2.1	Peptiddesign	61
6.2.2	b12epi-M	63
6.2.3	Bestätigung des Peptiddesigns.....	68
6.2.4	Erhöhung der Selektivität von b12epi-M gegenüber b12	71
6.2.5	Optimierung von b12epi-M.....	74
6.3	Bindung von b12epi-M an HIV-1 gp120	80
6.4	Aggregationspotential von b12epi-M und dessen Varianten.....	81
6.5	Zusammenhang zwischen Infektionsinduktion, Aggregation und Fibrillenbildung ..	84

7	Zusammenfassung	90
8	Summary	93
9	Anhang	I
9.1	Peptidübersicht	I
9.2	Chromatogramme und Massenspektren	II
9.3	Abbildungsverzeichnis	X
9.4	Tabellenverzeichnis	XIII
9.5	Danksagung	XIV
9.6	Referenzen	XV
9.7	Angaben zu Person und Werdegang	XXX
9.8	Erklärungen zur verfassten Arbeit	XXXI

2 Abkürzungsverzeichnis

Reagenzien

<u>Abkürzung</u>	<u>Trivialname / IUPAC-Name</u>
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
DBU	1, 8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIC	N, N'-Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5-(3-Carboxy-4-nitrophenyl)-disulfanyl-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HOBT*H ₂ O	1-Hydroxybenzotriazol Hydrat
MeCN	Acetonitril
PEG	Polyethylenglycol
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TFA	Trifluoressigsäure
ThT	Thioflavin T
TIPS	Triisopropylsilan
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol

Sonstiges

<u>Abkürzung</u>	<u>Beschreibung</u>
(aq)	gelöst in Wasser
A ₄₉₂	Extinktion bei 492 nm
Abb.	Abbildung

AE	Absorptionseinheiten
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom (<i>Aquired Immune Deficiency Syndrom</i>)
a.u.	willkürliche Einheit (engl. <i>arbitrary unit</i>)
v/v	Volumen bezogen auf Volumen
w/v	Gewicht bezogen auf Volumen
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
CA	Kapsidprotein p24
cART	kombinierte antiretrovirale Therapie (combined Anti-Retroviral Therapy)
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CD4bs	CD4-Bindungsstelle
CHR	C-terminal heptad repeat
DAD	Diodenarray-Detektor
Dpr	2,3-Diaminopropionsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fab	antigenbindendes Fragment (<i>fragment antigen binding</i>)
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HPW	hochreines Wasser (engl. <i>high purity water</i>), aus Reistwasseranlage
HPLC/MS	HPLC gekoppelt an ein Massenspektrometer
ivDde	(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl
IFA	inkomplettes Freund-Adjuvanz
IN	Integrase
KFA	komplettes Freund-Adjuvanz

KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin (engl. <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>)
LAV	Lymphadenopathie assoziiertes Virus
LPH	Pfeilschwanzkrebs-Hämocyanin (<i>Limulus Polyphemus Hemocyanin</i>)
MA	Matrixprotein p17
MD	Moleküldynamik
MLV	Murines Leukämievirus
MPER	membrannahe externe Region (<i>membrane proximal external region</i>)
mAE	Milliabsorptionseinheiten
NC	Nukleokapsid
NHR	N-terminal heptad repeat
OMpe	O-3-methyl-pent-3-yl
O ^t Bu	<i>tert</i> -butylester
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PR	Protease
RLU	relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RT	Reverse Transkriptase
SEAP	sezernierte alkalische Phosphatase (<i>secreted alkaline phosphatase</i>)
Tab.	Tabelle
^t Bu	<i>tert</i> -butylether
Trt	Trityl
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

3 Einleitung

3.1 Humanes Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1)

3.1.1 Von der Entdeckung zur Pandemie

HIV-1 wurde 1983 erstmals aus Lymphknoten eines Patienten mit Lymphadenopathie durch Françoise Barré-Sinoussi am Pasteur Institut Paris in der Gruppe von Luc Montagnier isoliert und in primären T-Lymphozyten eines gesunden Erwachsenen bzw. Nabelschnurblut von Neugeborenen kultiviert ¹. 1984 gelang es der Arbeitsgruppe von Robert Charles Gallo das neue Virus, welches bis 1986 als humanes T-lymphotropes Virus (HTLV)-III oder Lymphadenopathie-assoziiertes Virus (LAV) bezeichnet wurde, kontinuierlich zu kultivieren, zu charakterisieren und als Auslöser des erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS) zu identifizieren ²⁻⁶. Die resultierende, rasche Entwicklung von Bluttests konnte zwar die Übertragung von HIV-1 durch kontaminierte Blutkonserven verhindern, welche Ende der 1970er und Anfang der 1980er noch ein großes Infektionsrisiko darstellten ⁷, die Entwicklung einer Pandemie und die Verbreitung des HIV-1 konnte jedoch bis heute nicht aufgehalten werden. So lebten im Jahr 2012 schätzungsweise 35,3 Millionen Menschen mit HIV-1. Während sich 2,3 Millionen Menschen im Jahr 2012 neu infizierten, starben schätzungsweise 1,6 Millionen daran. Insgesamt sind bereits mehr als 36 Millionen Menschen an den Folgen von AIDS verstorben ⁸. Obwohl AIDS bis heute nicht geheilt werden kann, wurde die Lebenserwartung und -qualität von HIV-infizierten Personen durch die kombinierte antiretrovirale Therapie (cART), welche auch als hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) bezeichnet wird, vor allem in den Industriestaaten mit guter medizinischer Versorgung enorm gesteigert ^{9,10}. Ein potenter Impfstoff, der in der Lage ist, neutralisierende Antikörper zu induzieren und die Ausbreitung von HIV-1 zu stoppen, konnte trotz intensiver Forschung bisher jedoch nicht gefunden werden ¹¹.

3.1.2 Genom und Morphologie

HIV-1 ist ein Retrovirus, das heißt es besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom und gehört zur Gattung der Lentiviren. Das Genom umfasst ca. 9000 Basen und liegt im Viruspartikel (Virion) in doppelter Ausführung vor. Es beinhaltet neun offene Leseraster, wovon drei für die Polyproteine Gag, Pol und Env codieren (Abb. 1).

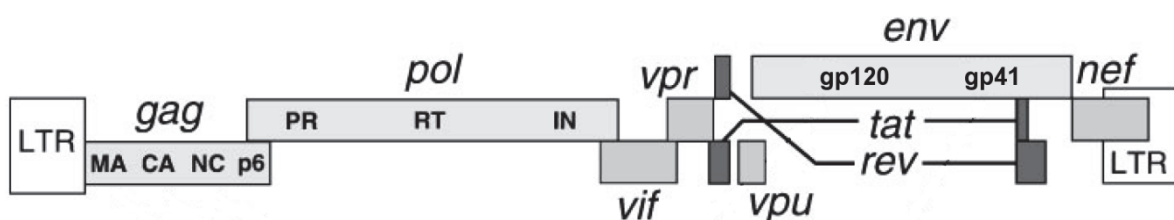


Abb. 1 Organisation des HIV-1 Genoms ¹²

Diese werden nach der Translation in der Wirtszelle proteolytisch in verschiedenen Zellkompartimenten weiterprozessiert. Gag beinhaltet die Proteine, die für den Aufbau des Virions erforderlich sind, nämlich p17 (Matrix, MA), p24 (Kapsid, CA), Nukleokapsid (NC) und p6. Pol besteht aus den Enzymen Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Das Hüllprotein Env umfasst die Proteine gp120 und gp41. Außerdem werden die Proteine Vif, Vpr und Nef sowie Vpu, Tat und Rev im Genom codiert, wovon die letzteren allerdings nicht mit in das Virion verpackt werden¹² (Abb. 2), aber eine wichtige Rolle beim Replikationsprozess spielen.

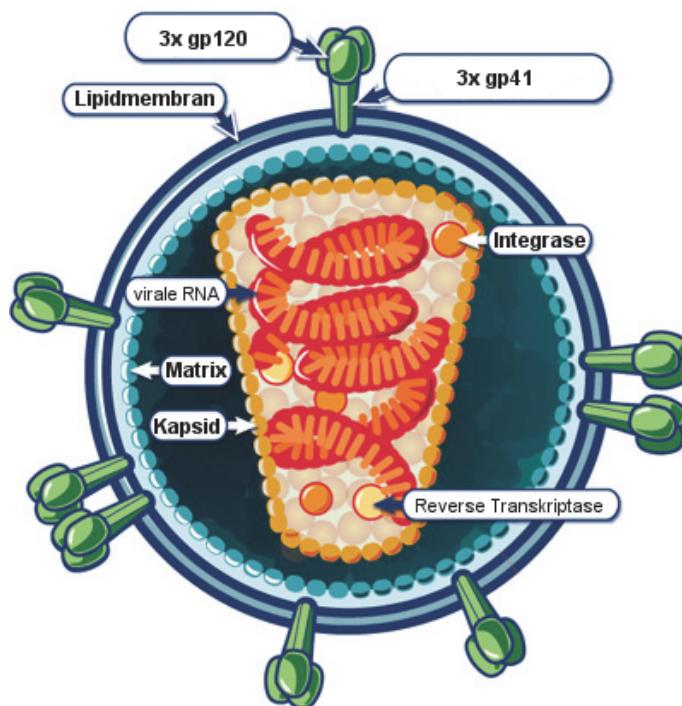


Abb. 2 schematischer Aufbau eines HI-Virions-1 (Abbildung NIAID NIH)

Für das menschliche Immunsystem ist das HI-Virion nur durch die Hüllproteine gp41 und gp120 als Pathogen zu identifizieren, welche als Trimere von gp41-gp120-Heterodimeren (Env-Trimere) präsentiert werden^{13,14}.

3.1.3 Replikationszyklus

Diese Env-Trimere sind für die ersten Schritte des Replikationszyklus entscheidend, da sie verantwortlich sind für die Anheftung des Virions an eine Zelle, die den Differenzierungscluster 4 (CD4) auf ihrer Oberfläche trägt, und die darauf folgende Fusion des Virions mit dieser Wirtszelle. Zunächst bindet gp120 an CD4¹⁵, wodurch die Bindungsstelle für die Korezeptoren CXCR4^{16–18} oder CCR5^{19–23} durch konformationelle Umlagerung²⁴ freigelegt wird. Nach Bindung an den Korezeptor kommt es zu einer weiteren Konformationsänderung, diesmal im gp41, welche dann zur Ausbildung eines 6-Helix-Bündels und zur Fusion des Virions mit der Membran der Wirtszelle führt^{25–27}. In der

Wirtszelle findet die reverse Transkription statt. Die RT baut eine doppelsträngige DNA auf, indem sie den (+)-RNA-Strang als Templat zum Aufbau eines komplementären (-)-DNA-Stranges nutzt, welcher dann wiederum als Templat für einen (+)-DNA-Strang dient, während die (+)-RNA abgebaut wird. Die virale DNA wird in den Kern der Wirtszelle aufgenommen und mit Hilfe der IN in deren Genom integriert. Daraufhin wird diese Zelle mit ihrer eigenen Maschinerie durch Transkription und Translation der viralen DNA gezwungen die Bestandteile neuer Virionen zu exprimieren. Während sich die Bestandteile eines Virions an der Zellmembran zusammenfinden, sorgt die Protease dafür, dass die Polyproteine korrekt geschnitten werden und durch Knospung neue, reife Virionen entstehen können (Abb. 3).

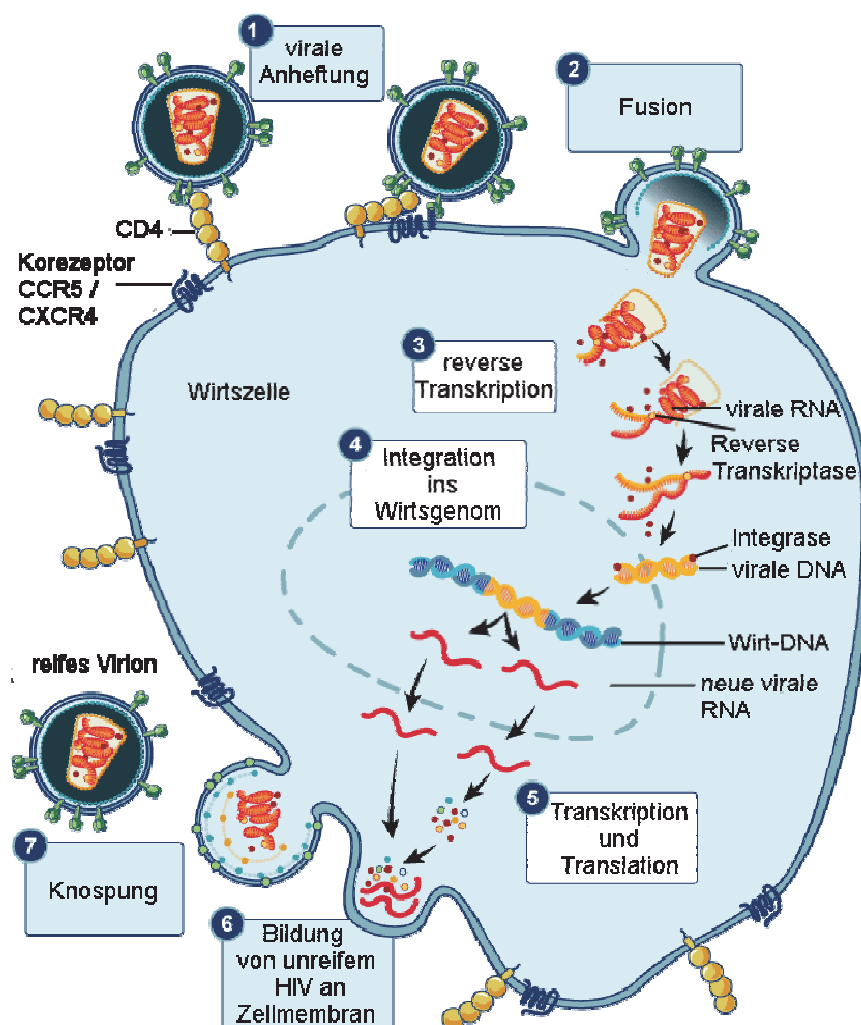


Abb. 3 Schematische Darstellung des HIV-1-Replikationszyklus (Abbildung NIAID NIH)

3.2 Therapeutische und präventive Strategien gegen HIV-1

Die Reverse Transkriptase erschwert es dem Immunsystem besonders, die Infektion mit HIV-1 zu kontrollieren, da sie im Gegensatz zur DNA-Polymerase beispielsweise keine Korrekturlesefunktion besitzt und eine hohe Mutationsrate von $3,4 \cdot 10^{-5}$ pro Basenpaar und Zyklus aufweist²⁸. Das führt dazu, dass die Viruspopulation in einem infizierten Individuum

sehr heterogen sein und große Sequenzunterschiede aufweisen kann (Quasispezies). Dies ermöglicht es dem Virus immer wieder aufs Neue, potenten Immunreaktionen mit kleinen resistenten Populationen zu entgehen.

3.2.1 Antiretrovirale Therapie

Die cART greift in den Replikationszyklus des HIV-1 ein und vermindert die Viruslast im Blut der Patienten. Dabei werden häufig Kombinationen aus zwei nukleosidischen bzw. nukleotidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und einem nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI), einem Protease-Inhibitor oder einem Integrase-Inhibitor eingesetzt. Bei der Kombination der verschiedenen Präparate müssen bestimmte Regeln beachtet werden, da es sonst zu schnellen Resistenzbildungen und starken Nebenwirkungen kommen kann.²⁹

Da eine Heilung von Infizierten mit der cART auch unter Zuhilfenahme anderer gegen HIV-1-wirksamer Medikamente nicht möglich ist und der Zugang von Infizierten zur cART in den Ländern, die am stärksten von der HIV-1-Pandemie betroffen sind, häufig eingeschränkt ist, steht die Entwicklung von Impfstoffen als Mittel zur Eindämmung der Pandemie im Fokus vieler Forscher, die sich mit HIV-1 beschäftigen.

3.2.2 Impfstoffentwicklung gegen HIV-1

HIV-1 ist trotz seiner großen genetischen Variabilität nicht fähig, sein komplettes Erscheinungsbild für das Immunsystem immer wieder zu verändern, da es die Funktionalität der CD4-Bindungsstelle (CD4bs) und Korezeptorbindungsstelle aufrechterhalten muss, welche essentiell für die Anheftung und Fusion und damit für den ganzen Replikationszyklus des Virus sind. Diese konservierten Bereiche des Virus stellen einen guten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Impfstoffen dar, die gegen eine breite Masse von Virusisolaten und Quasispezies aktiv sein sollen. In der Tat konzentrierte sich die Impfstoffforschung seit der Entdeckung der ersten breit neutralisierenden Antikörper Anfang bis Mitte der 1990er, nämlich b12^{30,31}, 2G12³² und 2F5³³, auf die Aufklärung derer Epitope. Die ersten Immunisierungsversuche mit rekombinatem gp120 in Tieren^{34–39} lieferten nur schwache neutralisierende Immunantworten. Auch später durchgeführte Immunisierungen mit monomerem gp120 waren hinsichtlich Neutralisationsfähigkeit und -breite erfolglos^{40–45}. Erst mit der Aufklärung der ersten Komplexkristallstruktur von gp120, CD4 und dem neutralisierenden Antikörper 17b⁴⁶ konnte die CD4bs und auch die Korezeptorbindungsstelle genauer definiert und charakterisiert werden. Bis 1998 war keine Kristallstruktur von gp120 gelöst worden, wodurch wertvolle strukturelle Informationen nur sehr spärlich verfügbar gewesen waren. Bis heute ist die genaue Struktur des funktionellen Env-Trimers, wie er auf der Oberfläche der Virionen vorliegt, nicht bekannt. Allerdings geben einige rekombinanten gp140-Konstrukte die quartäre Struktur des Env-Trimers bereits recht

gut wieder ⁴⁷ und neue Erkenntnisse wie beispielsweise die Einbeziehung von sulfatierten Tyrosinen zur Ausbildung der Quartärstruktur des Env-Trimers ⁴⁸ vergrößern das Verständnis der Trimerstruktur.

3.2.2.1 gp120 als immunogene Struktur

Ein weiterer Grund, der es HIV-1 erleichtert dem menschlichen Immunsystem zu entkommen, ist eine Strategie des Virus, die sich anhand der Beschaffenheit des gp120-Proteins aus der aufgeklärten Komplexkristallstruktur mit CD4 und 17b (Abb. 4) erklären lässt.

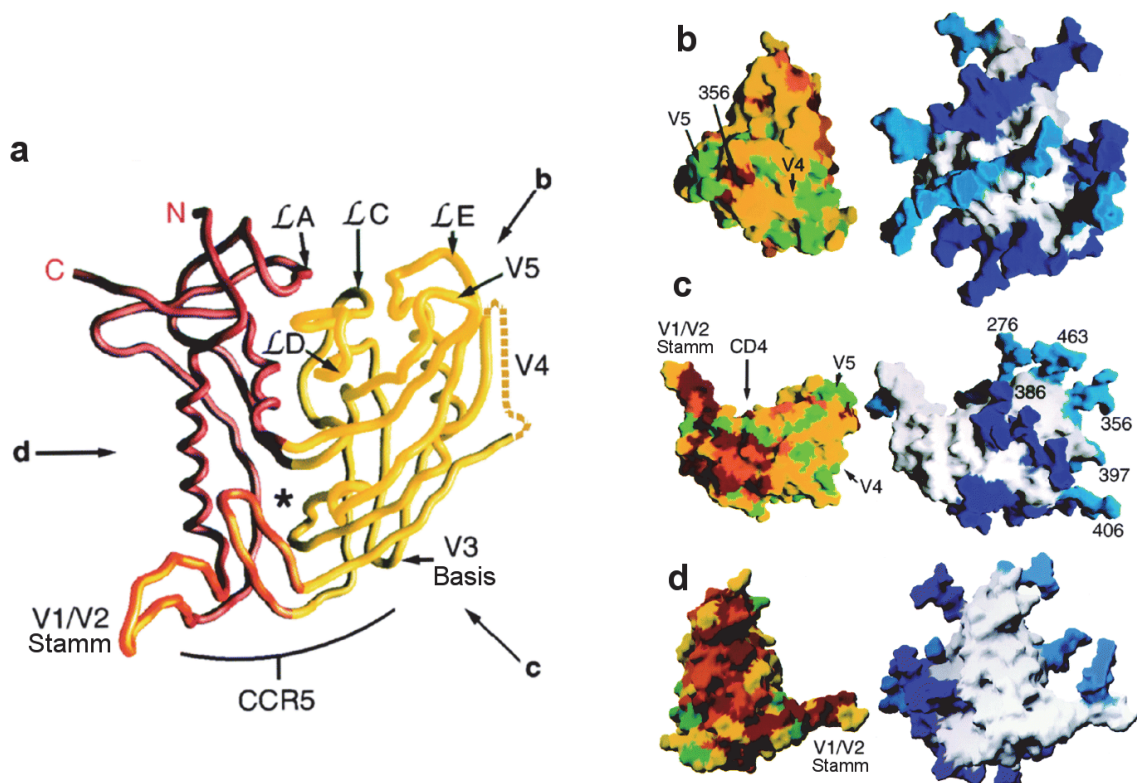


Abb. 4 Struktur eines rekombinanten gp120-Proteins (PDB: 1GC1) modifiziert aus ⁴⁹ [a] C_α-Spur des gp120-Proteins: Die Virus-Membran wäre oben, die Wirtszellmembran unten und der CD4-C-Terminus würde aus der Seite herausragen. Die innere Domäne ist rot dargestellt und die äußere Domäne gelb, das bridging-sheet orange. b, c und d kennzeichnen die Blickwinkel auf das gp120-Pprotein in den Oberflächenansichten. [b, c, d] Oberflächenstrukturen des gp120-Proteins aus verschiedenen Blickwinkeln: links: Variabilität der einzelnen Reste des gp120-Proteins: rot = konserviert, grün = variabel. Rechts: Gemodelte hoch-Mannose-Glykane (dunkelblau) und komplexe Glykane (hellblau)

gp120 unterteilt sich in eine innere und äußere Domäne (Abb. 4a). Die äußere Domäne ist im Vergleich zur inneren Domäne sehr stark glykosyliert (Abb. 4b, c, d, Abb. 6). Da die Glykosylierung des gp120-Proteins von körpereigenen Zellen nach dem speziesspezifischen Muster durchgeführt wird, werden die körpereigenen Glykane vom Immunsystem nicht erkannt. So wird die darunter liegende Proteinoberfläche des gp120 durch die Glykane sterisch geschützt.

Die Innere Domäne weist keine solch starke Glykosylierung auf. Sie muss auch nicht zusätzlich durch Glykane geschützt werden, da sie im nativen Env-Trimer mit gp41 interagiert und deshalb sowieso vor dem Immunsystem verborgen ist^{50,51}.

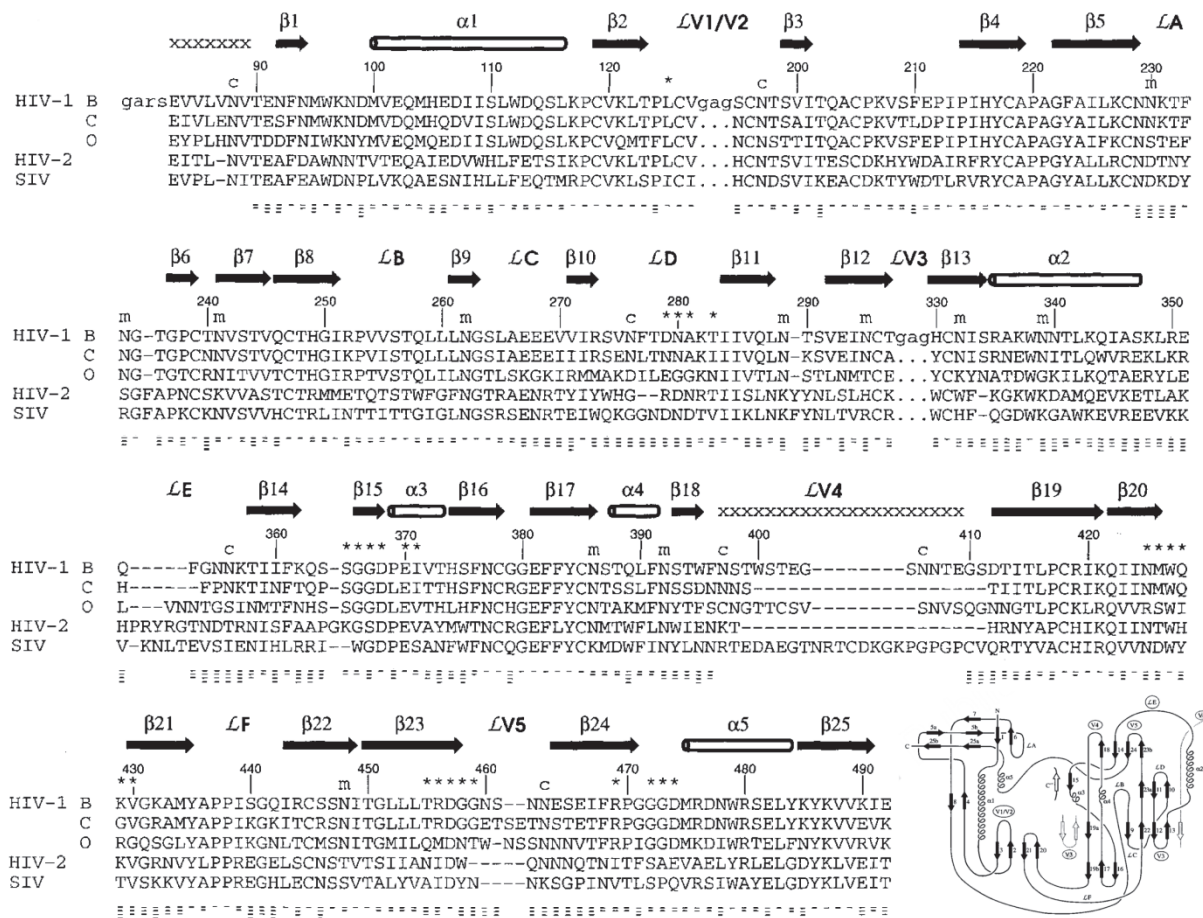


Abb. 5 Struktureller Sequenzabgleich des rekombinanten gp120-Proteins⁴⁶ mit HIV-1 Clade B, C und O sowie dem verwandten HIV-2 bzw. SIV. Sekundärstrukturelemente sind als Pfeile oder Zylinder gekennzeichnet und wurden benannt. Die Anzahl der Striche unter jedem Rest zeigt die Variabilität: 1 Strich - konserviert unter allen Immundefizienz-Viren der Primaten; 2 Striche - konserviert unter HIV-1 Isolat, 3 Striche - moderate Variation unter HIV-1 Isolat, 4 Striche - signifikante Variabilität unter HIV-1 Viren. Glykosylierungen sind mit m für hoch-Mannose-Glykane und c für komplexe Glykane markiert.

Die Aufklärung der ersten CD4-gp120 Komplexkristallstruktur war ein großer Fortschritt auf dem Gebiet der Impfstoffforschung, da dies die Möglichkeiten des strukturbasierten Designs eröffnete. Trotzdem entspricht diese Struktur nicht dem nativen Env-Trimer auf der Oberfläche des Virus, da im Env-Trimer quartärne Interaktionen zwischen den einzelnen Heterodimeren aus gp41 und gp120 auftreten, welche von monomerem gp120 nicht abgebildet werden können. Schon deshalb bietet diese Struktur kein ideales Templat für strukturbasiertes Design, zusätzlich wurde das zur Kristallisation verwendete gp120-Protein im Vergleich zum nativen Protein des HXBc2-Stammes rekombinant stark vereinfacht. Es wurden 52 Aminosäuren des N-Terminus und 19 Aminosäuren des C-Terminus deletiert sowie 67 Aminosäuren des V1/V2-loop bzw. 32 Aminosäuren des V3-loop durch ein Glycin-

Alanin-Glycin-Tripeptid ersetzt (Abb. 4a V1/V2 Stamm bzw V3 Basis, Abb. 5). Auf diese Weise wurde nur das Herzstück des gp120-Proteins erhalten.

Das verkürzte rekombinante gp120-Protein wurde außerdem nach der Expression stark deglykosyliert, um es besser kristallisierbar zu machen.

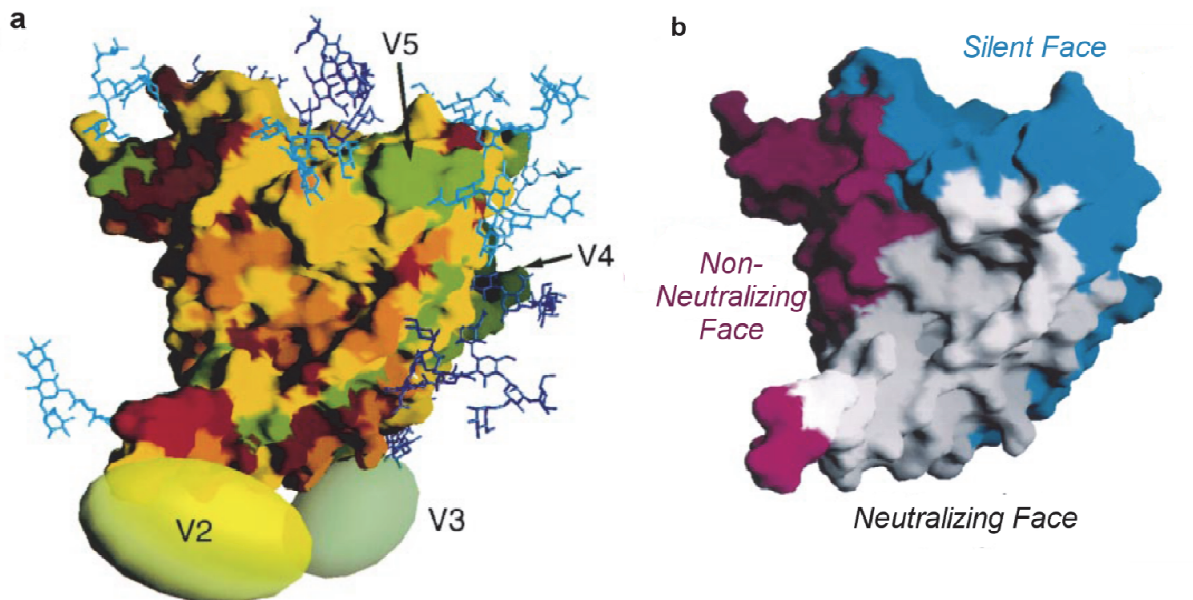


Abb. 6 gp120-Modell und Charakterisierung der Protein-Oberflächen ⁴⁹ [a] Oberflächendarstellung des gp120-Herzstücks (ohne V-loops und mit verkürzten N- und C-Termini) mit gemodelten Glykanen, unter HIV-1 konservierte Reste sind rot dargestellt, variable Reste grün; [b] Definition von „*Silent Face*“, „*Non-Neutralizing Face*“ und „*Neutralizing Face*“

Trotz der starken Verkürzung des rekombinanten gp120-Proteins gegenüber gp120 HXBc2 konnte nun eine "*Neutralizing Face*" auf der Oberfläche des gp120-Herzstücks beschrieben werden ⁴⁹, welches über 80% der nicht V-loop-Reste umfasst ⁴⁶. Die variablen *loops* V1-V3 sind zwar in dieser Kristallstruktur nicht enthalten, können aber zum Teil ebenfalls mit zum "*Neutralizing Face*" gezählt werden, da auch diese konservierte Sequenzabschnitte aufweisen und mit breit neutralisierenden Antikörpern interagieren (Tab. 1).

Neben der hohen Mutationsrate des HIV-1 und der starken Glykosylierung des gp120, die eine Bindung potentieller neutralisierender Antikörper auch im "*Neutralizing Face*" sterisch enorm erschwert, sorgt die konformationelle Metastabilität des gp120 und damit auch des kompletten Env-Trimer für weitere Hindernisse beim Entstehen einer neutralisierenden und die Infektion kontrollierenden Immunantwort. Beispielsweise wird die Korezeptorbindungsstelle, welche ein Epitop für sogenannte CD4-induzierte (CD4i) Antikörper darstellt, erst durch Bindung von CD4 im gp120 ausgebildet, da die Bindung von CD4 an gp120 des Env-Trimers erhebliche konformationelle Änderungen im gp120 induziert ^{46,52,53} und zur Ausbildung des "*bridging sheet*" führt. Die Konformation nach CD4-Bindung kann als "offen" bezeichnet werden, vor CD4-Bindung liegt gp120 im Env-Trimer hingegen in

der "geschlossenen" Konformation vor. Die konformationelle Freiheit des gp120 zeigt sich auch darin, dass monomeres gp120, wie im Falle der ersten Komplexkristallstruktur durch den Antikörper 17b, im Bereich der ausgebildeten Korezeptorbindungsstelle stabilisiert werden musste, um Komplexkristalle zu erhalten.

Trotz der aufgezeigten Strategien des HIV-1 zur Verbergung vor dem Immunsystem konnten bisher vor allem in jüngerer Vergangenheit einige breit neutralisierende Antikörper aus infizierten Individuen isoliert werden, von denen viele gegen das "*Neutralizing Face*" gerichtet sind und eine Vielzahl der zirkulierenden HIV-1 Isolate neutralisieren.

3.2.2.2 Die CD4 Bindungsstelle des gp120 als Epitop neutralisierender Antikörper

Breit neutralisierende Antikörper, die bisher in der Literatur beschrieben wurden, sind in Tab. 1 dargestellt. Ähnliche neutralisierende Antikörper entwickeln sich in ca. 20 % der Infizierten ⁵⁴ allerdings erst zwei bis vier Jahre nach der Infektion ^{55–57} und sind häufig mit besonders langen *Complementarity Determining Regions* (CDR) in der dritten schweren Kette ausgestattet und/oder starken somatischen Hypermutationen zur Antikörperreifung unterzogen worden. Es konnte gezeigt werden, dass passive Immunisierung von Primaten mit solchen Antikörpern vor Infektionen schützen.

Tab. 1 Gruppierung und Eigenschaften HIV-1 neutralisierender Antikörper (modifiziert aus ⁵⁸)

Anti-körper	Neu-tralisa-tions-breite	herausragende Eigenschaften	ähnliche Antikörper	Publi-ka-tions-jahr	Refe-ren-zen
CD4bs					
b12	33%	aus Phagen-Display-Bibliothek		1991	30,31,59
HJ16	30%	sehr starke Affinitätsreifung		2010	⁶⁰
VRC01	87%	CD4 Mimikry	VRC02, VRC03, NIH45-46, 3BNC60, BNC62, 3BNC117, 12A12, 12A21, 12A30, VRC-PG04 und VRC-CH31	2010	^{61–65}
8ANC131	57%	CD4 Mimikry	8ANC37 und 8ANC134	2011	⁶³
CH103	34%	Erkennung durch CDR H3, starke Affinitätsreifung		2013	⁶⁶
V1/V2/					
PG9	70%	verlängerter CDR H3, oftmals mit sulfatiertem Tyr	PG16 und CH01-04	2009	^{67–72}
PGT145	60%	Diskontinuierliches konformationelles Epitop	PGT141 bis PGT144	2011	⁷³
V3 Glykan					
2G12	18%	reine Glykan Erkennung		1994	32,74,75

PGT121	53%	V1/V2 und V3 Glykan Erkennung	PGT122 und PGT123	2011	73,76,77
PGT128	56%	V3 Glykan Erkennung	PGT125 bis PGT127, PGT130 und PGT131	2011	73,78
PGT135	< 30 %	V3 und V4 Glykan Erkennung	PGT136 und PGT137	2011	73,79
MPER (gp41)					
2F5	48%	ELDKWAS Peptid Erkennung	m66	1992	33,74,80 -82
4E10	88%	erkennt Sequenz vor Transmembrandomäne		1994	33,74,82, 83
10E8	97%	keine Autoreaktivität	7H6	2012	84
Z13	< 20%	WNWFDITN Peptid Erkennung aus Phagen-Display-Bibliothek		2001	85

Die Antikörper unterteilen sich in vier Gruppen. Die letzte Gruppe umfasst die Antikörper, die gegen die membran-nahe externe Region (MPER) des gp41, aber nicht gegen gp120 gerichtet sind. Die monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 wurden bereits Mitte der 1990er beschrieben und folglich schon intensiver Forschung unterzogen. Dabei wurde festgestellt, dass diese Antikörper stark hydrophobe CDR H3s besitzen, welche zu Interaktionen mit der Wirtszellmembran in der Nähe des MPER auf dem Virion führt ^{81,86}, aber auch für die beobachteten Poly- und Autoreaktivitäten dieser Antikörper verantwortlich sind ⁸⁷⁻⁸⁹. Diese Autoreaktivität führt in der Regel dazu, dass B-Zellen, deren B-Zell-Rezeptoren diese Eigenschaften aufweisen, klonal deletiert werden ⁹⁰ und nicht zu reifen antikörpersekretierenden B-Zellen heranwachsen. Deshalb konnten solche Antikörper bisher nur selten gefunden werden. Im Jahre 2012 wurde jedoch der Antikörper 4E10 identifiziert, der keine autoreaktiven Eigenschaften besitzt ⁸⁴. Dies steigerte das Interesse an Antikörpern die gegen MPER gerichtet sind, und deren Epitope. Ihre Erforschung hinsichtlich HIV-1 Impfstoffdesign dauert an ⁹¹⁻⁹³.

Die Antikörper der drei weiteren Gruppen erkennen Epitope auf monomerem und/oder trimerem gp120. Die Antikörper der zweiten Gruppe erkennen konformationelle Epitope auf dem V1/V2-*loop*. Die Mitglieder der zweiten Gruppe sind weniger als 5 Jahre literaturbekannt, da erst Techniken zur PCR Vermehrung von Genabschnitten der schweren und leichten Ketten von Antikörpern aus einzelnen humanen B-Zellen ⁹⁴ die Charakterisierung der Antikörper PG9 und PG16 ermöglichte, welche in neutralisierenden Zellüberständen kleiner Gruppen kultivierter B-Zellen infizierter Individuen gefunden wurden ⁶⁷. PG9 erkennt monomeres gp120 nur schlecht, aber ein quarternäres Epitop aus V1/V2-*loop* und zwei Glykanen, das vom Env-Trimer auf Viren ausgebildet wird, wird hingegen sehr gut erkannt ⁶⁷.

Die meisten Mitglieder der dritten Gruppe wurden ähnlich wie PG9 und PG16 identifiziert und sind ebenfalls gegen Glykane, diesmal des V3-loops, und den V3-loop selbst gerichtet. Die zentrale Struktur, die von den Antikörpern dieser Gruppe erkannt wird, ist ein N-verknüpftes Glykan am Asparagin 332 des V3-loops. Der Antikörper 2G12^{32,74,82} ist der am längsten bekannte Antikörper dieser Gruppe und erkennt ausschließlich die verzweigten Mannose-Reste an Asn 295, 332 und 395^{73,75,95}. Unter Einbeziehung der kürzlich entdeckten α -HIV-1-gp120 Antikörper der PGT-Serie, welche ebenfalls Glykane erkennen, konnte eine neue angreifbare Schwachstelle definiert werden, welche maßgeblich durch Glykane definiert wird und nicht Teil des "Neutralizing Face" ist (Abb. 7).

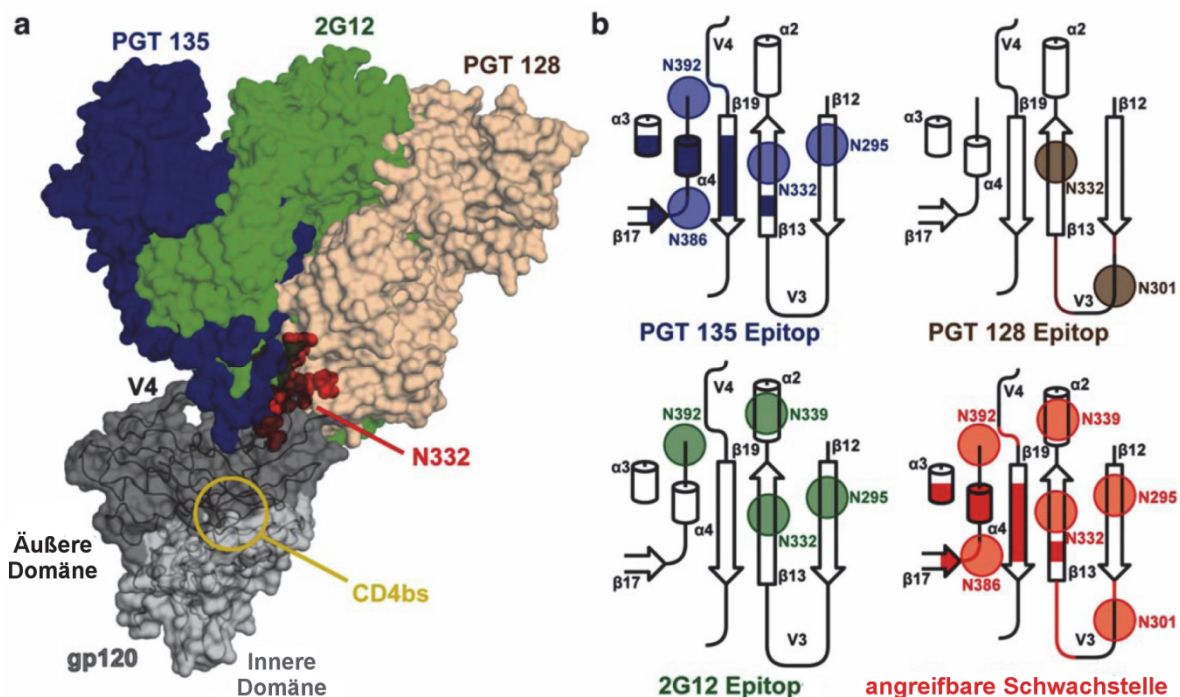


Abb. 7 Angreifbare Schwachstelle mit zentralem Asn 332 Glykan⁷⁹ [a] Bindung der Antikörper PGT135, 2G12 und PGT128 an das Asn 332 Glykan. [b] Schematische Darstellung der Epitope und der angreifbaren Schwachstelle, interatomare Kontakte sind farblich markiert, die Kreise stehen für Glykane

Die in Gruppe zwei und drei befindlichen Antikörper erkennen also Epitope, welche zumindest teilweise von Glykanen definiert werden, was nicht für die erste Gruppe zutrifft, nämlich die der CD4bs-Antikörper, deren Epitope die CD4 Bindungsstelle von gp120 überlappen. Ihre Epitope liegen nicht auf Glykanen, sondern sind Teilstücke der Proteinoberfläche des „Neutralizing Face“. Die potentesten Antikörper dieser Gruppe sind die VRC01-artigen. VRC01 wurde 2010 durch Bindung an ein oberflächenmodifiziertes gp120-Protein entdeckt, das aber eine funktionelle CD4bs aufweist⁶¹. VRC01-artige Antikörper imitieren bei Bindung an das Env-Trimer auf Virionen teilweise CD4, da sie die CD4bs wie CD4 auch in ihrer "geschlossenen" Konformation erkennen, allerdings keine konformationellen Änderungen wie CD4 im Env-Trimer zur offenen Konformation auslösen

^{61,64,96,97}. Auch die CD4bs des "Neutralizing Face" konnte schon 2007 auf eine angreifbare Schwachstelle reduziert werden ^{59,98}. Es wurde bereits gezeigt, dass die Fähigkeit der CD4bs Antikörper, allen voran VRC01, genau diese Schwachstelle zu erkennen mit der Neutralisationsbreite dieser Antikörper korreliert ⁶².

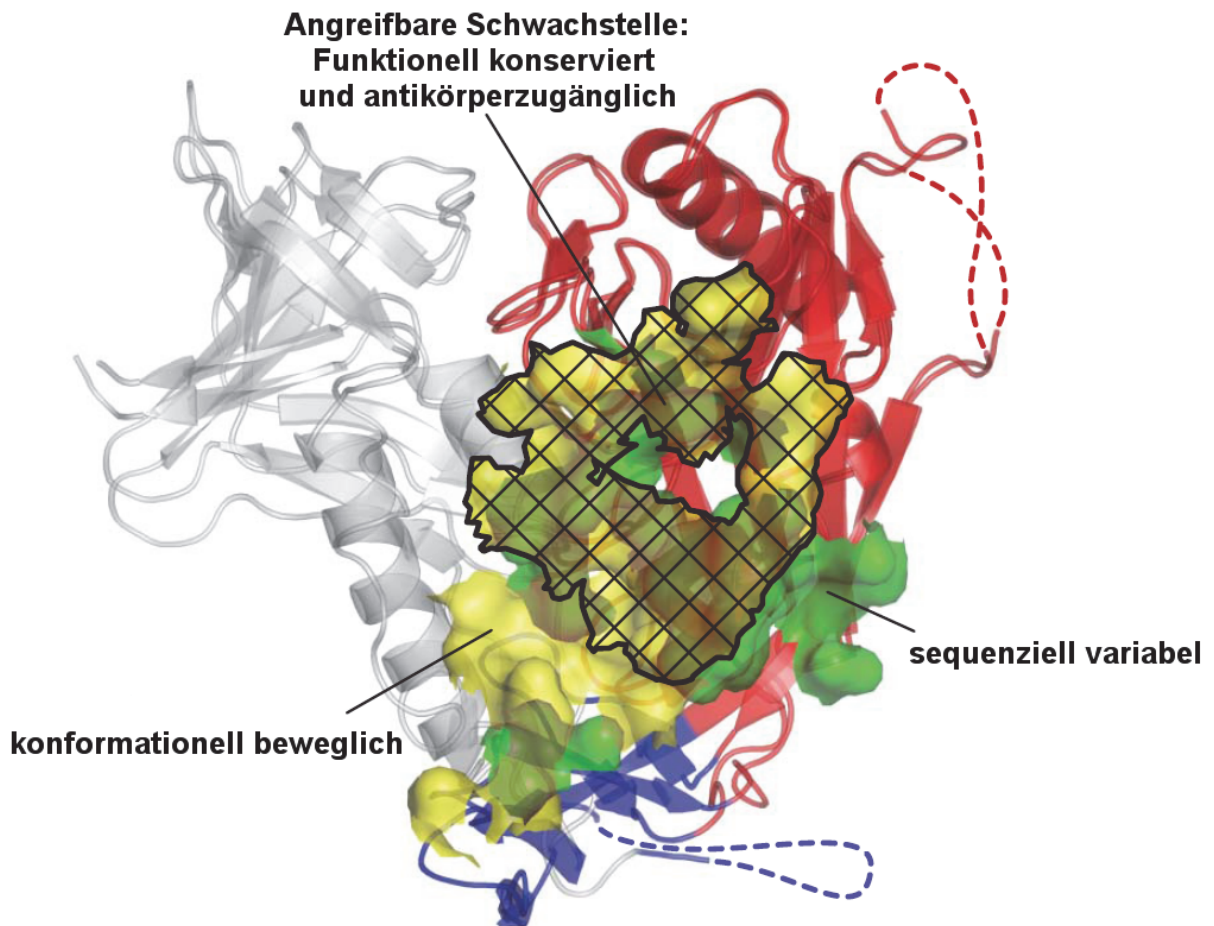


Abb. 8 Strukturelle Definition eines konformationell invariablen, antikörperzugänglichen Bereiches der CD4 Bindungsstelle ⁵⁹

Bis 2010 der Antikörper VRC01 identifiziert und charakterisiert wurde, war b12 der einzige bekannte CD4bs Antikörper, der eine breite Neutralisationsfähigkeit aufwies. Er war für fast 20 Jahre Gegenstand intensiver Forschung. Mit seiner Hilfe gelang es erst 2007, fast 10 Jahre nach der Definition der CD4bs auf dem Herzstück des gp120-Proteins, die angreifbare Schwachstelle der CD4bs genauer zu betrachten (Abb. 8). b12 wurde 1991 mittels Phagen-Display Technik im Knochenmark eines asymptomatischen Infizierten identifiziert ^{30,99}. Durch Konkurrenzexperimente war bekannt, dass das Epitop des b12 Antikörpers mit der CD4bs überlappt ¹⁰⁰, was 2007 von Zhou *et al.* durch die Strukturaufklärung eines Komplexkristalls aus b12 als antigenbindendem Fragment (Fab) und modifiziertem gp120-Protein bestätigt wurde ⁵⁹. Damit war b12 der erste, gegen die CD4bs gerichtete, breit neutralisierende Antikörper für den eine Komplexstruktur mit einem gp120-Protein erhalten und aufgeklärt werden konnte.

Analysiert man diese Komplexkristallstruktur, so erkennt man, dass das Epitop des b12 Antikörpers und die CD4bs zwar großflächig überlappen, jedoch nicht deckungsgleich sind (Abb. 9a)

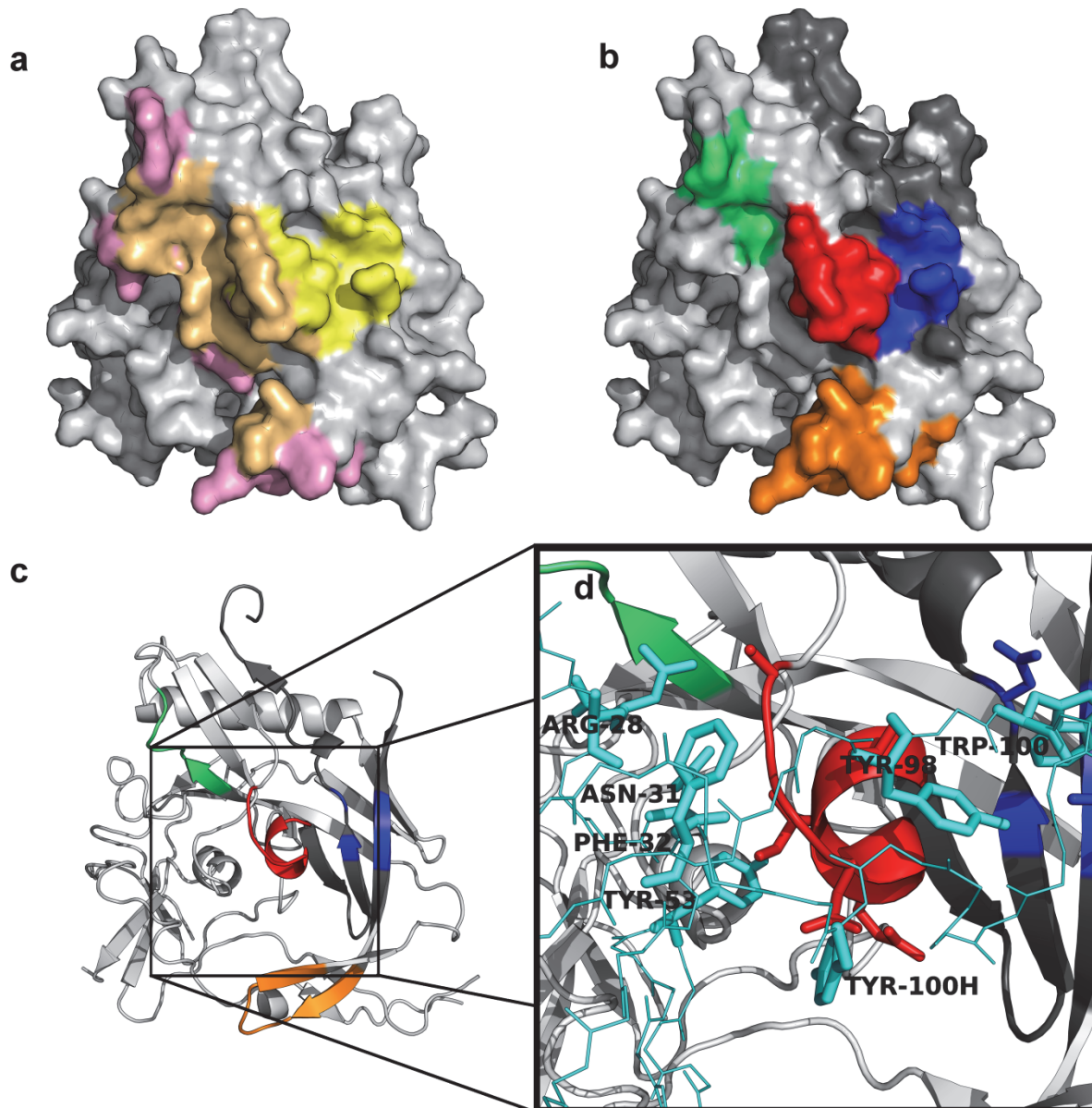


Abb. 9 Struktur eines gp120-Proteins im Komplex mit b12 (PDB 2NY7): [a] Oberflächendarstellung des gp120-Proteins, CD4-Kontaktfläche (rosa), b12-Kontaktfläche (gelb) und überlappende Kontaktfläche (ocker); [b] Darstellung wie a, gp120 365-373 (rot), gp120 424-433 (orange), gp120 454-460 (grün), V4-loop Stamm (blau); [c] Cartoon-Darstellung mit Perspektive wie a und b und Detailansicht [d] mit Farbgebung wie in b und Darstellung der Hauptinteraktionsreste als Stabmodell, Die C α -Spur des b12 ist cyan dargestellt und die dargestellten Reste machen über zwei Drittel der Interaktionsfläche mit dem gp120-Protein aus.

Abb. 9b zeigt die gp120-Sequenzabschnitte farbig hervorgehoben, welche die Hauptinteraktion mit CD4 bzw. b12 ausbilden, nämlich der CD4bl (Reste 365-373), der β 20- β 21 *hairpin* (Reste 424-433), das β 23-Fragment (Reste 454-460) und der V4-loop Stamm (Reste 384-386 und 417-419). Dabei kontaktiert das Trp100 an der Spitze des langen CDR H3 des b12 den Stamm des V4-loops, welcher von CD4 nicht zur Interaktion genutzt wird.

Alle CDRs der schweren Kette interagieren mit dem CD4bl und umgreifen diesen bildlich. Die CDRs der leichten Kette sind in dieser Kristallstruktur nicht an der Interaktion beteiligt.

Die CD4bs und auch das b12-Epitop auf gp120 beinhalten laut den bekannten Kristallstrukturen keine Glykane und eignen sich daher sehr gut als Immunogene für die Erzeugung von α -HIV-1-Antikörpern auf Peptidbasis.

3.3 Peptide

Peptide entstehen formal durch Kondensation mehrerer Aminosäuren unter Wasserabspaltung. Ab ungefähr 50 Aminosäurebausteinen bezeichnet man ein Peptid als Protein. Die einzelnen Bausteine werden über sogenannte Peptidbindungen verknüpft, die eine relativ starre, planare Struktur aufweisen. Der Grund dafür ist eine Resonanzstabilisierung, die der Peptidbindung einen partiellen Doppelbindungscharakter verleiht ¹⁰¹. In der Regel nehmen Peptidbindungen eine trans-Konformation ein, die bis zu 8 kJ*mol⁻¹ stabiler ist als cis-Peptidbindungen, da sich in der cis-Konformation die Seitenketten gegenseitig stören ¹⁰².

In der Natur kommen Peptide beispielsweise als endogene Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und auch als wichtige Signalmoleküle des Immunsystems vor ¹⁰³. Peptide können sowohl rekombinant, also durch Transkription und Translation bestimmter Gene in Organismen, hergestellt werden, wobei man normalerweise auf die Verwendung der proteinogenen L- α -Aminosäuren beschränkt ist, als auch chemisch synthetisch, was auch den Einsatz unnatürlicher bzw. D-Aminosäuren ermöglicht und die Anzahl zugänglicher, potentiell wirksamer Peptide nahezu ins Unendliche erhöht.

3.3.1 Synthetische Peptide

1963 wurde durch Bruce Merrifield die Festphasenpeptidsynthese vorgestellt ¹⁰⁴. Sie reduzierte die bei Peptidsynthese in Lösung sehr aufwendige Aufarbeitung des Produktes nach jedem Kupplungsschritt auf simple Waschschrte des polymeren Trägers und ermöglichte den Einsatz von großen Reagenzienüberschüssen über der wachsenden Peptidkette. Ein weiterer großer Vorteil besteht in der Möglichkeit der Automatisierung dieser Synthesemethode. Vergleicht man synthetische und rekombinante bzw. enzymatische Methoden zur Peptidgewinnung, so sind die rekombinanten Methoden bezüglich Ausbeute und Reinheit oftmals im Nachteil ¹⁰⁵.

Die Synthese an unlöslichen polymeren Trägern, die mittlerweile nicht nur für Peptide, sondern allgemein für die organische Synthese eingesetzt wird, vereinfacht den Syntheseprozess also enorm und macht verschiedenste Peptide relativ einfach zugänglich.

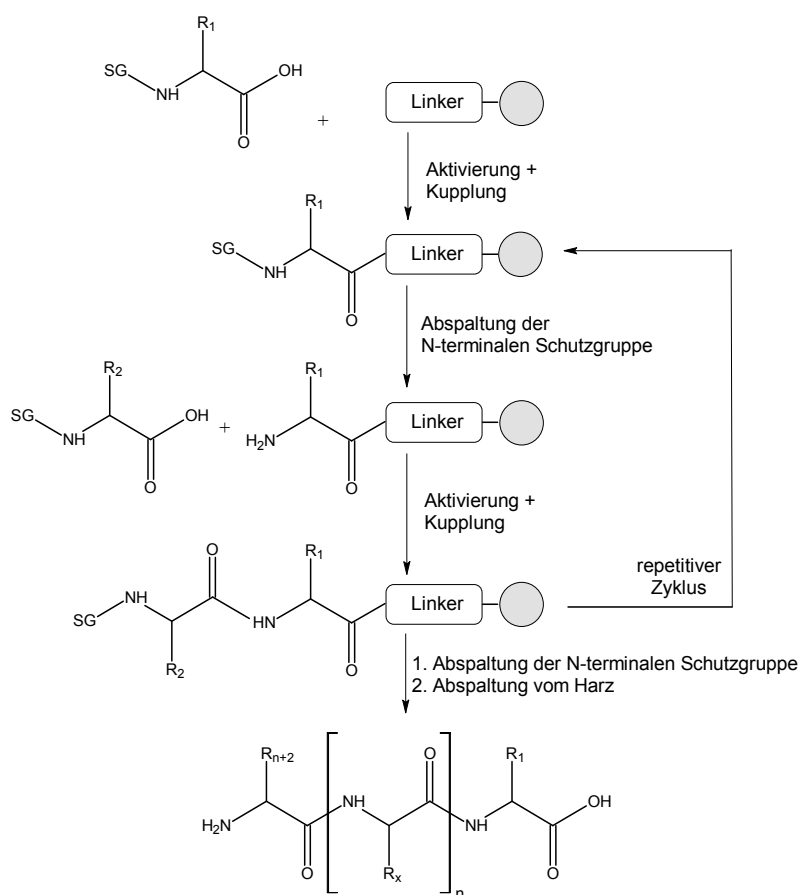


Abb. 10 Schema der Festphasenpeptidsynthese

An einer festen Phase wird in repetitiven Zyklen aus Schutzgruppenabspaltung sowie Aktivierung und Kupplung der nachfolgenden Aminosäure eine Peptidkette aufgebaut, welche in einem finalen Reaktionsschritt vom polymeren Träger entfernt wird (Abb. 10). Heutzutage wird meist die Fmoc / tBu Strategie¹⁰⁶ verwendet, um den N-Terminus der wachsenden Peptidkette bzw. die Seitenkettenfunktionalitäten zu schützen. Sie hatte sich nach der Veröffentlichung der Fmoc-Schutzgruppe¹⁰⁷ als basenlabile Aminoschutzgruppe neben der Boc / Benzyl-Strategie nach Merrifield schnell bewährt.

Jedoch lässt sich mit dieser Fmoc-basierten Synthesestrategie nicht jedes beliebige Peptid synthetisieren, da auch sogenannte „schwierige Sequenzen“ existieren. Schwierige Sequenzen zeichnen sich durch die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbildung zwischen den wachsenden Peptidketten oder mit dem Trägerpolymer aus, was mit NMR-Studien nachgewiesen werden konnte^{108,109}. Mit spektroskopischen Verfahren konnte gezeigt werden, dass solche aggregierende Peptide am Trägerharz β -faltblattartige Sekundärstrukturen ausbilden^{110–112}. Die starken Wechselwirkungen zwischen den wachsenden Peptidketten führen dann zu einem Ausschluss des Lösemittels aus der Polymermatrix und schlechterem Quellverhalten des Peptid-Polymer-Harzes^{113,114}, was den N-Terminus als Substrat schlecht zugänglich für

Reagenzien macht. Dies führt zu langsamen und unvollständigen Kupplungsreaktionen und somit zum Fehlschlagen der Synthese.

Die modernsten und effizientesten Wege um die Ausbildung aggregierender Strukturen zu verhindern ist die reversible Modifikation des Struktur des Peptidrückgrats während der Synthese. Eine Möglichkeit besteht darin, das Proton des Amidstickstoffs der Peptidbindung durch säurelabile Schutzgruppen auszutauschen, um vorübergehend eine tertiäre Amidbindung zu schaffen und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, bei denen der Amidstickstoff normalerweise als Protonendonator fungiert ¹⁰¹, und damit die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu behindern. Dies kann mit N^α-geschützten Benzylderivaten ^{115,116} oder mit den sogenannten Pseudoprolinen erfolgen ^{117,118}. Eine andere Möglichkeit stellt die sogenannte Depsipeptid- oder O-Acyl-Isopeptid-Methode dar ^{119–121}, bei der die wachsende Peptidkette an geeigneten Stellen über die Hydroxylfunktion von Boc-geschütztem Serin oder Threonin durch die Ausbildung einer Esterbindung verlängert wird. Als Synthesebausteine werden sie dann häufig in Form von geschützten Dipeptiden eingesetzt (Abb. 11). Während der Synthese, der Abspaltung und der Aufarbeitung bei der Fmoc/tBu-Strategie sind die Esterbindungen stabil und können am Ende der Synthese unter milden basischen Bedingungen durch einen O,N-Acylshift in eine Amidbindung umgelagert werden.

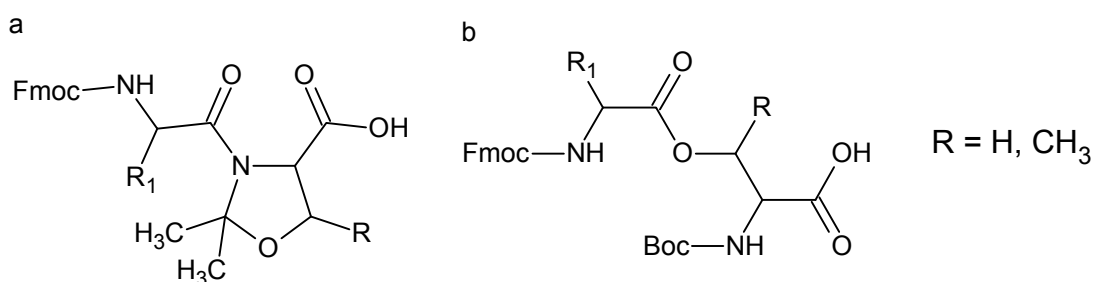


Abb. 11 Allgemeine Struktur von [a] Pseudoprolin-Dipeptid-Bausteinen und [b] Isoacyl-Dipeptid-Bausteinen mit Serin bzw. Threonin

Diese Fortschritte und auch andere Techniken wie die mikrowellengestützte Synthese oder neue Kupplungsreagenzien haben dazu beigetragen, dass heutzutage immer mehr Peptide als molekulare Werkzeuge für die medizinisch pharmazeutische Forschung zugänglich werden und auch immer mehr peptidische Wirkstoffe auf den pharmazeutischen Markt gelangen.

3.3.2 Peptide als Therapeutika

Im Jahr 2010 waren ungefähr 60 Peptide weltweit als Arzneistoff zugelassen, welche einen Umsatz von 13 Mrd USD ausmachten ¹²². Dies machte bei einem weltweiten Umsatz der Arzneimittelbranche von ca. 890 Mrd USD im Jahr 2010 ¹²³ nicht einmal 1,5 % des Gesamtumsatzes der Branche aus. Trotzdem ist der Zweig der peptidischen Wirkstoffe stark

im Aufschwung, zumal der klassische Zweig der niedermolekularen organischen Verbindungen mit ca. 20 Neuzulassungen pro Jahr seit 1980 konstant bleibt, obwohl die Zahl der identifizierten Zielstrukturen für potentielle Medikamente ständig steigt ¹⁰³. 2012 wurden sechs neue peptidische Arzneistoffe zugelassen, so viele wie nie zuvor, und viele weitere peptidische Wirkstoffe sind bereits in klinischen Studien ¹²⁴.

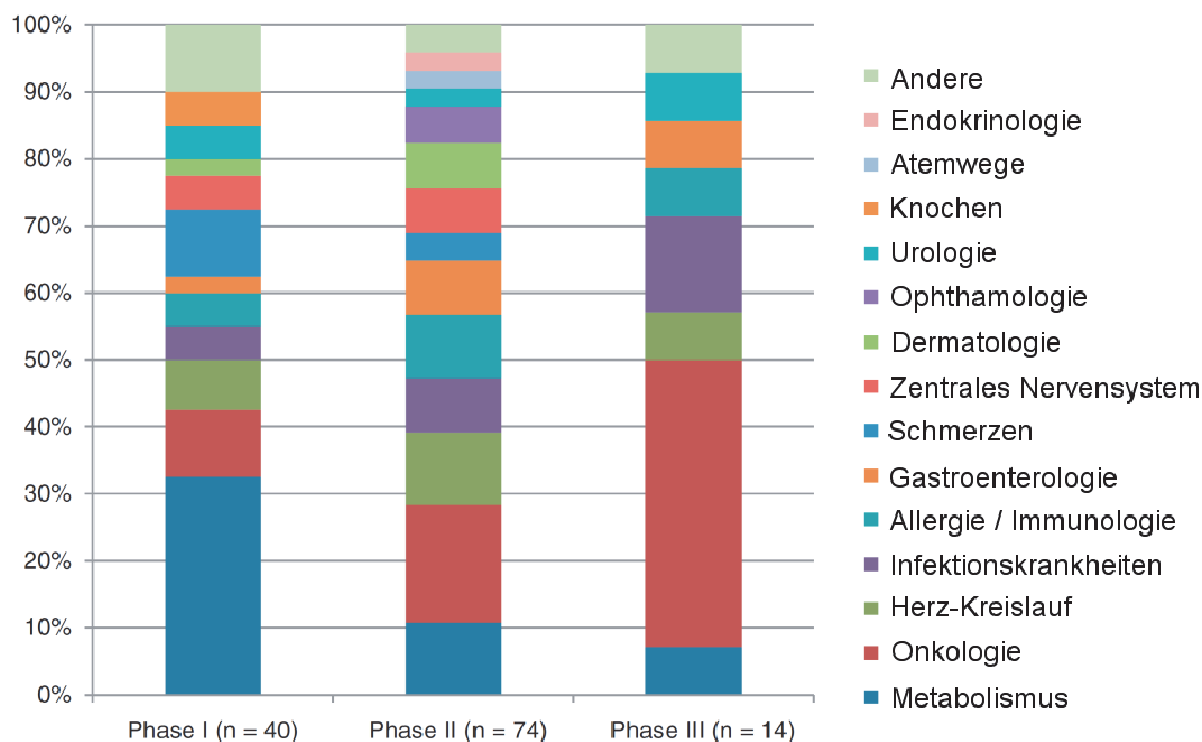


Abb. 12 Therapeutische Bereiche für Peptide in Klinischen Studien ¹²⁴

Von den 128 peptidischen Arzneistoffen, die Anfang 2013 in klinischen Studien waren, befanden sich 40 in Phase 1, 74 in Phase 1/2 bzw. 2 und 14 Peptide in Phase 2/3 bzw. 3 und sie wurden für den Einsatz in vielen medizinischen Anwendungsbereichen untersucht (Abb. 12).

Peptide weisen gegenüber niedermolekularen organischen Verbindungen einige Vorteile auf. Peptide sind häufig potenter und selektiver als niedermolekulare Verbindungen ¹²⁵, sie können ein breites Spektrum an Zielmolekülen adressieren und sie reichern sich kaum in Geweben an. Ihre Abbauprodukte sind Aminosäuren, was die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Interaktion mit anderen Arzneistoffen verringert ¹²⁶. Peptide führen potentiell zu einer geringeren Toxizität und weniger Nebenwirkung von Peptiden gegenüber den klassischen niedermolekularen Verbindungen der Pharmaindustrie. ¹⁰³

Im Vergleich zu hochmolekularen Verbindungen wie Antikörpern oder allgemeinen Proteinen haben Peptide als Therapeutikum ebenfalls Vorteile, denn sie sind generell weniger immunogen als Antikörper oder Proteine ¹²⁷. Außerdem sind sie billiger zu produzieren,

besitzen eine höhere Aktivität bezogen auf die Masse des Moleküls, höhere Lagerstabilität und die Fähigkeit, Tumore und Gewebe zu penetrieren ¹²⁸.

Peptide standen deshalb lange nicht im Fokus der Pharmabranche, weil sie auch einige Nachteile als Arzneistoffe aufweisen. Diese Nachteile sind ¹²⁹: geringe orale Bioverfügbarkeit und eine kurze Halbwertszeit aufgrund proteolytischer Enzyme im Verdauungssystem und im Blutplasma, schnelle Ausscheidung durch Leber und Niere, die hohe Hydrophilie, welche die Fähigkeit, physiologische Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, einschränkt, sowie die hohe konformationelle Flexibilität, welche manchmal zu schlechten Selektivitäten führt. Diesen Nachteilen wurde auf verschiedenste Art entgegengearbeitet, so dass heute peptidische Leitstrukturen mit verschiedenen Strategien modifiziert werden, welche von Vliege *et al.* in einem Übersichtsartikel zusammengefasst wurden ¹²⁹. Dazu gehören Modifikationen der Leitstruktur durch unnatürliche Bausteine, um die proteolytische Stabilität zu erhöhen. Dies kann durch Modifikationen des Rückgrats, der Seitenketten oder der N- bzw. C-Termini der Peptide und auch durch Zyklisierungen erfolgen. Glykosylierungen sowie das Einbringen von Polyethylenglycol-Ketten (PEG) erhöhen ebenfalls die proteolytische Stabilität, wobei sehr große PEG-Reste, die das Molekulargewicht des Peptids auf über 50 kDa erhöhen, die Plasmahalbwertszeit zusätzlich durch eine verlangsamte Ausscheidung über die Niere erhöht.

Medikamente zur Behandlung von HIV-Infektionen konnten 2012 in Deutschland eine Umsatzsteigerung von über 10 % gegenüber dem Vorjahr verzeichnen ¹²³. Ein peptidischer Vertreter dieser Gruppe ist Enfuvirtide, welcher im nächsten Kapitel als Beispiel für den Einsatz von Peptiden in der Forschung bis hin zur Zulassung als Arzneimittel etwas genauer betrachtet wird.

3.3.3 Peptide in der HIV-1 -Forschung

Der bekannteste Peptid-Arzneistoff im Zusammenhang mit HIV-1 ist Enfuvirtide, welches auch als Fuzeon, T-20 oder DP-178 bezeichnet wird und die Aminosäuren 643–678 des HIV-1_{LAI} gp160 umfasst. Es wird heute bei Patienten eingesetzt, bei denen die üblichen Wirkstoffe der cART durch Resistenzbildungen des HIV-1 keine oder sehr geringe Wirksamkeit zeigen. Seine Entwicklung geht ursprünglich auf Versuche mit gp41-abgeleiteten Peptiden zurück, die für die Charakterisierung von Epitopen im Zusammenhang mit der HIV-Impfstoffentwicklung durchgeführt wurden und nicht auf die Entwicklung eines Fusionsinhibitors abzielten. Das erste beschriebene Peptid DP-107 leitet sich von der N-terminalen Heptad-Repeat Region (NHR) des gp41 ab und umfasst die Aminosäuren 558–595 des HIV-1_{LAI} gp160 ¹³⁰. Es bildet in Lösung eine α -Helix aus und inhibiert die HIV Replikation *in vitro* bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ ¹³⁰. Stört man die Ausbildung der α -Helix durch Modifikationen der Sequenz, reduziert sich auch die Inhibition der HIV

Replikation¹³¹. Der Ausbildung der α -Helix wurden also entscheidende Attribute für die Infektionsinhibition beigemessen und die C-terminale Heptad-Repeat Region (CHR) des gp41 rückte in den Fokus, da für diesen Bereich auch α -helikale Sekundärstrukturen vorausgesagt wurden^{132,133}. Das untersuchte 36 Aminosäuren umfassende Peptid DP-178 ist 100-fach potenter als DP-107 und es konnte gezeigt werden, dass DP-178 seine Wirksamkeit durch Bindung an intermediäre gp41-Strukturen, die vor der Ausbildung des 6-Helix-Bündels vorliegen, ausübt¹³⁴ und so die Bildung des 6-Helix-Bündels aus CHR und NHR verhindert. Auch wenn es im Fall von Enfuvirtide Hinweise darauf gibt, dass andere Mechanismen für die fusionsinhibierende Wirkung mit verantwortlich sind^{135–138}, scheint der Hauptinteraktionspartner NHR zu sein, da bisher beobachtete Resistenzmutationen in diesem Sequenzabschnitt des gp41 lokalisiert sind¹³⁹. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, wie man sich heute den Einsatz und die Wirkungsweise von inhibitorischen Peptiden in der Forschung allgemein vorstellt.

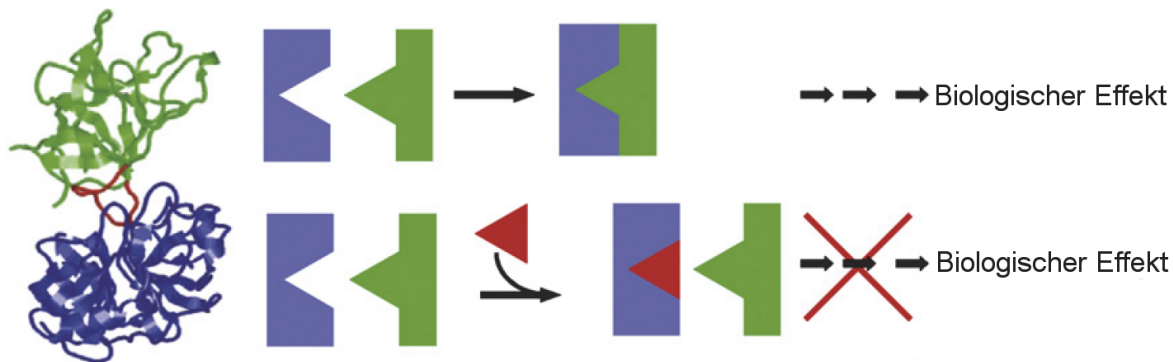


Abb. 13 Wirkungsprinzip von peptidischen Mimetika: Die Interaktion von zwei Proteinen (blau und grün) wird durch ein peptidisches Mimetikum (rot) verhindert (modifiziert nach¹⁴⁰)

Man versucht peptidisch die Interaktionsfläche eines Proteinliganden durch ein abgeleitetes Peptid nachzuahmen und so die Protein-Protein-Interaktion zu unterdrücken (Abb. 13). Im Fall von Enfuvirtide findet die Interaktion, welche unterdrückt werden soll, allerdings nicht zwischen zwei verschiedenen Proteinen sondern zwischen zwei Proteindomänen desselben Proteins gp41 statt.

Ein anderes Peptid, welches von einem Oberflächenprotein des HI-Virus abgeleitet wurde, ist **CD4bs-M**¹⁴¹. Dieses, in der Arbeitsgruppe von Prof. Jutta Eichler strukturbasiert entwickelte Molekül, umfasst die essentiellen Sequenzbereiche von gp120, die dessen CD4bs ausmachen. (Abb. 9b; Abb. 14). Das Peptid wurde von der gp120-Kristallstruktur im Komplex mit CD4 abgeleitet (PDB: 1RZJ¹⁴²) und die drei Einzelfragmente der diskontinuierlichen CD4bs werden auf einem verzweigten peptidischen Gerüst präsentiert.

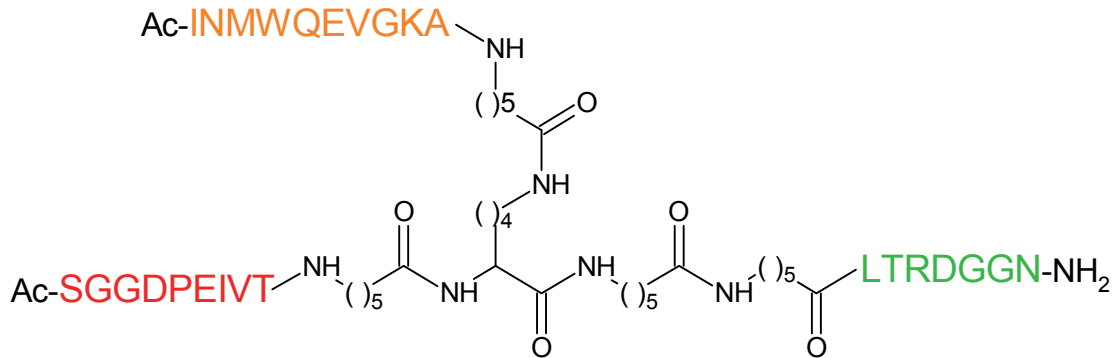


Abb. 14 CD4bs-M Molekül: Die Farbgebung ist identisch mit Abb. 9. Präzentrierte Fragmente: CD4bl (Reste 365-373) in rot, β 20- β 21 *hairpin* (Reste 424-433) in orange und β 23-Fragment (Reste 454-460) in grün

CD4bs-M bindet nicht nur an CD4, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass das Peptid mit löslichem CD4 um die Bindung an gp120 kompetiert. Außerdem wurden vergleichbare Ergebnisse im Bezug auf den breit neutralisierenden Antikörper b12 erhalten, dessen Epitop die Bindungsstelle von CD4 weitgehend überlappt (Abb. 9a, b). Es konnte sowohl eine Bindung von **CD4bs-M** an immobilisierten b12 als auch die Konkurrenz von **CD4bs-M** mit gp120 um die Bindung an immobilisierten b12 festgestellt werden. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass **CD4bs-M** die CD4bs auf gp120 erfolgreich imitiert und somit ein peptidisches gp120-Mimetikum der CD4bs generiert wurde. Um zu untersuchen ob **CD4bs-M** in der Lage ist eine Immunantwort auszulösen bei der Antikörper mit ähnlichen Bindungsspezifitäten wie b12 gebildet werden, wurden Kaninchen mit einem Konjugat aus CD4bs-M und KLH immunisiert. Die erhaltenen Seren zeigten im ELISA eine Kreuzreaktivität gegenüber gp120 und inhibierten außerdem die Bindung von b12 an gp120. Während der Immunantwort der Kaninchen auf CD4bs-M wurden also Antikörper gebildet, die an die CD4bs des gp120 binden. In zellbasierten HIV-1 Neutralisationsversuchen konnte jedoch keine Inhibition der Infektion durch diese Seren festgestellt werden.

3.3.4 Peptide als Immunogene und Impfstoffe

Das adaptive Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, wovon eine für die humorale Immunantwort zuständig ist und die andere für die zelluläre. In beiden Komponenten spielen Peptide eine entscheidende Rolle. Die zelluläre Immunantwort geht von T-Killer-Zellen aus und ist gegen infizierte Zellen oder Tumorzellen gerichtet. Im Zentrum der humoralen Immunantwort stehen die B-Zellen, welche zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren können. T-Helfer-Zellen, auch $CD4^+$ -T-Zellen genannt, sind die primären Wirtszellen von HIV-1 und spielen sowohl in der zellulären als auch der humoralen Immunantwort eine entscheidende Rolle, da sie sowohl B-Zellen als auch T-Killer-Zellen in einen aktivierten Zustand versetzen. Dazu müssen sie zunächst selbst durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie Makrophagen oder dendritische Zellen aktiviert werden. Dies geschieht durch Präsentation des endozytotisch aufgenommenen und

endosomal proteolytisch abgebauten extrazellulären Antigenen auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) der Klasse 2 in Form von Peptiden und anschließender Bindung an den T-Zell-Rezeptor einer T-Helferzelle. Im Zusammenspiel mit der Bindung von costimulatorischen Membranmolekülen auf beiden Zellen wird die T-Helfer-Zelle aktiviert.

B-Zellen, welche das gleiche Peptid auf ihren MHC-2-Molekülen präsentieren, werden nun ebenfalls durch Bindung des T-Zellrezeptors der aktivierten T-Helferzelle an den MHC-2-Peptid-Komplex der B-Zelle und durch kostimulatorische Moleküle aktiviert, was sie zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren lässt. Nur diejenigen B-Zellen, die einen B-Zellrezeptor besitzen der das Antigen erkennt, internalisieren nach Bindung des Antigens den Rezeptor-Antigen-Komplex und bauen ihn ebenfalls endosomal proteolytisch ab, um die entstandenen Peptide dann als MHC-2-Komplex zu präsentieren. So wird sichergestellt, dass nur B-Zellen mit antigenspezifischen B-Zell-Rezeptoren zu Plasmazellen differenzieren.

Auch für die zelluläre Immunantwort spielen aktivierte T-Helfer-Zellen eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage APCs so zu aktivieren, dass naive T-Killer-Zellen diesmal durch Bindung ihres T-Zell-Rezeptors an MHC-1-Peptidkomplexe des APC (Kreuz-Präsentation ^{143,144}) zu aktivierten zytotoxischen T-Killerzellen werden.

Ein als Vakzin geeignetes Immunogen muss also in der Lage sein, sowohl an den B-Zell-Rezeptor (also an den Antikörper) als auch im MHC-2-Komplex als prozessiertes Peptid an den T-Zell-Rezeptor zu binden und somit die Wandlung von antigen-spezifische B-Zellen zu antigen-spezifischen Plasmazellen und Gedächtniszellen zu induzieren. Bei diesem hoch komplexen Vorgang kann es dazu kommen, dass das Immunogen zwar an den B-Zell-Rezeptor bindet, jedoch keine kompatiblen T-Zell-Epitope aufweist, so dass es nicht in der Lage ist den MHC-2-Komplex entsprechend zu beladen und die T-Helfer-Zellen zu aktivieren. Um dieses Problem auszuschließen, werden Immunogene zu Forschungszwecken heute in der Regel an immunogene Trägerproteine gekuppelt und zusammen mit Adjuvantien verabreicht, häufig dem Freundschens Adjuvant, die die Aufgabe der T-Zell-Aktivierung zuverlässig übernehmen. Diese Vorgehensweise ist allerdings auch nur für die Immunisierung von Kleintieren zu Forschungszwecken geeignet, zur Impfung von Menschen müssen mildere Adjuvantien eingesetzt werden. Ideale Peptid-Impfstoffe beinhalten alle nötigen T-Zell-Epitope bereits im B-Zellepitop selbst, so dass sowohl starke T-Zell und B-Zell-Immunantworten auch ohne Zusatz von Adjuvantien ausgelöst werden ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Die Vielfältigkeit der humanen Leukozytantigen (HLA) Allele, die die Proteine der MHC-Komplexe kodieren, spielt bei der Auswahl von T-Zell-Epitopen für die Entwicklung potenter peptidischer Impfstoffe ebenfalls eine große Rolle, da die prozessierten Peptide von HLA-

Haplotypen gebunden werden müssen, die von vielen Individuen, idealerweise von allen, aufgewiesen werden^{148,149}.

Trotz dieser Einschränkungen haben peptidische Impfstoffe viele Vorteile^{150–152}:

- Fokussierung der Immunantwort auf Strukturelemente, welche im vollständigen (Protein-) Antigen nur schwach oder gar nicht immunogen sind.
- Die Möglichkeit allergene Sequenzen, onkogene Sequenzen oder Sequenzen, die zu Autoimmunreaktionen führen können, aus Impfstoff-Präparaten auszuschließen.
- Kein Einsatz von infektiösem Material, auch nicht im Herstellungsprozess.
- Modifikationen zur Verbesserung der Immunogenität, Stabilität und Löslichkeit lassen sich gut einbringen.
- Die Möglichkeit viele Peptide unterschiedlicher Herkunft an den selben Träger zu koppeln.
- Verhältnismäßig günstige Produktion im großen Maßstab und die Verfügbarkeit bewährter Analytik-Methoden zur Herstellung chemisch definierter Peptide.
- Lagerung in lyophilisierter Form bei Raumtemperatur möglich.

In anderen Arbeitsgruppen wird aktuell auch ein potentielles, peptidisches HIV-1 Vakzin untersucht, welches allerdings von gp41 und nicht von gp120 abgeleitet ist. Das Peptid präsentiert das Bindungsepitop eines HIV-1 neutralisierenden Antikörpers, nämlich 2F5, der an die membrannähe externe Region (MPER) von gp41 bindet und somit die Ausbildung des 6-Helix-Bündels und die darauf folgende Fusion des Virus mit der Wirtszelle verhindert. Durch detaillierte und methodisch breit gefächerte Analysen konnten hier bereits neue Erkenntnisse über Probleme bei Verabreichungsformen von Peptiden in liposomalen Vakzinen und auch über die Zugänglichkeit des 2F5-Epitops gewonnen werden.⁹³

4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung von HIV-1-abgeleiteten Peptiden einerseits als Mittel zur Aufklärung des viralen Infektionsmechanismus und andererseits als Immunogene für ein α -HIV-1-Vakzin zu untersuchen. Als Templat sollte das virale Oberflächenprotein gp120 dienen, welches die initialen Interaktionen mit den Rezeptoren der Wirtszelle (CD4 und Corezeptoren) eingeht und somit eine Infektion überhaupt erst möglich macht.

Zunächst sollte dabei ein bereits beschriebenes Peptid (**CD4bs-M**) als Immunogen zur Erzeugung einer Immunantwort gegen HIV-1 im Tiermodell und somit zur Gewinnung von monoklonalen α -HIV-1 Antikörpern getestet werden. **CD4bs-M** wurde von der diskontinuierlichen Bindungsstelle für den zellulären Rezeptor CD4 auf dem Oberflächenprotein gp120 abgeleitet und enthält drei Sequenz-Fragmente des gp120-Proteins, die direkt mit CD4 interagieren.

Außerdem sollte ein zweites Peptid **b12epi-M** nach dem Vorbild von **CD4bs-M** entworfen, synthetisiert und untersucht werden, das von einem ähnlichen gp120-Bereich abgeleitet werden sollte, nämlich von dem Epitop des monoklonalen Antikörper b12, welches die CD4bs überlappt. b12 wurde vom menschlichen Immunsystem als Teil einer humanen Immunantwort gegen HIV-1 generiert, weshalb sein Epitop auf gp120 möglicherweise besser als Templat für ein Impfstoffdesign geeignet ist als die CD4bs selbst.

Der Vergleich der beiden Peptide in diversen Bindungsstudien, Kompetitions-Experimenten und Immunisierungsversuchen sollte Aufschluss darüber geben, welches der beiden Peptide besser zur Studie von Virus-Zell-Interaktionen und möglicherweise zur Vakzin-Entwicklung geeignet ist. Des Weiteren sollten nicht nur möglichst viele neue Erkenntnisse gesammelt werden über die Eignung von Bindungsstellen- bzw. Epitop-abgeleiteten Peptiden als Vakzine oder Eintrittsinhibitoren, sondern auch mögliche Schwierigkeiten und besonders zu berücksichtigende chemische oder strukturelle Eigenschaften genauer betrachtet werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Die folgenden Geräte und die zugehörige Software wurden für die Durchführung der beschriebenen Methoden verwendet.

Gerät	Hersteller
Analytische HPLC/MS	
Agilent Series 1100	HP
Degasser, Binäre Pumpe; Säulenofen, DAD	
Autosampler Series 200	Perkin Elmer
Kinetex C18 Säule, 2,6 μ , 100 Å, 50 mm x 2,1 mm	Phenomenex
Massenspektrometer API2000 mit ESI-Quelle	AppliedBiosystems
CO ₂ -Inkubator CB150	Binder
Fluoreszenzspektrophotometer Cary Eclipse	Varian
Gefrierschrank Innova ULT laboratory freezer (-80 °C)	New Brunswick Scientific
Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4	Christ
mit Hybridvakuumpumpe RC6	Vacuubrand
Konfokalmikroskop LSM 710	Zeiss
Luminometer Orion Microplate Luminometer	Titertek-Berthold
Mikroskop Leica Leitz DM IL	Leica Microsystems
Millipore Synergy 185 Reinstwasseranlage (Simpak 2-Kartusche)	Millipore
Neubauer improved Zählkammer	Brand
pH-Meter Seven Easy mit InLab Micro Pro-Elektrode	Mettler Toledo
Photometer (Fluorophotometer)	
Plattenlesegerät Infinite Reader F200	Tecan
NanoPhotometer	Implen
Pipetten	

Einkanalpipetten	Gilson
12-Kanal Pipetten	Eppendorf

Präparative HPLCs

4 Channel Stand Alone Vacuum Degasser	Rheodyne
Pumpe L-6200 Intelligent Pump	Merck Hitachi
Detektor L-4250 UV/Vis-Detektor (Anlage 1)	Merck Hitachi
Variable Wavelength Detektor (Anlage 2)	Knauer
Fraktionssammler Super Frac	GE Healthcare
Kinetex C18 Säule, 5 µm, 100 Å, 100 x 21,2 mm (Anl. 1)	Phenomenex
Reposil C18 Säule, 5 µm, 100 Å, 250 x 25 mm (Anl. 2)	Dr. Maisch

Schüttler

Titramax 101	Heidolph
VTX-3000L	LMS Harmony
PS M3D	Grant Instruments

Sterilbank LaminAir HB2448	Heraeus
----------------------------	---------

Syntheseroboter Syro I	Multisynthtech
------------------------	----------------

Transmissions-Elektronenmikroskop EM10	Zeiss
--	-------

Waage CPA225D	Sartorius
---------------	-----------

Zetasizer Nano ZS ZEN3600	Malvern Instruments
---------------------------	---------------------

5.1.2 Chemikalien

Die Synthesebausteine zur Peptidsynthese sind passend für die Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/^tBu-Strategie geschützt.

Standard-Syntesebausteine der proteinogenen Aminosäuren und der ε-Aminohexansäure

<u>Synthesebaustein</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Aminosäure</u>	<u>3- / 1-Buchstabencode</u>	
Fmoc-L-Ala-OH	Iris Biotech	L-Alanin	Ala	A
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	Iris Biotech	L-Cystein	Cys	C
Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	Iris Biotech	L-Asparaginsäure	Asp	D

Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH * H ₂ O	Iris Biotech	L-Glutaminsäure	Glu	E
Fmoc-L-Phe-OH	Iris Biotech	L-Phenylalanin	Phe	F
Fmoc-Gly-OH	Iris Biotech	Glycin	Gly	G
Fmoc-L-His(Trt)-OH	Iris Biotech	L-Histidin	His	H
Fmoc-L-Ile-OH	Iris Biotech	L-Isoleucin	Ile	I
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	Iris Biotech	L-Lysin	Lys	K
Fmoc-L-Leu-OH	Iris Biotech	L-Leucin	Leu	L
Fmoc-L-Met-OH	Iris Biotech	L-Methionin	Met	M
Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Iris Biotech	L-Asparagin	Asn	N
Fmoc-L-Pro-OH	Iris Biotech	L-Prolin	Pro	P
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Iris Biotech	L-Glutamin	Gln	Q
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	Iris Biotech	L-Arginin	Arg	R
Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	Iris Biotech	L-Serin	Ser	S
Fmoc-L-Thr(^t Bu)-OH	Iris Biotech	L-Threonin	Thr	T
Fmoc-L-Val-OH	Iris Biotech	L-Valin	Val	V
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	Iris Biotech	L-Tryptophan	Trp	W
Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	Iris Biotech	L-Tyrosin	Tyr	Y
Fmoc-Ahx-OH	Iris Biotech	ε-Aminohexansäure	Ahx	X

Besondere Synthesebausteine

<u>Synthesebaustein</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Beschreibung / Besonderheit</u>
Fmoc-L-Asp(OAll)-OH	Iris Biotech	orthogonal geschütztes L-Asp
Fmoc-L-Dpr(Alloc)-OH	Iris Biotech	orthogonal geschütztes Dpr
Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH	Novabiochem	verhindert Aspartimidbildung
Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH	Iris Biotech	orthogonal geschütztes Lys
Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH	Iris Biotech	biotinyliertes Lys

Fmoc-L-Asn(Trt)-L-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH	Novabiochem Pseudoprolin-Dipeptid
Fmoc-L-Asn(Ac ₃ AcNH- β -Glc)-OH	Novabiochem N-acetylglucosaminiertes Asn
Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH	Novabiochem Isoacyl-Dipeptid
Fmoc-Aoa-OH	Iris Biotech Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctansäure-OH

Weitere Reagenzien und Chemikalien

Der verwendeten Chemikalien hatten einen hohen Reinheitsgrad von $\geq 99\%$, welcher mindestens mit *pro analysis* ausgezeichnet war.

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller	Produktnummer
1,2-Ethandithiol	Sigma Aldrich	02390
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	63689
Ac ₂ O	Carl Roth	CP28.2
AcOH	Merck Chemicals	1.00063
Ar	Linde	
Benzylpenicillin-Natriumsalz	Carl Roth	HP48.3
D-Biotin	Iris Biotech	LS-1070
Cyclohexan	Carl Roth	6570.3
DCM	Fisher Chemical	D/1856/17
DIC	Iris Biotech	RL-1015
DMF	Sigma Aldrich	D8654
DMSO	Sigma Aldrich	D8418
Geneticinsulfat-Lösung 50 $\mu\text{g/mL}$	Carl Roth	CP11.3
L-Glutamin	Sigma Aldrich	G3126
Glycin	Sigma Aldrich	50046
H ₂ SO ₄ konz.	Sigma Aldrich	258105
HOBt * H ₂ O	Sigma Aldrich	54802
IFA	Sigma Aldrich	F 5506

KCl	Sigma Aldrich	P9333
KFA	Sigma Aldrich	F 5881
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	Merck Chemicals	1.05099
KH_2PO_4	Carl Roth	3904.3
MeCN	Fisher Chemical	A/0627/17
N_2 gasförmig 5.0	Linde	
NaCl	Sigma Aldrich	S5886
NaHCO_3	Acros	A0301775
Na_2CO_3	Carl Roth	A135.2
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich	71643
Natrium-N, N-Diethyldithiocarbamat*3 H_2O	Sigma Aldrich	228680
OPD * 2HCl	Sigma Aldrich	P8287
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	Sigma Aldrich	216666
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich	P4333
Phenol	Carl Roth	0040.1
Piperidin	Sigma Aldrich	80640
Pyridin	Acros	339420010
TBME	Merck Chemicals	1.01843
TentaGel SRAM Harz	Rapp Polymere	S30 023
TFA	Carl Roth	P088.2
Thioanisol	Sigma Aldrich	88470
Thioflavin T	Sigma Aldrich	T3516
TIPS	Sigma Aldrich	233781
Tris	Sigma Aldrich	T6066
Tween 20	Carl Roth	9127.1
$\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich	73943
Wang Harz	Sigma Aldrich	17299

NaOAc	Sigma Aldrich	S2889
HCl(aq), rauchend, 37 %	Carl Roth	4625.2
HAT Medienzusatz 50x	Sigma Aldrich	H0262
HT Medienzusatz 50x	Sigma Aldrich	H0137
NH ₃ (aq) 30 – 33 %	Sigma Aldrich	05002
BSA	Sigma Aldrich	A7906

Medien und Puffer

Name / Abkürzung	Herstellung / Zusammensetzung
DMEM Medium	Gibco
RPMI 1640 Medium	Gibco
R10 Medium	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FKS 100 U/mL Penicillin 2 mM L-Glutamin
R0 Medium	RPMI 1640 mit 100 U/mL Penicillin 2 mM L-Glutamin
HAT / HT-Medium	RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FKS 100 U/mL Penicillin 2 mM L-Glutamin 0,1 % β -Mercaptoethanol 1 x HAT / HT Medienzusatz 100 U/mL Interleukin-6
0,1M Carbonat-Puffer pH 9,5	mit HPW auf 100 mL aufgefüllt 6,67 mL 1 M NaHCO ₃ (aq) 3,33 mL 1 M Na ₂ CO ₃ (aq)
PBS pH 7,4	mit HPW auf 100 mL aufgefüllt, mit HCl(aq) eingestellt 8,18 g NaCl 0,20 g KCl

	1,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	0,24 g KH_2PO_4
Phosphatpuffer pH 7,4	mit HPW auf 1 L aufgefüllt
	71,7 mL 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{aq})$
	28,3 mL 1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$
Waschpuffer	Phosphatpuffer pH 7,4 mit
	0,01 % (w/v) Tween 20
Assaypuffer	Phosphatpuffer pH 7,4 mit
	0,1 % (w/v) BSA
	0,01 % (w/v) Tween 20

Verwendete Proteine und Kits

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Produktnummer</u>
b12	Polymun Scientific	AB011
CD4	Sino Biological	10400-H08H
Gal-Screen™ Homogeneous Chemiluminescent Reporter Gene Assay for β -Galactosidase in Mammalian or Yeast Cells	Applied Biosystems	GSM200
gp120 HIV-1 IIIB (Euk)	Immuno Diagnostics	1001
Inject Maleimide Activated mCKLH Spin Kit	Thermo Scientific	77666
NovaBright™ Secreted Placental Alkaline Phosphatase (SEAP) Enzyme Reporter Gene Chemiluminescent Detection System	Invitrogen	N10559
Protein G Plus Agarose	Thermo Scientific	22851
ProteoStat Protein Aggregation Assay	Enzo Life Science	ENZ-51023-KP002

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Produktnummer</u>
UV/Vis-Küvetten	Brand	759210

0,2 µM Membran-Spritzenfilter	Merck Millipore	SLLG013SL
0,5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt	72.704
1,5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt	72.706
2 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt	72.695.500
2 mL Polypropylen-Spritzen	B.Braun	4606027V
Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfilter	Merck Millipore	UFC501024
Zellschaber	Greiner bio-one	541070
Einweg-Polystyrolsäulen	Thermo Scientific	29920
Einweg-Kapillarzelle	Malvern Instruments	DTS1061
konisches 15-mL Zentrifugenrohr	Sarstedt	62.554.502
konisches 50-mL Zentrifugenrohr	Sarstedt	62.547.254
Kupfergrid (Formvar, Kohlenstoff)	Plano	
Microtainer Gel-Röhrchen für Plasma	Becton Dickinson	365956
Mikrotiterplatten		
Mikrotestplatte aus PS	Sarstedt	82.1581
Immulon 2HB	Thermo Scientific	3455
FIA Platte schwarz	Greiner bio-one	655900
für Zellkultur	Greiner bio-one	
Nunc™ F96 MicroWell™ White	Thermo Scientific	236105
µ-Slides VI 0,4	Ibidi	80601
Pipettenspitzen	Eppendorf	
Serologische Pipetten	Greiner bio-one	

5.2 Methoden und Durchführung

5.2.1 Peptidsynthese

Die Synthese der Peptide erfolgte an fester Phase nach der Fmoc/tBu-Strategie. Sie wurde größtenteils automatisiert am Syntheseroboter durchgeführt, kostspielige Synthesebausteine wurden jedoch manuell eingeführt um den Reagenzienüberschuss und die Kupplungszeit variieren zu können. Auch weitere Reaktionen, welche nicht zur Elongation des Peptids

dienten, wurden manuell durchgeführt, wie beispielsweise die Knüpfung von Lactamen und die dazu erforderliche Abspaltung der orthogonalen Schutzgruppen oder N-terminale Modifikationen wie Biotinylierungen und Acetylierungen. Alle Synthesen wurden in einem Maßstab von 23 μmol in 2 mL-Polypropylenspritzen (Reaktor) durchgeführt, welche mit einer Fritte versehen waren. Diese ermöglichte das einfache Absaugen von Reagenzien und Lösungen, ohne die feste Phase zu verlieren. Als feste Phase wurden zur Synthese von Peptiden mit C-terminalem Amid das TentaGel SRAM Harz mit einer Beladung von 0,23 mmol/g verwendet, für die Synthese von Peptiden mit C-terminaler Säurefunktion diente ein Wang Harz mit einer Beladung von 1,5 mmol/g. Vor Beginn der Synthese wurden die Harze mindestens für zwei Stunden in 1 mL DMF gequollen. Die erste O-Acylierung an das Wang Harz wurde mit symmetrischen Anhydriden nach einem speziellen Protokoll durchgeführt. Falls die einzelnen aufeinanderfolgenden Zyklen der Synthese nicht unmittelbar nacheinander durchgeführt werden konnten, wurde die feste Phase zwei Mal mit je 800 μL DCM gewaschen und der Reaktor bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Der Syntheseverlauf wurde zu geeigneten Zeitpunkten mittels HPLC/MS kontrolliert.

5.2.1.1 Reaktionen an der festen Phase

5.2.1.1.1 Beladung Wang-Harz

Die Beladung des Wang Harzes erfolgte durch Veresterung der Hydroxylfunktionen des Harzes mit symmetrischen Anhydriden unter 4-(Dimethylamino)-pyridin-Katalyse. In einem 50 mL Rundkolben wurden 230 μmol Fmoc-Aminosäure im Eisbad bei 0 °C in 10 mL trockenem DCM unter Zugabe von einem Tropfen DMF gelöst. Nach Zutropfen von 115 μmol (17,8 μL) DIC wurde das Reaktionsgemisch unter Feuchtigkeitsausschluss durch ein aufgesetztes CaCl_2 -Rohr und Erwärmung auf Raumtemperatur für 18 h gerührt. Am Rotationsverdampfer wurde das Reaktionsgemisch bei 40°C bis zur Trockenheit eingengt, der Rückstand in 400 μL DMF gelöst und diese Lösung zum vorgequollenen Wang Harz gegeben. Nach Zugabe von 4,6 μmol (0,56 mg) DMAP gelöst in 100 μL DMF wurde das Gemisch über Nacht geschüttelt und abschließend das Harz fünf Mal mit je 800 μL DMF gewaschen.

5.2.1.1.2 Automatisierte Peptidsynthese

Automatisierte Aminosäurekupplungen wurden mit Hilfe des Syntheseroboters Syro 1 in sich wiederholenden Zyklen durchgeführt. Dabei pipettierte der Roboter mit einer Nadel verschiedene vorbereitete Lösungen von oben nach einem gespeicherten Syntheseprotokoll in die Reaktoren mit Harz, wartete ein vorgegebenes Zeitintervall ab und saugte die Lösungen dann wieder mittels Unterdruck nach unten ab. Die aufeinander folgenden Schritte eines Synthesesyklus mit zweifacher Fmoc-Entschützung und zweifacher

Aminosäurekupplung (Acylierung) mit jeweils ca. fünffachem Überschuss der Fmoc-Aminosäure ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2 Syntheseprotokoll: automatisierter Synthesesyklus am Syro 1 Syntheseroboter

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μ L]	Reagenzien (gelöst in)
1	Fmoc-Entschützung	5	1	500	20 % (v/v) Piperidin (DMF)
	Fmoc-Entschützung	15	1	500	20 % Piperidin (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF
2	Erste Acylierung	60	1	350	0,33 M Fmoc-Aminosäure (0,5 M HOBt*H ₂ O in DMF)
				150	20 % (v/v) DIC (DMF)
	Waschen	1	2	800	DMF
3	Zweite Acylierung	60	1	350	0,33 M Fmoc-Aminosäure (0,5 M HOBt*H ₂ O in DMF)
				150	20 % (v/v) DIC (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF
4	Acetylierung	30	1	500	33,3 % (v/v) Pyridin und 16,7 % (v/v) Ac ₂ O (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF

5.2.1.1.3 Manuelle Peptidsynthese

Besondere Synthesebausteine wurden generell nicht mit dem Roboter gekuppelt sondern manuell, um den großen Reagenzienüberschuss von neun Äquivalenten umgehen zu können, welche der Roboter pro Zyklus benötigt.

Für die manuelle Kupplung wurde der Reaktor mit einer Kanüle und einem Stempel ausgestattet, um die Lösungen einfach in den Reaktor hineinziehen und wieder herausdrücken zu können. Für die Dauer der einzelnen Schritte wurde die Kanüle mit einem Stück zerschnittenem Vakuumschlauch verschlossen und der Reaktor auf den Schüttler gelegt. Anstatt zwei Kupplungsschritten wie im automatisierten Synthesesyklus wurde hier nur eine Kupplung durchgeführt und auch der Reagenzienüberschuss auf ein bis zwei Äquivalente reduziert, die Reaktionszeit jedoch auf 24 Stunden erhöht (siehe Tab. 3). Pro eingesetztem Äquivalent des Synthesebausteins wurde mit 1,2 Äquivalenten DIC aktiviert, um eine mögliche Hydrolyse der aktivierten Spezies und damit deren Deaktivierung während langen Reaktionszeiten zu vermeiden. Dabei wurde das DIC in eine Lösung aus dem Synthesebaustein und HOBt*H₂O in DMF gegeben und das Gemisch dann aufgezogen.

Tab. 3 Syntheseprotokoll: manueller Synthesesyklus

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μ L]	Reagenzien (gelöst in)
1	Fmoc-Entschützung	5	1	500	20 % (v/v) Piperidin (DMF)
	Fmoc-Entschützung	15	1	500	20 % (v/v) Piperidin (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF
2	Acylierung	1440	1	500 + x	46 μ mol bzw 69 μ mol Synthesebaustein (500 μ L 0,5 M HOBt*H ₂ O in DMF)
				8,6 bzw. 12,9	DIC
	Waschen	1	5	800	DMF
3	Acetylierung	30	1	500	33,3 % (v/v) Pyridin und 16,7 % (v/v) Ac ₂ O (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF

Manuelle Kupplungen mit einem Reagenzienüberschuss von zwei Äquivalenten wurden für die folgenden Synthesebausteine durchgeführt:

Fmoc-L-Asp(OAll)-OH

Fmoc-L-Dpr(Alloc)-OH

Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH

Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH

Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH

Fmoc-Aoa-OH

Manuelle Kupplungen mit einem Reagenzienüberschuss von einem Äquivalent wurden für die folgenden Synthesebausteine durchgeführt:

Fmoc-L-Asn(Trt)-L-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH

Fmoc-L-Ile-L-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH

Fmoc-L-Asn(Ac₃AcNH- β -Glc)-OH

Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH

Wurde für die Synthese das Isoacyldipeptid Boc-Ser(Fmoc-Asn(Trt))-OH eingesetzt, musste darauf geachtet werden, die verstärkte Bildung eines Diketopiperazin-Nebenproduktes zu vermeiden, welches eine weitere Elongation des Peptids verhindern würde. Darum wurde die

Fmoc-Abspaltung und anschließende Acylierung möglichst schnell durchgeführt, um derartigen Nebenreaktionen wenig Zeit zu geben.

Tab. 4 Syntheseprotokoll zur Kupplung der zweiten Aminosäure nach dem Isoacyldipeptid

Schritt	Beschreibung	Zeit	Wiederholungen	Volumen [μL]	Reagenzien (gelöst in)
1	Fmoc-Entschützung	10 s	1	1000	20 % (v/v) DBU (DMF)
	Neutralisation	30 s	1	1000	0,2 M HOBt*H ₂ O (DMF)
	Waschen	30 s	4	800	DMF
2	Acylierung	1440 min	1	500 + x	46 μmol bzw 69 μmol Synthesebaustein (500 μL 0,5 M HOBt*H ₂ O in DMF)
				8,6 bzw. 12,9	DIC
	Waschen	1 min	5	800	DMF
3	Acetylierung	30 min	1	500	33,3 % (v/v) Pyridin und 16,7 % (v/v) Ac ₂ O (DMF)
	Waschen	1 min	5	800	DMF

5.2.1.1.4 N-terminale Modifikationen

Da die Sequenzabschnitte des gp120 in den Komplexkristallstrukturen auch keine primären α-Aminofunktionen besitzen, wurden die synthetisierten Peptide in der Regel N-terminal acetyliert oder es wurde eine Markierung mit Biotin durchgeführt, um die Peptide in direkten ELISAs detektieren zu können. Um eine gute Zugänglichkeit für Antikörper oder Streptavidin zu gewährleisten, wurde zwischen der eigentlichen Aminosäuresequenz und dem einzuführenden Biotin stets eine ε-Aminohexansäure als Abstandshalter eingefügt.

Tab. 5 Syntheseprotokoll der manuellen n-terminalen Acetylierung

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μL]	Reagenzien (gelöst in)
1	Fmoc-Entschützung	5	1	500	20 % (v/v) Piperidin (DMF)
	Fmoc-Entschützung	15	1	500	20 % Piperidin (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF
2	Acetylierung	30	1	500	33,3 % (v/v) Pyridin und 16,7 % (v/v) Ac ₂ O (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF

Die Durchführung der Biotinylierung unterscheidet sich geringfügig von der üblichen Vorgehensweise, da Biotin nur schlecht in DMF löslich ist und eine Suspension nicht durch die Fritte im Reaktor aufgezogen werden kann. Deshalb wurde das Biotin ungelöst von oben

in den Reaktor gegeben, eine DIC/HOBt*H₂O-Lösung aufgezogen und anschließend kräftig geschüttelt, um das Biotin fein zu suspendieren.

Tab. 6 Syntheseprotokoll der manuellen n-terminalen Biotinylierung

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μL]	Reagenzien (gelöst in)
1	Fmoc-Entschützung	5	1	500	20 % (v/v) Piperidin (DMF)
	Fmoc-Entschützung	15	1	500	20 % Piperidin (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF
2	Biotinylierung	1440	1		69 μmol Biotin
				500	12,9 μL DIC (487,1 μL DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF

5.2.1.1.5 Cyclisierung via Lactambrücke

Für die Darstellung von Peptiden, welche durch Knüpfung einer Amidbindung zyklisiert sind, wurden die seitenkettengeschützten Aminosäurebausteine Fmoc-L-Asp(OAll)-OH und Fmoc-L-Dpr(Alloc)-OH eingesetzt. Dabei wurde stets zunächst das L-Dpr(Alloc) in das wachsende Peptid eingebracht und in einem späteren Zyklus das L-Asp(OAll). Sobald beide Aminosäuren eingebracht waren, wurden die orthogonalen Seitenkettenschutzgruppen entfernt und die Lactambrücke geknüpft (siehe Tab. 7). Erst anschließend wurde die Verlängerung des Peptidrückgrats fortgesetzt. Da die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen Pd(0) katalysiert abläuft, wurde das Lösemittel DMF mit Hilfe von Argon weitgehend von Sauerstoff befreit, indem man für 15 min Argon feinverteilt durch das DMF perlen ließ. Der Reaktor wurde für die Dauer der Abspaltungsreaktion in Alufolie verpackt, um eine Bestrahlung des Reaktionsgemisches mit Licht zu vermeiden.

Tab. 7 Syntheseprotokoll zur Seitenkettenentschützung und Knüpfung einer Lactambrücke

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μL]	Reagenzien (gelöst in)
1	OAll/Alloc-Entschützung	180	1	1400 + x	12 mg Pd(PPh ₃) ₄ und 18 mg 1,3-Dimethylbarbitursäure (1400 μL O ₂ -freies DMF)
	Waschen	1	2	500	DCM
	Waschen	1	2	800	DMF
	Waschen	1	6	800	0,5 % (w/v) N,N-Diethyldithiocarbamid-säure Na-Salz * 3 H ₂ O (DMF)
	Waschen	1	3	800	DMF
	Waschen	1	2	800	DCM
2	Zyklisierung	1440	1	800 + x	352 mg HOBt*H ₂ O 358,3 μL DIC (800 μL DMF)
	Waschen	2	5	800	DMF

5.2.1.1.6 Abspaltung der Acetylschutzgruppen des N-Acetylglucosamin / Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe

Da die Acetyl-Seitenkettenschutzgruppen des N-acetylglucosaminhaltigen Synthesebausteins Fmoc-L-Asn(Ac₃AcNH-β-Glc)-OH nicht bei der präparativen Gesamtabspaltung entfernt worden wären, wurde die Abspaltung der Acetylschutzgruppen vor der präparativen Gesamtabspaltung mit Hydrazin durchgeführt (siehe Tab. 8).

Der orthogonal geschützte Synthesebaustein Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH wurde zum Aufbau verzweigter Peptide verwendet. Auch seine Seitenkettenschutzgruppe kann nach demselben Protokoll selektiv mit Hydrazin entschützt werden und somit nach N-terminaler Markierung oder Acetylierung eine weitere Aminofunktion freilegen, an welcher die Synthese bzw. Elongation des Peptids fortgesetzt werden kann.

Tab. 8 Syntheseprotokoll zur Acetylschutzgruppenabspaltung des N-Acetylglucosamin und der ivDde-Schutzgruppenabspaltung

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μL]	Reagenzien (gelöst in)
1	Deacetylierung	8	20	500	5% (v/v) H ₂ NNH ₂ *H ₂ O (DMF)
	Waschen	1	5	800	DMF

5.2.1.1.7 Probeabspaltung

Der Syntheseverlauf wurde bis zur präparativen Abspaltung des Peptids regelmäßig überprüft. Hierzu wurden wenige Harzkügelchen aus dem Reaktor entnommen und für 90 Minuten mit einem Gemisch aus 70 Volumenanteilen TFA, 20 Volumenanteilen DCM und je 5 Volumenanteilen Triisopropylsilan und H₂O behandelt. Die Suspension wurde im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand mit einem Gemisch aus gleichen Volumenteilen MeCN und H₂O aufgenommen, welches mit 0,1% TFA angesäuert wurde. Die Probe wurde bei 2600 g mit der Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert und der Überstand per HPLC/MS vermessen.

5.2.1.1.8 Präparative Gesamtabspaltung

Die Abspaltung der Peptide von der festen Phase erfolgte sauer mit TFA. Dabei werden simultan die Seitenkettenschutzgruppen des abgespaltenen Peptids entfernt und es treten reaktive Intermediate auf, welche von sogenannten *Scavengers* (engl., Aasfresser) abgefangen werden müssen, um ungewünschte Reaktionen am entschützten Peptid zu vermeiden. Deshalb wurde zur Abspaltung das Gemisch "Reagenz K" verwendet, welches zusätzlich mit Triisopropylsilan versetzt wurde. Die Peptide sind nach der Behandlung des Harzes darin gelöst.

Tab. 9 präparatives Abspaltungsprotokoll

Schritt	Beschreibung	Zeit [min]	Wiederholungen	Volumen [μ L]	Reagenzien (gelöst in)
1	Abspaltung / Entschützung	180	1	1500	81,5 % (v/v) TFA, 5 % (v/v) Thioanisol, 5 % (w/v) Phenol, 5 % (v/v) H ₂ O, 2,5 % (v/v) 1,2-Ethandithiol, 1 % (v/v) Triisopropylsilan
	Abspaltung / Entschützung	60	1	1000	81,5 % (v/v) TFA, 5 % (v/v) Thioanisol, 5 % (w/v) Phenol, 5 % (v/v) H ₂ O, 2,5 % (v/v) 1,2-Ethandithiol, 1 % (v/v) Triisopropylsilan

Die so erhaltenen Peptidlösungen wurden in 10 mL eines Gemisches aus gleichen Volumenanteilen Cyclohexan und MTBE gefällt, welches auf -20 °C vorgekühlt wurde. Das Gemisch wurde mit 10 mL H₂O extrahiert, bei 700 g zentrifugiert, die Etherphase abgetrennt und die Wasserphase nach dem Einfrieren bei -80 °C bei 0,1 mbar lyophilisiert. Das so erhaltene Rohpeptid wurde noch zwei weitere Mal aus je 10 mL eines Gemisches aus gleichen Volumenteilen MeCN und H₂O lyophilisiert, welches mit 0,1% (v/v) TFA angesäuert wurde.

5.2.1.2 Reaktionen in Lösung

5.2.1.2.1 Zyklisierung mittels Oxidation zum Disulfid

Die Zyklisierung zum Disulfid erfolgte unter basischer Katalyse mit Hilfe von Luftsauerstoff. Peptide, zu deren Synthese Isoacyldipeptide verwendet wurden, lagerten sich dabei durch N,O-Acyl-Wanderungen in Peptide um, die nur noch Amidbindungen enthielten. Das Edukt, egal ob Rohpeptid oder bereits gereinigtes Peptid, wurde zu 0,3 mg/mL in einem 0,1 M NH₄OAc-Puffer gelöst, welcher zu gleichen Volumenanteilen aus MeCN und H₂O bestand und mit NH₃ auf pH 8,0 eingestellt wurde. Die Peptidkonzentration war mit 0,3 mg/mL gering gewählt, um die intramolekulare Reaktion gegenüber der intermolekularen Reaktion zu bevorzugen. Der Oxidationsreaktion wurde drei Tage Zeit gegeben. Währenddessen wurde das ansonsten abgeschlossene Reaktionsgefäß drei bis vier Mal belüftet. Das Volumen des Gefäßes wurde so gewählt, dass es maximal bis zur Hälfte befüllt wurde. Der Reaktionsverlauf wurde mit Hilfe des Ellmans-Tests kontrolliert, indem Proben zu Beginn der Oxidation sowie nach drei Tagen genommen und nach Umsetzung mit DTNB photometrisch verglichen wurden. Konnte mit bloßem Auge vor der Oxidation noch eine deutliche Gelbfärbung erkannt werden, war diese nach vollendeter Oxidation nicht mehr zu beobachten. Nun wurde die Reaktion durch ansäuern gestoppt, indem das Volumen der

Probe mit 25% (v/v) AcOH (aq) auf das 1,5-fache erhöht wurde. Die Probe wurde schließlich bei -80 °C eingefroren und bei 0,1 mbar lyophilisiert. Der Rückstand wurde noch zwei weitere Male aus 10 mL eines Gemisches aus gleichen Volumenteilen MeCN und H₂O lyophilisiert, welches mit 0,1% (v/v) TFA angesäuert wurde.

5.2.1.2.2 Peptidreinigung mittels semipräparativer HPLC

Die Aufreinigung der Rohpeptide geschah mittels HPLC. Dabei wurden die Rohpeptide in 1 mL Eisessig gelöst und auf einer RP18-Säule mit Vorsäule gereinigt. Hierzu wurden binäre, lineare Gradienten aus H₂O und MeCN verwendet, wobei beide Laufmittel 0,1 % (v/v) TFA enthielten. Die verschiedenen HPLC-Läufe zur Reinigung unterschieden sich in Anfangskonzentration, Steigung und Dauer des Gradienten und sie wurden für jedes Peptid einzeln angepasst. Die verwendeten Gradienten können, wie in Tab. 10 dargestellt, zusammengefasst werden und beinhalten einen Waschschrift der Säule bei 95 % MeCN und die Rekonditionierung auf die Startbedingungen. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen, wobei die Vorlage jede Minute gewechselt wurde und die Extinktion bei 214 nm mit einem UV-Detektor aufgezeichnet wurde. Fraktionen, welche dem Produktpeak zuzuordnen waren, wurden per HPLC/MS identifiziert. Die sauberen bzw. saubersten Fraktionen wurden vereint.

Tab. 10 zeitlicher Ablauf eines präparativen HPLC-Laufes

Dauer [min]	Laufmittelzusammensetzung
5	Startbedingung
t	Startbedingung linear auf Endbedingung
5	Endbedingung linear auf 95 % MeCN
10	95 % MeCN
5	95 % MeCN linear auf Startbedingung
10	Startbedingung

Die verwendeten Gradienten werden in Abschnitt 5.2.1.4 in folgendem Format angegeben: "HPLC: (Startbedingung) - (Endbedingung) % in (t) min", wobei für Start- und Endbedingung der Volumenanteil des MeCN in Prozent angegeben wird, z. B. HPLC: 30 - 50 % in 40 min. Die Tatsache, dass das Laufmittel auch TFA enthielt, wird bei der Angabe vernachlässigt.

Falls die Reinheit des Peptids nach der ersten Reinigung oder nach der Oxidation zum Disulfid unzureichend war, wurde es erneut gereinigt. Die Reinigung der Rohpeptide erfolgte auf einer Dr. Maisch Reprosil Säule bei einem Fluss von 9 mL/min. War eine zweite Reinigung erforderlich, wurde diese auf einer Phenomenex Kinetex Säule bei einem Fluss von 3 mL/min durchgeführt.

5.2.1.3 Analytik

5.2.1.3.1 HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie

Die HPLC/MS-Analytik wurde zum einen für die Endanalytik der synthetisierten Peptide verwendet, zum anderen zur Kontrolle des Reaktionsverlaufes während der Synthese der verschiedenen Peptide. Dabei konnte zu jedem Zeitpunkt das Produkt im Chromatogramm mit Hilfe der Massenspur identifiziert werden. Dabei wurden die Peptide zunächst chromatographisch getrennt und durch die Kupplung der HPLC an das ESI-Massenspektrometer konnten die Peaks des Chromatogramms über die entsprechenden festgestellten Molekülonen einer Verbindung zugeordnet werden. Zur Auftrennung der Proben wurden die binären Gradienten aus MeCN und H₂O, welche beide 0,1 % TFA enthielten, der Fragestellung angepasst, welcher mittels der HPLC/MS-Analytik beantwortet werden sollte. Zur Prozesskontrolle wurde ein Gradient verwendet, welcher in 10 min linear von 5 % MeCN + 0,1 % TFA auf 95 % MeCN + 0,1 % TFA gesteigert wurde. Für die Endanalytik der Peptide wurde ein Gradient verwendet, der für die Erhöhung auf 95 % MeCN + 0,1 % TFA eine Dauer von 15 min benötigte. Auch die Analytik und die Identifikation der produkthaltigen Fraktionen, die bei der präparativen HPLC aufgefangen wurden, erfolgte mittels HPLC/MS. Hierzu wurde ein Gradient verwendet, welcher für die gleiche Steigerung des MeCN-Anteils im Laufmittel nur 5 min benötigte (Tab. 10).

Tab. 11 benutzte Gradienten bei der HPLC/MS-Analytik und deren Verwendungszweck

Verwendungszweck	Zeitpunkte [min]	Laufmittelzusammensetzung
Fraktionsanalytik	0	5 % MeCN
	0 - 5	Linear auf 95 % MeCN
	5 - 7	95 % MeCN
	7 - 8	Linear auf 5 % MeCN
	8 - 10	5 % MeCN
Prozesskontrolle	0	5 % MeCN
	0 - 10	Linear auf 95 % MeCN
	10 - 12	95 % MeCN
	12 - 13	Linear auf 5 % MeCN
	13 - 15	5 % MeCN
Endanalytik	0	5 % MeCN
	0 - 15	Linear auf 95 % MeCN
	15 - 17	95 % MeCN
	17 - 18	Linear auf 5 % MeCN
	18 - 20	5 % MeCN

Die Endanalytik der verschiedenen Peptide ist im Anhang gezeigt.

5.2.1.3.2 Ellmans Test

Der Ellmans Test dient der Detektion von freien Thiolen und wurde deshalb verwendet, um den Verlauf der Oxidation zu Disulfiden zu überprüfen und die Verfügbarkeit von Thiolen für weitere Reaktionen wie beispielsweise mit Maleimido-Funktionen sicherzustellen. In einer

UV-Küvette wurden 325 µL H₂O, 50 µL 1M Tris (aq) pH 8,0 und 25 µL 2 mM DTNB in 50 mM NaOAc vorgelegt, 100 µL der zu vermessenen Peptidlösung mit einer Konzentration von 0,3 mg/mL zugegeben, die Lösung gut gemischt und nach 5 Minuten Inkubation bei 412 nm im Nanophotometer vermessen. Die Hintergrundmessung wurde ohne Peptid durchgeführt.

5.2.1.4 Durchführung der Synthese und Aufarbeitung der konkreten Peptide

Die im Folgenden aufgezeigten Peptide wurden vom C- zum N-Terminus hin automatisiert aufgebaut. Die fett gedruckten Aminosäuren wurden mit den oben beschriebenen, nicht automatisierten Methoden eingebracht.

Zunächst werden der Name des Peptids und die zugehörige Sequenz gezeigt. Unter dem Stichpunkt **S** werden die einzelnen Schritte genannt, die zur **S**ynthese eingesetzt wurden. Dabei sind nur die manuell durchgeführten Schritte beschrieben, die automatisierte Verlängerung der Peptide geschieht nach dem in Tab. 2 gezeigten Syntheseprotokoll mit Hilfe des Syntheseroboters. Unter dem Stichpunkt **A/M** sind die aufeinanderfolgenden Schritte zur **A**ufarbeitung und **M**odifikation der Peptide nach der Abspaltung vom Harz beschrieben. Unter **P** findet man Informationen zum **P**rodukt, wie die Retentionszeit bei der HPLC/MS, die Ausbeute der Synthese und die molare Masse **M** des Peptids und des entsprechenden TFA-Salzes in Klammern.

CD4bs-M und zugeordnete Peptide:

CD4bs-M Ac-SGGDPEIVT-Ahx-**Lys**(Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTR**DGGN**-NH₂

S: Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Acetylierung, ivDde-Abspaltung, Acetylierung

A/M: HPLC: 25 - 45 % in 40 min

P: Retentionszeit: 7,27 min ; Ausbeute: 11,0 %; M = 3409,0 g/mol (3637,0 g/mol)

CD4bs-M-Bio Ac-SGGDPEIVT-Ahx-**Lys**(Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTR**DGGNXGX-Lys(Bio)**-NH₂

S: Fmoc-L-Lys(Bio), Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Acetylierung, ivDde-Abspaltung, Acetylierung

A/M: HPLC: 20 - 60 % in 40 min

P: Retentionszeit: 7,24 min ; Ausbeute: 12,5 %; M = 4047,8 g/mol (4275,8 g/mol)

CD4bs-M-Cys Ac-SGGDPEIVT-Ahx-**Lys**(Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGNXXGX-Cys(H)-NH₂

S: Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Acetylierung, ivDde-Abspaltung, Acetylierung

A/M: HPLC: 20 - 60 % in 40 min

P: Retentionszeit: 7,24 min ; Ausbeute: 9,2 %; M = 3796,5 g/mol (4024,5 g/mol)

CD4bs-M(4xAla) Ac-SGGAPAIVT-Ahx-**Lys**(Ac-INMAQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRAGGN-NH₂

S: Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Acetylierung, ivDde-Abspaltung, Acetylierung

A/M: HPLC: 25 - 45 % in 40 min

P: Retentionszeit: 7,27 min ; Ausbeute: 14,6 %; M = 3147,8 g/mol (3375,8 g/mol)

CD4bl(Ac) Ac-SGGDPEIVT-NH₂

S: Acetylierung

A/M: HPLC: 10 - 40 % in 60 min

P: Retentionszeit: 4,83 min ; Ausbeute: 66 %; M = 915,0 g/mol

β23 Ac-LTRDGGN-NH₂

S: Acetylierung

A/M: HPLC: 10 - 30 % in 40 min

P: Retentionszeit: 4,04 min ; Ausbeute: 66 %; M = 772,8 g/mol (886,8 g/mol)

β20-β21 Ac-INMWQEVGKA-NH₂

S: Acetylierung

A/M: HPLC: 25-40 % in 45 min

P: Retentionszeit: 6,97 min ; Ausbeute: 66 %; M = 1216,4 g/mol (1330,4 g/mol)

b12epi-M und zugeordnete Peptide

b12epi-M(JRFL) Ac-SGGDPEIVMHSFNSGGEFFYCNSAQLFNSTWNNN
TEGSNNTEGNTITLPCRIK-NH₂

S: Acetylierung

A/M: HPLC: 25-40 % in 40 min, Oxidation, HPLC: 25-40 % in 40 min

P: Retentionszeit: 8,60 min ; Ausbeute: 0,7 %; M = 5841,3 g/mol (6069,3 g/mol)

b12epi-M(Ac) Ac-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

Variante 1

S: Fmoc-L-Asn(Trt)-L-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-L-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, Acetylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 60 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,60 min ; Ausbeute: 2,8 %; M = 4230,8 g/mol (4344,8 g/mol)

Variante 2

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Acetylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 60 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,60 min ; Ausbeute: 12,9 %; M = 4230,8 g/mol (4344,8 g/mol)

b12epi-M Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 40 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,60 min ; Ausbeute: 9,4 %; M = 4528,3 g/mol (4642,3 g/mol)

b12epi-M(scr) Biotin-Ahx-IQYLVGSGLPFDHWRT**ANS**ICGEN**STG**-Ahx-G-Ahx-FIFTECFP-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 55 % in 100 min, Oxidation, HPLC: 35 - 50 % in 45 min

P: Retentionszeit: 8,97 min ; Ausbeute: 2,7 %; M = 4528,3 g/mol (4642,3 g/mol)

b12epi-M-Cys(lac) Ac-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFY-**[Asp-NSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLP-Dpr]**-RI-Ahx-G-Ahx-Cys(H)-NH₂

S: Fmoc-L-Dpr(Alloc)-OH; Fmoc-L-Asp(OAll)-OH, Allyl-/Alloc-Abspaltung, Zyklisierung, Fmoc-L-Asn(Trt)-L-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, Acetylierung

A/M: HPLC: 30 - 50 % in 40 min

P: Retentionszeit: 8,34 min ; Ausbeute: 1,9 %; M = 4596,2 g/mol (4710,2 g/mol)

b12epi-M(lin) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFY**SNS**AQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPSRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 25 - 45 % in 40 min, Umlagerung

P: Retentionszeit: 8,37 min ; Ausbeute: 4,3 %; M = 4498,1 g/mol (4612,1 g/mol)

CD4bl Biotin-Ahx-SGGDPEIVTH-NH₂

S: Biotinylierung

A/M: HPLC: 10 - 30 % in 40 min

P: Retentionszeit: 5,77 min ; Ausbeute: 66,8 %; M = 1349,5 g/mol

V4loop-Stamm Biotin-Ahx-CNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Biotinylierung

A/M: HPLC: 25 - 45 % in 40 min, Oxidation, HPLC: 25 -50 % in 50 min

P: Retentionszeit: 7,81 min ; Ausbeute: 10 %; M = 2299,9 g/mol (2413,9 g/mol)

b12epi-M(ΔCD4bl) Biotin-Ahx-WF**NS**GGEFFY**CNS**AQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 35 - 55 % in 40 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,26 min ; Ausbeute: 12,4 %; M = 3535,2 g/mol (3649,2 g/mol)

b12epi-M(ΔV4loop) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFY-NH₂

S: Biotinylierung

A/M: HPLC: 25 - 45 % in 40 min

P: Retentionszeit: 8,06 min ; Ausbeute: 19,4 %; M = 2584,9 g/mol

b12epi-M(P->A) Biotin-Ahx-SGGDAEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 25 - 45 % in 40 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,72 min ; Ausbeute: 3,7 %; M = 4502,2 g/mol (4616,2 g/mol)

b12epi-M(ALM) Biotin-Ahx-SGGDAELVMHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 40 min, Oxidation, 30 - 50 % in 40 min

P: Retentionszeit: 8,93 min ; Ausbeute: 2,7 %; M = 4532,3 g/mol (4646,3 g/mol)

b12epi-M(NAcGlc) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**N(NAcGlc)**SAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Fmoc-L-Asn(Ac₃AcNH-β-Glc)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-L-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-OH, Biotinylierung, Deacetylierung

A/M: Oxidation, HPLC: 30 - 50 % in 40 min

P: Retentionszeit: 8,40 min ; Ausbeute: 6,7 %; M = 4732,5 g/mol (4846,5 g/mol)

Bio-b12epi-M(XPX) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Ahx-P-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 45 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,79 min ; Ausbeute: 10,0 %; M = 4568,4 g/mol (4682,4 g/mol)

Bio-b12epi-M(XSX) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Ahx-S-Ahx-TITLPCRI-NH₂

S: Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 45 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,62 min ; Ausbeute: 7,8 %; M = 4558,3 g/mol (4672,3 g/mol)

Bio-b12epi-M(OGO) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Aoa-G-Aoa-TITLPCRI-NH₂

S: Fmoc-Aoa-OH, Fmoc-Aoa-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 45 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,58 min ; Ausbeute: 5,8 %; M = 4592,3 g/mol (4706,3 g/mol)

Bio-b12epi-M(OPO) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Aoa-P-Aoa-TITLPCRI-NH₂

S: Fmoc-Aoa-OH, Fmoc-Aoa-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 45 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,63 min ; Ausbeute: 9,8 %; M = 4632,4 g/mol (4746,4 g/mol)

Bio-b12epi-M(OSO) Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWF**NS**GGEFFYC**NS**AQLF-Aoa-S-Aoa-TITLPCRI-NH₂

S: Fmoc-Aoa-OH, Fmoc-Aoa-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Boc-L-Ser(Fmoc-L-Asn(Trt))-OH, Biotinylierung

A/M: HPLC: 30 - 45 % in 45 min, Oxidation

P: Retentionszeit: 8,53 min ; Ausbeute: 9,6 %; M = 4622,3 g/mol (4736,3 g/mol)

ef-c H-QCKIKQIINMW**Q**-OH

S: Beladung Wang Harz mit Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Abspaltung

A/M: HPLC: 25 - 40 % in 45 min

P: Retentionszeit: 8,97 min ; Ausbeute: 29,2 %; M = 1532,9 g/mol (1875,0 g/mol)

5.2.2 Immunisierungen

5.2.2.1 Peptid-Protein Konjugationen

Für Immunisierungsversuche mit Mäusen und Kaninchen wurden die synthetisch hergestellten Peptide an sehr immunogene Proteine gekuppelt. Zur Kupplung wurden die thiolhaltigen Peptide mit maleimidofunktionalisierten Proteinen zu Thioethern umgesetzt.

Für **CD4bs-M-Cys** wurde das Trägerprotein mcKLH (Schlitzschnecken-Hämocyanin) der Firma Thermo Scientific verwendet, welches als Kit vertrieben wird (Kat# 77666). Die Kupplung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 2 mg mcKLH mit 200 µL hochreinem Wasser rekonditioniert und 2 mg CD4bs-M-Cys in 200 µL Konjugationspuffer (83 mM Natriumphosphat, 0,1 M EDTA, 0,9 M NaCl, 0,1 M Sorbit und 0,02 % Natriumazid; pH 7,2) gelöst, welchem 60 % (v/v) DMSO zugesetzt wurde. Beide Lösungen wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vereint und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Die Entsalzung erfolgte ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurden 0,84 g Salzgemisch mit 30 % DMSO in Wasser gelöst, um eine Lösung mit 83 mM Natriumphosphat, 0,9 M NaCl und 0,1 M Sorbit bei pH 7,2 zu ergeben. Die Zeba™ Spin Entsalzungssäule wurde bei 1000 g für 2 min in einem konischen Zentrifugenröhrchen mit 15 mL Fassungsvermögen zentrifugiert und die Säule durch dreimaliges Hinzufügen von je 1 mL Entsalzungspuffer und anschließender Zentrifugation bei 1000 g für 2 min konditioniert. Nach dem Auftragen der 400 µL Reaktionslösung auf die Entsalzungssäule wurde in einem frischen, konischen Zentrifugenröhrchen durch Zentrifugation bei 1000 g für 2 min die Probe aufgefangen. Bis zur Immunisierung wurde das Konjugat in Lösung bei -20 °C gelagert.

Zur Konjugation des **b12epi-M-Cys(lac)** wurde die gleiche Chemie verwendet, allerdings wurde die Konjugation an LPH vorgenommen und von der Firma BioGenes ausgeführt, welche auch die Immunisierung der Kaninchen durchführte.

5.2.2.2 Maus-Immunisierung

Die Immunisierung der Maus wurde jeweils mit 200 µL eines **CD4bs-M-Cys**-mcKLH-Konjugats mit einer Konzentration von ca. 100 µg/mL von Prof. Dr. Thomas Winkler im Nikolaus-Fiebiger-Zentrum in Erlangen durchgeführt. Dazu wurden 4 µL der nach der Entsalzung aufgefangenen Probe durch Zugabe von 196 µL PBS pH 7,4 verdünnt und anschließend nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe von zwei Spritzen und einem 3-Wege-Hahn mit 200 µL des kompletten Freund-Adjuvans (KFA) emulgiert und in den Bauchraum der Maus injiziert. Zum Auffrischen wurde der Vorgang nach zwei Wochen mit inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) statt KFA wiederholt. Die Blutentnahme erfolgte retrobulbär, d.h. durch Punktierung am Auge, vor und zwei Wochen nach der Auffrischungs-Injektion. Das erhaltene Blut wurde durch Zentrifugation bei 6000 g für zwei Minuten in einem Microtainer Gel-Röhrchen von Blutzellen getrennt und bis zur Verwendung aliquotiert bei -80 °C gelagert.

5.2.2.3 Kaninchen-Immunisierung

Die Immunisierung des Kaninchens erfolgte bei der Firma BioGenes. Das b12epi-M(lac)-Cys-LPH Konjugat wurde mit KFA immunisiert, nach jeweils zwei Wochen wurde die Immunisierung mit IFA zweimal aufgefrischt. Weitere 4 Wochen später wurde die Immunisierung erneut aufgefrischt, um das Kaninchen nach einer weiteren Woche ausbluten zu lassen und das Serum zu gewinnen. Das erhaltene Serum (45 mL) wurde in 500 µL Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

5.2.2.4 Gewinnung von Hybridomen und monoklonalen Maus-Antikörpern

Zwei Wochen nach der Auffrischungsinjektion wurden 20 µL des verdünnten CD4bs-M-mcKLH-Konjugats durch Prof. Dr. Thomas Winkler intravenös injiziert und die Maus vier Tage später mit CO₂ betäubt und getötet. Die Milz wurde entnommen und mit Hilfe eines feinen, ausgeglühten Metallsiebs und dem Stempel einer Polypropylenspritze in R0 Medium suspendiert. Die zur Fusion benötigten und in R10 Medium angezüchteten SP2/0-Zellen wurden mit einem Zellkratzer von der Kulturflasche gelöst. Die Milzzellen wurden ein Mal durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 260 g für 10 min und anschließender Resuspension in 25 mL R0 Medium gewaschen. Die SP2/0-Zellen wurden auf diese Weise zwei Mal gewaschen. Beide Zellsuspensionen wurden vereint und erneut gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet durch vorsichtiges Ziehen des konischen Zentrifugenrohrs über die Lüftungslöcher der Arbeitsfläche der Sterilbank gelockert. Anschließend wurden unter ständigem Drehen des Zentrifugenrohrs in der Hand 2 mL 50% (w/v) Polyethylenglykol 1500-Lösung, welche auf 37 °C temperiert wurde, langsam über einen Zeitraum von 1 min zugegeben. Nach 90 s Inkubation wurden insgesamt 25 mL serumfreies RPMI 1640 Medium, welches ebenfalls auf 37 °C temperiert wurde, über einen Zeitraum von 6 min zugegeben, wobei in der ersten Minute 2 mL, über die folgenden drei Minuten 6 mL und über die letzten 2 Minuten 17 mL zugegeben wurden.

Nach Zentrifugation der Zellen bei 37 °C und 180 g für 10 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 mL temperiertem HAT-Medium suspendiert. Die Suspension wurde in 3 verschiedenen Verdünnungen auf jeweils 10 Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen ausplattiert indem 1 mL, 3 mL und 6 mL zu jeweils 200 µL temperiertem HAT-Medium gegeben wurden und davon jeweils 200 µL in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten übertragen wurden. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 10 Tagen wurden je 100 µL Überstand abgenommen und mittels eines direkten ELISAs auf Bindung der sezernierten Antikörper an CD4bs-M getestet. Interessante Hybridome wurden in Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen in 2 mL HT-Medium weiter kultiviert. Dazu wurden die Zellen in dem Restvolumen HAT-Medium suspendiert und

übertragen. Nach weiteren 10 Tagen wurden die Hybridome dann in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen übertragen, indem die Zellen nach Abnehmen des Überstandes in den verbleibenden 500 µL HT-Medium suspendiert wurden und in 4 mL frisches HT-Medium gegeben wurden.

Die Reinigung der IgG-Antikörper erfolgte mit Hilfe von immobilisiertem Protein G plus nach den Angaben des Herstellers. Dazu wurde 1 mL der aufgeschlammten Sepharose-Kügelchen, auf welchen das Protein G plus immobilisiert worden war, in eine 2 mL-Polystyrolsäule überführt, welche zuvor mit einer Fritte versehen wurde und zur Hälfte blasenfrei mit PBS befüllt worden war. Nachdem man der Agarose 30 Minuten Zeit gegeben hatte um sich abzusetzen, wurde der untere Verschluss der Säule entfernt und überschüssiger Puffer abgelassen. Das Säulenbett wurde mit 5 mL PBS gewaschen, welches gleichmäßig über die Säulenwandung aufgegeben wurde. Auf die so vorbereitete Protein G plus-Säule wurden 0,5 mL Hybridomüberstand vorsichtig aufgetragen und die Säule nach Einsickern des Probevolumens in das Säulenbett 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, indem der untere Verschluss wieder aufgesetzt wurde. Vor der Elution der Antikörper mit 2,5 mL 0,1 M Glycin*HCl(aq) pH 2,5 wurde das Säulenbett mit 7,5 mL PBS gewaschen. Die Elution erfolgte durch Auftragen des Glycin-Puffers und Auffangen des Eluats zu je 0,5 mL. Die aufgefangenen fünf Fraktionen wurden durch Zugabe von 50 µL 1 M Phosphatpuffer pH 8,0 neutralisiert. Die erste und letzte aufgefangene Fraktion wurden verworfen, die übrigen 3 in einem Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfilter mit einer Durchlässigkeit für Moleküle <10 kDa nacheinander durch Zentrifugation bei 13000 g für 10 Minuten gemeinsam aufkonzentriert. Das erhaltene Konzentrat wurde durch dreimalige Zugabe von 0,5 mL PBS und anschließender Zentrifugation umgepuffert. Die Konzentration wurde per UV-Messung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz

$$(1) \text{ Extinktion } E = \varepsilon \times c \times d$$

bestimmt, wobei E der gemessenen Absorption, ε dem molaren Extinktionskoeffizienten (IgG: $\varepsilon = 210000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und d der Schichtdicke entspricht. Für die Antikörper wurde eine molare Masse von 150000 g M^{-1} angenommen.

5.2.3 Testung der Peptide und Antikörper bzw. Seren

5.2.3.1 Thioflavin T (ThT) Bindungsassay

Die Bestimmung der ThT-Fluoreszenzverstärkung der verschiedenen Peptide erfolgte in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, welchem 16 µg ThT pro mL Puffer zugesetzt wurde. Dazu wurde eine 0,8 mg/mL ThT Stammlösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, welche durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert wurde, vor der Verwendung 1:50 mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt und erneut filtriert. Die Stammlösung wurde bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

Die Peptide wurden am Tecan Infinite Reader F-200 in schwarzen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen von Greiner Bio One vermessen. Dabei kam ein Anregungsfilter für eine Wellenlänge von 440 nm und einer Bandbreite von 20 nm zum Einsatz, sowie ein Emissionsfilter für 485 nm, welcher ebenfalls eine Bandbreite von 20 nm besaß. In der Mikrotiterplatte wurden je 148,5 µL der 16 µg/mL ThT Lösung vorgelegt und je 1,5 µL der 2,5 mM Stammlösungen der Peptide zugegeben. Es wurden Fünffachbestimmungen durchgeführt. In den Diagrammen werden die Mittelwerte und deren Standardabweichung gezeigt.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wurden 4 µL der 2,5 mM Stammlösungen der einzelnen Peptide zu 396 µL der 16 µg/mL Thioflavin T Lösung in eine Fluoreszenzküvette gegeben, mit einer Pipette gut gemischt und bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm (Spaltbreite 5 nm) im Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer vermessen. Dabei wurde ein Emissionsspektrum von 470 nm - 590 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm aufgenommen. Nach einer Fünffachbestimmung wurden die Daten gemittelt.

5.2.3.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Edina Lump nahm die TEM-Bilder im Institut für Molekulare Virologie der Universität Ulm auf.

Zur Aufnahme der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder wurden 7 µL der Probe mit einer Peptidkonzentration von 1 mg/mL auf Kupfergrids aufgetragen, welche mit Kohlenstoff oder Formvar beschichtet waren. Nach 1 min wurde die Lösung mit einem Filterpapier vorsichtig abgesaugt und das Grid mit HPW gewaschen. Anschließend wurden 7 µL einer 2 %-igen (w/v) $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{aq})$ zur Negativkontrastierung aufgetragen und nach 1 min das Grid drei Mal mit HPW gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Bilder wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV aufgenommen.

5.2.3.3 Bestimmung des ζ -Potentials

Die Bestimmung des ζ -Potentials wurde von Edina Lump im Institut für Molekulare Virologie der Universität Ulm durchgeführt.

Zur Bestimmung des ζ -Potentials der Peptide wurde zunächst eine Stammlösung der Peptide mit einer Konzentration von 10 mg/mL in DMSO 1:10 mit PBS verdünnt. 50 µL dieser Probe wurden mit 1 mL 0,1 M KCl(aq) gemischt, welches zuvor mit einem 0,2 µm Membran-Spritzenfilter steril filtriert wurde. Die Probe wurde in Einweg-Kapillarzellen überführt und das ζ -Potential als Triplikat im Zeta Nanosizer bestimmt.

5.2.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Die Aufnahmen der fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgten im Institut für Molekulare Virologie der Universität Ulm in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan Münch.

Hierzu wurden 2 μL einer 2,5 mM Peptidstammlösung in DMSO 1:50 mit PBS verdünnt und anschließend mit dem Proteostat Farbstoff aus dem Proteostat Protein Aggreagation Assay Kit von Enzo Life Science nach den Angaben des Herstellers gefärbt. Dazu wurden 2 μL Farbstofflösung nach einer 1:20-Verdünnung mit PBS zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Nach Zugabe von MLV-gag-YFP VLPs wurden die Probe in μ -Slides VI 0.4 übertragen und im Konfokalmikroskop untersucht.

5.2.3.5 SEAP Infektionsassay

Die Infektionsassays mit CEMx174-SEAP-Zellen und HIV-1 NL4-3¹⁵³ wurden von Christina Haußner oder Katja Rödel im S3-Labor des Virologischen Instituts der Friedrich-Alexander Universität durchgeführt.

Die SEAP-Zellen wurden in R10-Medium in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 7% CO₂ gehalten und zwei mal wöchentlich 1:10 passagiert, das heißt bei 180 g zentrifugiert und im frischen R10-Medium resuspendiert. Zur ausschließlichen Selektion der SEAP-exprimierenden Zellen setzte man dem Medium bei jeder Passage 1 % (v/v) Geneticin-Lösung zu. Die SEAP-Zellen wurden ab Passage 5 bis Passage 20 für Infektionsassays verwendet. Dazu bestimmte man zunächst die Zellzahl pro mL mittels Neubaurischer Zählkammer, stellte sie mit R10-Medium auf 250.000 Zellen/mL ein und legte je 100 μL pro Vertiefung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (25.000 Zellen / Vertiefung).

Die zu testenden Analyten (Antikörper, Hybridomüberstände oder Peptide) wurden in einer zweiten Mikrotiterplatte in einer seriellen 1:3 Verdünnung mit R10-Medium vorbereitet. Dabei wurde in der ersten Vertiefung 240 μL der Lösung mit der höchsten Konzentration vorgelegt. Hiervon wurden dann seriell immer 80 μL Lösung in die nächste Vertiefung übertragen, in welcher bereits je 160 μL R10-Medium vorgelegt waren. Jeweils 100 μL jeder Verdünnung wurden in die erste Platte mit den Zellsuspensionen übertragen. Diejenigen Vertiefungen, welche zur Bestimmung von Positiv- und Negativkontrolle benutzt wurden, waren dabei mit je 100 μL R10-Medium befüllt. Allen Vertiefungen, außer denen der Negativkontrolle, wurden 30 μL einer HIV-1(NL4-3)-Suspension mit einer Konzentration von 400 ng/mL p24-Protein zugesetzt, welche für jeden Assay frisch aufgetaut und vor dem Verteilen 1:16,66 mit R10-Medium verdünnt wurde (24 ng/mL p24-Protein). Die Vertiefungen der Negativkontrolle erhielten je 30 μL R10-Medium. In der Regel wurden die Messungen als Triplikate durchgeführt.

Darauf folgte eine Inkubation der Mikrotiterplatte für 72 Stunden bei 37 °C und 7 % CO₂ im Brutschrank. Durch Betrachtung unter dem Mikroskop wurde festgestellt, ob die Zellen nach der Inkubation im Brutschrank in allen Vertiefungen noch vital waren. War dies der Fall, wurde die SEAP-Aktivität in den Überständen jeder einzelnen Vertiefung mit NovaBright™ Secreted Placental Alkaline Phosphatase (SEAP) Enzyme Reporter Gene Chemiluminescent Detection System von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers wie folgt bestimmt.

Zunächst wurde Komponente C 1:5 verdünnt (1-fach Verdünnungspuffer) und davon je 12 µL in weißen Lumineszenz-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen vorgelegt. Hierzu wurden je 12 µL Überstand aus den Vertiefungen der inkubierten Platte übertragen und die Platte 30 min bei 65 °C zur Inaktivierung der Viruspartikel inkubiert. Nach Abkühlen der Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur wurden pro Vertiefung 22 µL der Komponente A (Assaypuffer) zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden je 22 µL der Komponente B (Reaktionspuffer) hinzupipettiert und nach genau 20 min die Platte im Luminometer gemessen.

5.2.3.6 TZM-bl Infektionsassay

Die Infektionsassays mit TZM-bl-Zellen und HIV-1 NL4-3 wurden von Edina Lump im S3-Labor des Instituts für Molekulare Virologie der Universität Ulm durchgeführt.

Die TZM-bl-Zellen wurden in DMEM kultiviert, welchem 10 % FKS, 350 µg/mL L-Glutamin (2,4 mM) und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt wurde (DMEM mit Zusätzen). Sie wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten und zwei mal wöchentlich 1:10 passagiert, das heißt bei 180 g zentrifugiert und im frischen DMEM mit Zusätzen (siehe oben) resuspendiert. Bereits ein Tag vor der Infektion wurden die TZM-bl Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen umgesetzt. Dazu wurde zunächst die Zellzahl pro mL mittels Neubaurischer Zählkammer bestimmt, mit DMEM mit Zusätzen (siehe oben) auf 100.000 Zellen/mL eingestellt und je 100 µL pro Vertiefung in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen vorgelegt (10.000 Zellen / Vertiefung).

Das zu testende Peptid wurde in einer zweiten Mikrotiterplatte in einer seriellen 1:5 Verdünnung mit DMEM mit Zusätzen vorbereitet. Dabei wurde in der ersten Vertiefung 50 µL der Lösung mit der höchsten Konzentration vorgelegt. Hiervon wurden dann seriell immer 10 µL Lösung in die nächste Vertiefung übertragen, in welchen bereits 40 µL DMEM mit Zusätzen vorgelegt waren. Diejenigen Vertiefungen, welche zur Bestimmung von Positiv- und Negativkontrolle benutzt wurden, wurden dabei nur mit DMEM mit Zusätzen befüllt. Den Vertiefungen wurden 40 µL einer HIV-1(NL4-3)-Suspension mit einer Konzentration von 1 ng/mL p24-Protein zugesetzt und sie wurden für 5 min vorinkubiert. Die Vertiefungen der

Negativkontrolle erhielten je 40 µL DMEM mit Zusätzen statt der HIV-1-Suspension. Die Infektion erfolgte durch Übertragen von je 20 µL in die Mikrotiterplatte mit den TZM-bl Zellen, wobei jeder Vertiefung zuvor 80 µL DMEM mit Zusätzen zugefügt wurden. In der Regel wurden die Messungen als Triplikate durchgeführt.

Die Mikrotiterplatte wurde für 72 Stunden bei 37 °C und 7 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, danach wurde die β-Galactosidase-Aktivität unter Verwendung des Gal-Screen™-Substrates wie folgt bestimmt.

Zunächst wurde der Überstand der TZM-bl Zellen aus jeder Vertiefung entfernt und 40 µL des Gal-Screen™-Substrates, welches zuvor 1:8 mit PBS verdünnt wurde, wurde zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden 35 µL des entstandenen Lysats in weiße Lumineszenz-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen übertragen und im Luminometer vermessen.

5.2.3.7 ELISA

Die direkten ELISAs wurden durchgeführt um zu untersuchen, ob zwei Moleküle, in der Regel ein Protein und ein Peptid, aneinander binden. Der kompetitive ELISA wurde verwendet um zu prüfen, ob die Bindung zweier Moleküle, für gewöhnlich Proteine, durch die Zugabe von Peptid inhibiert wird.

5.2.3.7.1 Immobilisierung des ersten Bindungspartners

Hierzu wurde einer der potentiellen Bindungspartner auf einer Sarstedt Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität immobilisiert. Dazu wurden die Vertiefungen mit 100 µL einer Proteinlösung beschichtet, meist b12, welche, ausgehend von einer 100 µg/mL Stammlösung in PBS, mit 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,6 auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt wurde. Diese Beschichtungskonzentrationen der verwendeten Lösungen werden in der Beschriftung der zugehörigen Diagramme genannt. Vertiefungen, in denen die Leerwerte bestimmt wurden, wurden mit reinem Carbonatpuffer behandelt und die Mikrotiterplatte über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte ausgeleert und auf einem Papiertuch ausgeklopft. Die Vertiefungen wurden für 1 h mit einer 1 % (w/v) Lösung BSA in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, anschließend zwei Mal mit einer 0,01 % (w/v) Lösung Tween 20 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 (Waschpuffer) gewaschen und ausgeklopft.

5.2.3.7.2 direkter ELISA: Inkubation mit zweitem Bindungspartner

Der zweite Bindungspartner wurde auf die gewünschte Konzentration mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt, welcher 0,1 % (w/v) BSA und 0,01 % (w/v) Tween 20

enthielt, und zu je 100 μL auf die Vertiefungen verteilt. Wurden konzentrationsabhängige Experimente durchgeführt, wurde der zweite Bindungspartner seriell auf der Platte verdünnt. Nachdem die Platte für 3 h inkubiert worden war, wurde sie vier Mal mit dem Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft.

5.2.3.7.3 kompetitiver ELISA: Inkubation mit potentielltem Kompetitor und zweitem Bindungspartner

Zunächst wird der potentielle Kompetitor mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, welcher 0,1 % (w/v) BSA und 0,01 % (w/v) Tween 20 enthielt (Assaypuffer), auf das Vierfache der gewünschten Endkonzentration verdünnt und anschließend seriell in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte 1:2 verdünnt, indem jeweils 50 μL Assaypuffer in den Vertiefungen vorgelegt wurde und 50 μL der Kompetitor-Lösung von einer Vertiefung zur nächsten übertragen wurde. Anschließend wurde der zweite Bindungspartner zur doppelten der gewünschten Endkonzentration mit Assaypuffer verdünnt und zu je 50 μL auf die Vertiefungen verteilt. Vertiefungen, in welchen der 100 % - Wert und der Leerwert bestimmt wurden, wurde anstatt der Kompetitor-Lösung Assaypuffer zugesetzt. Nachdem die Platte für 3 h inkubiert worden war, wurde sie vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft.

5.2.3.7.4 Detektion

Die relative Menge des gebundenen zweiten Bindungspartners wurde mit einem passenden Detektionssystem und gekoppelter Farbreaktion bestimmt. Dazu wurden die verwendeten Antikörper wie in Tab. 12 angegeben mit Assaypuffer verdünnt, die Vertiefungen mit je 100 μL für 1 h inkubiert und schließlich vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Der Nachweis von gp120 erfolgte mit 2 Antikörpern, welche nacheinander für je 1 h in die Vertiefungen gegeben wurden.

Tab. 12 Detektionssysteme, die für ELISAs verwendet wurden

Name	Antikörper (Hersteller, Artikelnummer)	Verdünnung
α -Maus	Goat α -Mouse IgG, γ -Chain Specific Peroxidase Conjugate (Merck Chemicals, 401207)	1:1000
α -Kaninchen	Goat α -Rabbit IgG (H+L)-HRP (Dianova, 111-035-045)	1:1000
α -Biotin	Goat α -Biotin pAb Peroxidase Conjugate (Merck Chemicals, 203206)	1:5000
α -gp120	Sheep α -HIV-1-gp120 pAb (Aalto Bio Reagents, D7324)	1:5000
	Rabbit α -Sheep IgG (H+L)-HRP (Dianova, 313-035-045)	1:5000

Die Farbreaktion wurde durch die an den Detektionsantikörper gekuppelte Meerrettichperoxidase katalysiert, wobei Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert und OPD nach Oxidation durch Kondensation zum farbgebenden Produkt 2,3-Diaminophenazin umgesetzt wird. Dazu wurden OPD-Tabletten zu 1 mg/mL in HPW gelöst und 0,03 % (v/v)

H₂O₂ zugegeben. Pro Vertiefung wurden 100 µL der Lösung verwendet und die Farbreaktion nach 5 - 20 min durch Zugabe von jeweils 50 µL 2 M H₂SO₄(aq) abgestoppt. Anschließend wurde die Extinktion bei 492 nm und einer Spaltbreite von 10 nm im Infinite Reader F200 mit 10 Lichtblitzen gemessen.

5.2.3.7.5 Auswertung

Zum Vergleich verschiedener direkter ELISAs wurden die gemessenen Extinktionen nach folgender Gleichung in eine relative Signalstärke, bezogen auf die Extinktion von b12epi-M, umgerechnet:

$$(2) \text{ relative Signalstärke [\%]} = \left(\frac{\text{Extinktion} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}}}{\text{Extinktion}_{\text{b12epi-M}} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}_{\text{b12epi-M}}}} \right) \times 100$$

Zur Auswertung der kompetitiven ELISAs wie auch für die Zellinfektionsassays wurden die folgenden Gleichungen verwendet:

$$(3) \text{ Induktion [\%]} = \left(\frac{\text{Extinktion} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}}}{\text{Extinktion}_{100\%-Wert} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}}} - 1 \right) \times 100$$

$$(4) \text{ Inhibition [\%]} = \left(1 - \frac{\text{Extinktion} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}}}{\text{Extinktion}_{100\%-Wert} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}}} \right) \times 100$$

Die Konzentrationen der verschiedenen verwendeten Proteine und das verwendete Detektionssystem ist in den Schaubildern angegeben, welche den verschiedenen ELISAs zuzuordnen sind. Dargestellt werden die Mittelwerte und deren Standardabweichung, welche mit Hilfe der folgenden Gleichungen bestimmt wurden:

$$(5) \text{ Mittelwert } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$(6) \text{ Standardabweichung des Mittelwerts } \Delta x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n(n-1)}}$$

Für durchgeführte Subtraktionen wurden die Standardabweichungen der Mittelwerte Δx addiert, für gebildete Produkte oder Quotienten wurden die relativen Fehler $\frac{\Delta x}{\bar{x}}$ addiert.

Wenn es möglich war, wurde eine Regression der gemessenen Inhibitionsdaten mit der Software SigmaPlot der Firma Systat nach der folgenden logistischen Funktion mit 4 Parametern durchgeführt:

(7) Regressionsfunktion $y = y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$

Darin beschreibt y_0 die untere waagrechte Asymptote, a die Differenz aus der oberen und der unteren waagrechten Asymptote, x_0 die Konzentration am Wendepunkt und b die Hill-Steigung der Kurve. Das Bestimmtheitsmaß dieser Regression wird mittels R^2 ausgedrückt und beschreibt die Abweichung der gemittelten Messwerte von der zugrunde gelegten Regressionsfunktion. Der IC_{50} -Wert berechnet sich aus deren Umkehrfunktion für $y = 50$:

(8) $IC_{50} = x_0 \sqrt[b]{\frac{a}{50 - y_0} - 1}$

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Monoklonale Antikörper durch Immunisierung von Mäusen mit CD4bs-M

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass **CD4bs-M**, welches die CD4bs des gp120 nachahmt, durch Immunisierung eine Immunantwort in Kaninchen auslöst. Die gebildeten Antikörper erkennen nicht nur das Immunogen-Peptid **CD4bs-M**, sondern auch gp120¹⁴¹. Es konnte gezeigt werden, dass die erhaltenen Seren darüber hinaus auch mit b12 um Bindung an gp120 konkurrieren. Die durch Immunisierung erhaltenen Seren waren nicht fähig, eine HIV-1 Infektion zu neutralisieren. Um diese Immunantwort nachzustellen und die Eigenschaften der generierten, mit gp120 kreuzreagierenden Antikörper genauer charakterisieren zu können, wurden im ersten Teil der Arbeit monoklonale Maus-Antikörper gegen **CD4bs-M** generiert und auf ihre Bindungs- und Neutralisationseigenschaften untersucht. Als Modellsystem wurde diesmal nicht das Kaninchen, sondern die Maus ausgewählt, da die Generierung von monoklonalen Maus-Antikörpern seit 1975 bereits in der Literatur beschrieben und die Methoden fortwährend optimiert wurden^{154,155}. Außerdem konnte die Einschränkung, dass möglicherweise die Auswahl von Modellsystemen nötig ist, die zur Ausbildung von extrem langen CDR H3 Schleifen fähig sind, um neutralisierende α -CD4bs-Antikörper in der Immunantwort zu generieren, durch die Entdeckung von VRC01 relativiert werden⁶¹. VRC01 besitzt im Gegensatz zu b12 keinen extrem langen CDR H3. Ob die Länge der CDRs ein entscheidendes Merkmal für die Neutralisationsfähigkeit von breit neutralisierenden α -HIV-1-Antikörpern darstellt, wurde schon seit Entdeckung der ersten breit neutralisierenden Antikörper b12³¹, 2F5³³ und 2G12⁸² in Erwägung gezogen, die alle einen besonders ausgeprägten CDR H3 aufweisen. Diese Frage wurde 2011 von Breden et al. aufgegriffen: Sie verglichen die humoralen Immunantworten gegenüber HIV-1 mit denen von Infektions- oder Autoimmunkrankheiten und stellten fest, dass Antikörper mit extra langen CDR H3-loops nicht nur bei HIV-Infektionen sondern allgemein bei chronischen Infekten häufig auftreten¹⁵⁶. Kelker et al. zeigten, dass Mäuse in der Lage sind, gp120-kreuzreaktive Antikörper durch Immunisierung von Peptiden, die die Sequenz des β 20- β 21-hairpin beinhalten, zu bilden, und sie konnten einen monoklonalen Antikörper mit moderater Neutralisationsfähigkeit gegenüber einem HIV-1 Isolat (SF162) isolieren¹⁵⁷. Dies zeigt, dass Mäuse ebenfalls als Modellsystem zur Generierung von Immunantworten verwendet werden können. Deshalb sind nicht Kaninchen, deren Immunsystem zwar häufig extrem lange CDR H3 Schleifen ausbildet, sondern Mäuse als Modellsystem zur Generierung von Immunseren ausgewählt worden.

Zur Immunisierung wurde **CD4bs-M** mit zusätzlichem C-terminalem Cystein synthetisiert, an maleimido-mcKLH (*matriculture keyhole limpet hemocyanin*) konjugiert und mit einfacher Auffrischungsinjektion nach 2 Wochen intraperitoneal verabreicht. Der Verlauf der Immunisierung wurde in einem ELISA mit den abgenommenen Seren nachvollzogen (Abb. 15).

Ac-SGGDPEIVT-Ahx-Lys(Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGN-NH₂

Sequenz CD4bs-M

Ac-SGGDPEIVT-Ahx-Lys(Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGN-Ahx-G-Ahx-Cys(H)-NH₂

Sequenz CD4bs-M-Cys

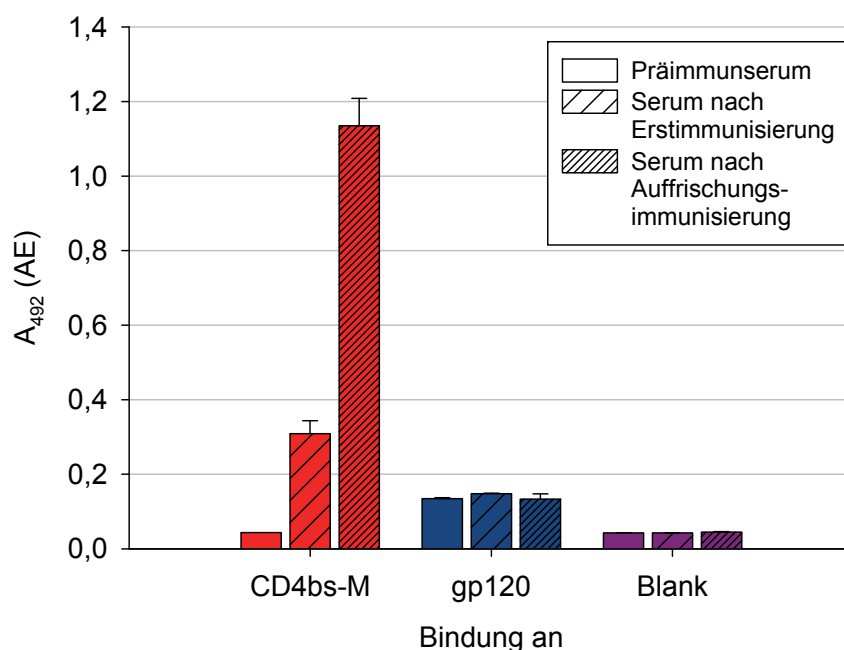


Abb. 15 Bindung von Immunseren und Präimmunserum der Maus an CD4bs-M und gp120: Beschichtungskonzentrationen (CD4bs-M, gp120): 16,7 nM, Verdünnungsfaktor Seren: 1:200, Detektion: α -Maus

CD4bs-M-spezifische Antikörper konnten im Serum bereits nach der ersten Immunisierung nachgewiesen werden, welche allerdings nicht kreuzreaktiv gegenüber gp120 waren. Durch die Auffrischungsimmunisierung konnte der Titer gegenüber **CD4bs-M** zwar erhöht werden, eine Kreuzreaktivität gegenüber gp120 stellte sich trotzdem nicht ein. Dieses Resultat schließt allerdings nicht aus, dass HIV-1 von den Seren erkannt wird, da gp120 auf den Virionen als Env-Trimer und nicht als Monomer präsentiert wird^{13,136}. Daher wurde der Versuch der Gewinnung monoklonaler Antikörper dennoch weiter geführt. Nach der Hybridisierung der Milzzellen der Maus wurden die erhaltenen Hybridomzellen kultiviert und deren Überstand im ELISA auf Bindung an **CD4bs-M** getestet. Für 101 Überstände konnte dabei eine überdurchschnittlich hohe Bindung an **CD4bs-M** beobachtet werden (Absorption

> 1). Diese Hybridome wurden weiter kultiviert und der Überstand erneut auf Bindung an **CD4bs-M** getestet, jedoch auch zusätzlich an **CD4bs-M(4xAla)**, **CD4bl(Ac)**, **β23**, **β20-β21** und gp120. Letztere drei Peptide entsprechen den Einzelfragmenten des **CD4bs-M** und **CD4bs-M(4xAla)** einer 4-fachen Punktvariante, bei der die wichtigsten Interaktionsreste des gp120¹⁵⁸ durch Alanin ersetzt wurden.

Ac-**SGGAP**IVT-Ahx-Lys(Ac-**INMAQ**EVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-**LTR**AGGN-NH₂

Sequenz CD4bs-M(4xAla)

Ac-SGGDPEIVT-NH₂

Sequenz CD4bl(Ac)

Ac- LTRDGGN-NH₂

Sequenz β23

Ac-INMWQEVGKA-NH₂

Sequenz β20-β21

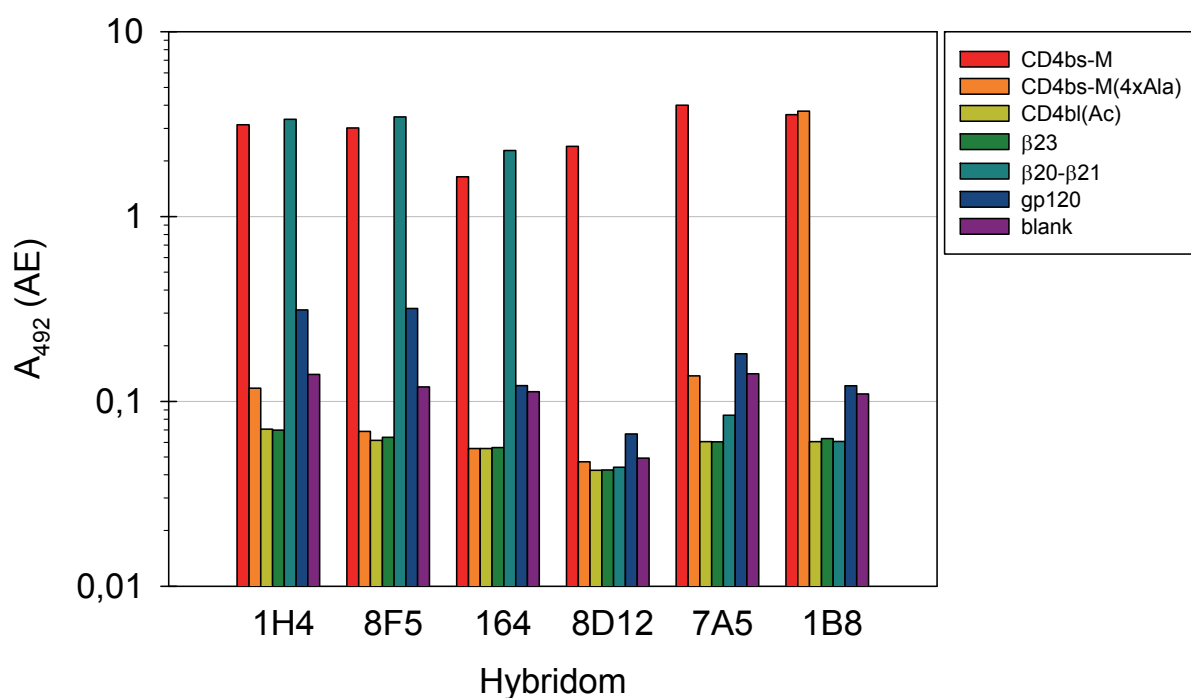


Abb. 16 Bindung von ausgewählten Hybridomüberständen an CD4bs-M, dessen Varianten und gp120: Beschichtung (CD4bs-M, CD4bs-M(4xAla), CD4bl(Ac), β23, β 20-β21, gp120): 16,7 nM, Detektion: anti-Maus-HRP

In Abb. 16 sind repräsentativ alle Antikörpergruppen dargestellt, die mit Hilfe des durchgeführten ELISAs mit den 101 Hybridomüberständen unterschieden werden konnten.

Dabei verhielten sich die in Abb. 16 nicht explizit dargestellten Hybridomüberstände wie die dargestellten Extreme von 7A5 und 1B8 und unterschieden sich hauptsächlich in ihrer Fähigkeit an **CD4bs-M(4xAla)** zu binden. Hybridom 8D12 zeichnete sich durch die geringste unspezifische Bindung aus, drei weitere, welche auch nicht in Abb. 16 dargestellt sind,

erkannten das Immunogen nicht mehr. Die übrigen drei Hybridome 1H4, 8F5 und 164 hoben sich dadurch ab, dass ihre Überstände auch den **β 20- β 21 hairpin** als Einzelfragment erkannten und zwei sogar leichte Bindung an gp120 zeigten. Auffällig ist, dass keiner der Hybridomüberstände **β 23** bzw. **CD4b1(Ac)** alleine erkannte, was mit den Beobachtungen anderer Studien im Einklang steht, nämlich dass zur Immunisierung verwendete Peptide, die den β 20- β 21 hairpin enthalten, in Mäusen immunogener sind als andere ¹⁵⁷. Dass weiterhin nur von drei Hybridomen Einzelfragmente erkannt wurden ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das **CD4bs-M** zumindest als mCKLH-Konjugat eine antigene Struktur ausbildet, welche wahrscheinlich alle drei Peptidfragmente gemeinsam umfasst und gut vom Immunsystem erkannt werden kann.

Es wurden 24 weitere Hybridomüberstände von den vielen ähnlichen ausgewählt und jeweils vier davon mit einem der gezeigten Hybridomüberstände zu gleichen Teilen vereint. Die so erhaltenen Pools wurden anschließend auf HIV-1-Neutralisation getestet, da die hierfür verwendeten Virionen nicht monomeres gp120 auf ihrer Oberfläche tragen, sondern native, funktionelle Env-Trimere. Auch die breit neutralisierenden Antikörper PG9 und PG16 wurden durch das Screening von B-Zellüberständen auf HIV-1-Neutralisation identifiziert und hätten durch Bindungsassays mit monomerem gp120 nicht gefunden werden können, da sie dieses nur sehr schlecht binden ⁶⁷.

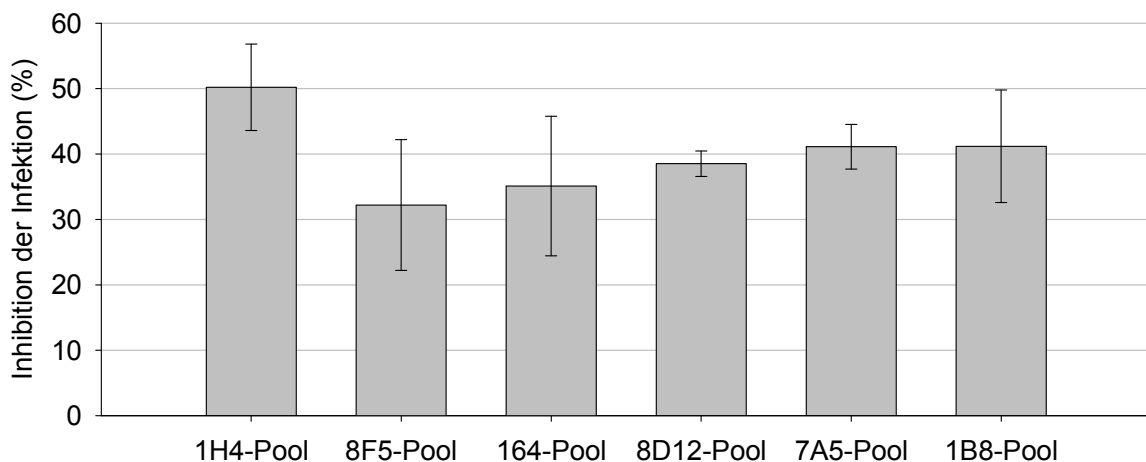


Abb. 17 SEAP-Infektionsassay der vereinten Hybridomüberstände in 1:4 Verdünnungen

Die Neutralisationsfähigkeit der erzeugten Pools lag zwischen 30 % und 50 %. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Antikörper mit potenter Neutralisationsfähigkeit gefunden wird, war für den 1H4-Pool am höchsten (Abb. 17). Deshalb wurden nun die Einzel-Überstände, aus denen sich der 1H4-Pool zusammensetzte, auf HIV-1-Neutralisation untersucht.

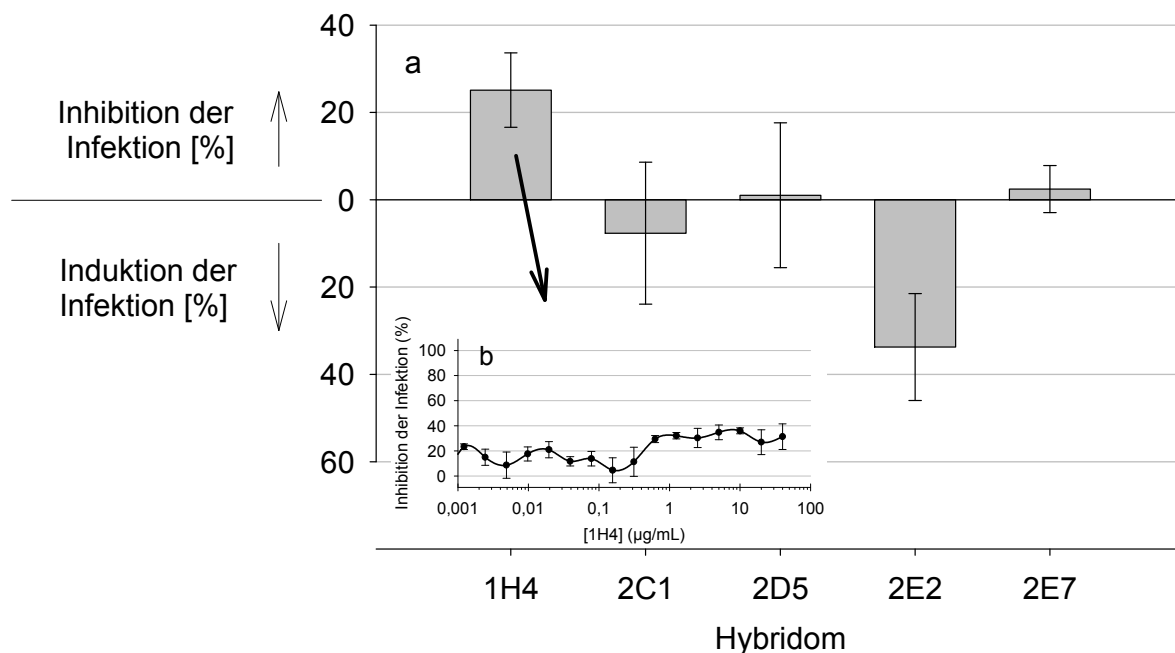


Abb. 18 SEAP-Infektionsassay [a] der einzelnen Hybridomüberstände des 1H4-Pools in 1:4-Verdünnungen und [b] des Antikörpers 1H4

Von den untersuchten einzelnen Überständen war 1H4 der einzige, der in diesem HIV-1-Infektionsassay die Infektion zu 25 % inhibierte, die anderen waren inaktiv oder induzierten sogar eine Infektion (Abb. 18). Die Antikörper des 1H4-Überstandes wurden mittels Protein G plus Agarose aufgereinigt, die Konzentration per UV bestimmt und die HIV-1-Neutralisation erneut untersucht. Auch der gereinigte Antikörper wies bei der höchsten getesteten Konzentration (40 µg/mL) nur eine Inhibition der Infektion von moderaten 30 % auf. Diese nahm zudem mit fallender Antikörperkonzentration kaum ab, so dass man nicht von einem konzentrationsabhängigen Effekt sprechen kann (Abb. 18b).

Weder durch die Immunisierung der Maus mit **CD4bs-M** konnte eine gp120-kreuzreaktive Immunantwort ausgelöst werden, wie sie für Kaninchen bereits beobachtet wurde, noch konnten potente HIV-1-neutralisierende Antikörper induziert bzw. identifiziert werden. Auffällig war dennoch, dass alle zu Pools vereinigten Überstände Inhibitionen von mindestens 30 % aufwiesen (Abb. 17), wohingegen die Einzelüberstände des 1H4-Pools, welcher 50 % Inhibition zeigte, höchstens 25 % Inhibition erreichten. Möglicherweise kann diese Verringerung durch simultane Bindung der Antikörper im Gemisch an gp41 bzw. gp120-Epitope zu Stande kommen, die im Env-Trimer vielleicht vorliegen, was auf einen kooperativen, synergistischen Wirkungsmechanismus der Überstände bzw. der darin enthaltenen Antikörper schließen lassen könnte.

Dass die in Kaninchen beobachtete Immunantwort in der Maus nicht reproduziert werden konnte, kann viele Ursachen haben, jedoch lieferten auch zwei weitere Mäusen keine gp120-

kreuzreaktiven Seren (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kommt hier doch der Speziesunterschied vor dem Hintergrund zum Tragen, dass Kaninchen längere CDRs der schweren Kette ausbilden können als Mäuse ¹⁵⁹.

Weil weder kreuzreaktive Seren noch neutralisierende, monoklonale Antikörper mit **CD4bs-M** erhalten wurden, wird im nächsten Kapitel (6.2) die Arbeit mit dem Epitop eines breit neutralisierenden Antikörpers b12 auf HIV-1 gp120 ⁵⁹ nach dem Vorbild von **CD4bs-M** ¹⁴¹ beschrieben.

6.2 b12epi-M: ein Mimetikum des b12-Epitops von HIV-1 gp120

Im Jahr 2007 veröffentlichten Zhou *et al.* die Kristallstruktur des Fab-Fragments des gegen HIV-1 gerichteten breit neutralisierenden Antikörper b12 im Komplex mit einem rekombinant hergestellten monomeren gp120-Protein. Aus dieser Struktur ging hervor, dass das Epitop des Antikörpers großflächig die CD4bs überlappt (Abb. 9) und die Aminosäurereste des b12-Epitops und der CD4bs von gp120 größtenteils in den gleichen Sequenzabschnitten lokalisiert sind. ⁵⁹

6.2.1 Peptiddesign

Der *CD4-binding loop* liegt zentral in der Interaktionsfläche von gp120 mit b12 und bildet mit allen CDRs der schweren Kette des Antikörpers interatomare Kontakte aus. Die leichte Kette des Antikörpers hingegen interagiert in dieser Komplexstruktur (2NY7) nicht direkt mit gp120. Neben dem *CD4-binding loop*, welcher unter HIV-1-Isolaten weitgehend sequenziell konserviert ist, sind auch die weniger stark konservierten Sequenzabschnitte des β 20- β 21 *hairpin* und des β 23-Fragments an der Interaktion mit b12 beteiligt, welche alle im Peptid **CD4bs-M** präsentiert werden. Neben den genannten Sequenzabschnitten spielt für die b12-Bindung aber auch ein weiterer, diskontinuierlicher Sequenzabschnitt eine wichtige Rolle, der im Bereich der Disulfidbrücke im Stamm des *V4-loops* liegt. ⁵⁹

Es wurde bereits gezeigt, dass die Aminosäure Trp100 des CDR H3 von b12 essenziell ist für dessen Fähigkeit an gp120 zu binden ¹⁶⁰. In der Komplexstruktur von gp120 und b12 wird dieser essentielle Rest vom Stamm des *V4-loops* kontaktiert, welcher unter HIV-1 Isolaten ebenfalls hoch konserviert ist ⁴⁶ (siehe Abb. 19).

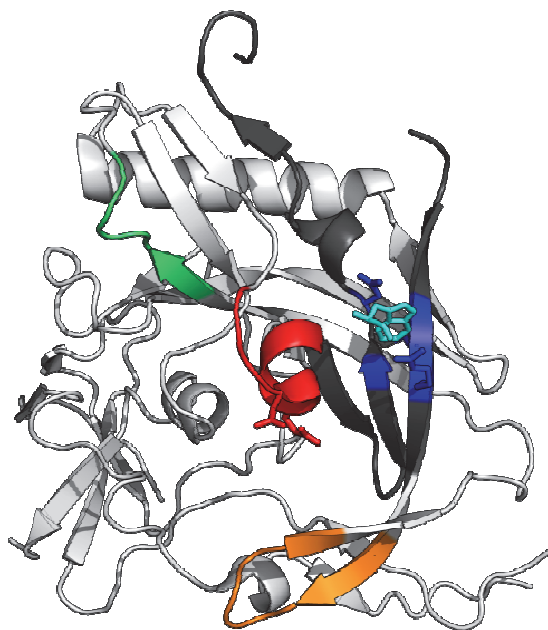


Abb. 19 Struktur eines gp120 Proteins (grau) im Komplexkristall mit b12 (PDB 2NY7). Farbig hervorgehoben sind der CD4-binding loop (rot), der V4-loop Stamm (blau), der $\beta 20$ - $\beta 21$ hairpin (gelb) und das $\beta 23$ -Fragment (grün). Außerdem ist die Seitenkette des Trp100 der schweren Kette des b12 in blaugrün dargestellt.

Zunächst wurden Peptide synthetisiert, welche die wichtigen, hoch konservierten Sequenzabschnitte beinhalten, nämlich den *CD4-binding loop*, welcher über 40 % der Kontaktfläche zu b12 ausbildet, und den *V4-loop* Stamm. Hierzu sollte der kontinuierliche Sequenzabschnitt gp120³⁶⁵⁻⁴²⁰ des verwendeten gp120-Proteins synthetisiert werden, welcher sich jedoch mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese für dieses HXBc2-Isolat als nicht zugänglich erwies. Die Synthese gelang jedoch mit dem Sequenzabschnitt gp120³⁶⁵⁻⁴²¹ des JR-FL-Isolats mit einer Ausbeute von 0,7 % (**b12epi-M(JRFL)**), wobei Cys378 durch ein Serin ersetzt wurde, um die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen Cys385 und Cys418 am *V4-loop* Stamm zu gewährleisten und die Dimerbildung zu vermeiden. HIV-1 JR-FL ist ebenso wie HIV-1 HXBc2 sensitiv für Neutralisation mit b12³¹.

Ac-SGGDPEIVMHSFN SGGEFFYCN SAQLFNSTWNNNTEGSNTEGNTITLPCRIK-NH₂

Sequenz b12epi-M(JRFL)

Ac-SGGDPEIVT-Ahx-Lys(Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGN-NH₂

Sequenz CD4bs-M

In Kompetitions-Versuchen wurde untersucht, ob **b12epi-M(JR-FL)** ebenso wie **CD4bs-M**, in der Lage ist, die Interaktion von b12 und gp120 zu stören. Dabei wurde davon ausgegangen, dass gp120 und das Peptid um Bindung an das Paratop des b12 Antikörpers konkurrieren.

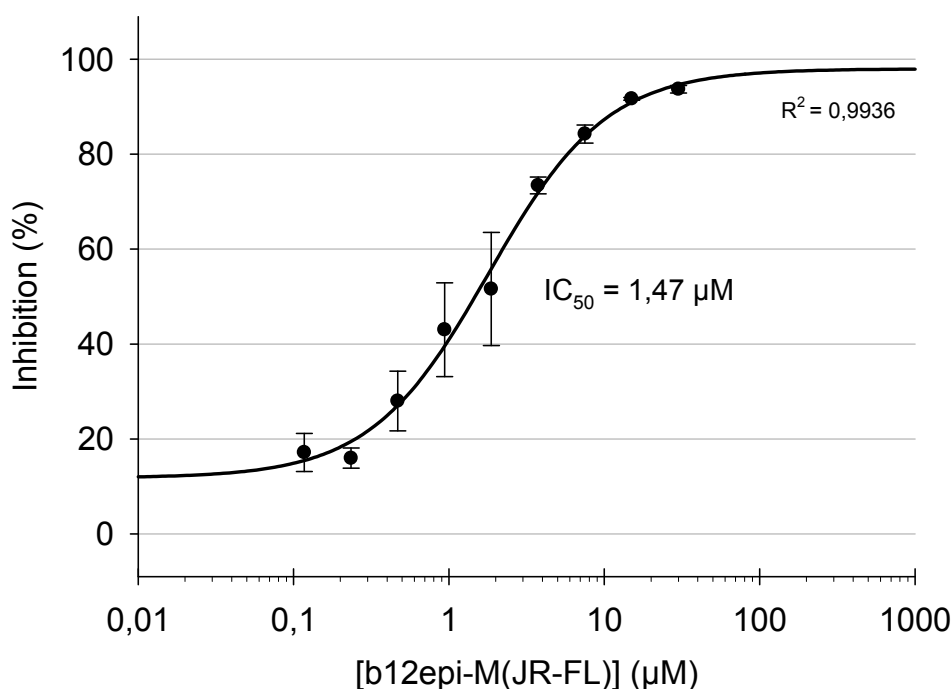


Abb. 20 Einfluss von b12epi-M(JRFL) auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 μg/mL, Ligand (gp120) 0,5 μg/mL, Detektion α-gp120

In Abb. 20 wird gezeigt, dass **b12epi-M(JR-FL)** die Bindung von gp120 an b12 konzentrationsabhängig hemmt. Die Konzentration, bei der eine halbmaximale Bindungshemmung erreicht wird, wird als IC_{50} -Wert angegeben und beträgt in diesem Fall 1,47 μM. **b12epi-M(JRFL)** ist also in der Lage, die Interaktion zwischen b12 und gp120 zu stören, was dafür spricht, dass dieses Peptid das b12-Epitop auf gp120 imitieren könnte.

6.2.2 b12epi-M

Ausgehend von diesem Ergebnis war die nächste Zielsetzung, **b12epi-M(JR-FL)** dahingehend zu verändern, dass hauptsächlich konservierte gp120 Sequenzabschnitte präsentiert werden¹⁶¹ und somit dessen Potential zu erhöhen, die Masse der verschiedenen zirkulierenden HIV Isolate adäquat zu repräsentieren und bei Immunisierungen breiter neutralisierende humorale Immunantworten auszulösen. Dafür wurde der variable Sequenzabschnitt des V4-loops durch eine einfache Platzhalteramino-säure ε-Aminohexansäure (Ahx) ersetzt, wobei der inhibitorische Effekt des Peptids erhalten werden sollte.

Da die Einführung eines Biotin-Restes die Möglichkeit bietet, die Peptide nicht nur in kompetitiven Bindungsexperimenten zu untersuchen sondern sie auch direkt nachzuweisen, wurden die Peptide zusätzlich am N-Terminus biotinyliert.

Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNLSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH₂
 Sequenz b12epi-M

Beim Design dieses verkürzten b12-Epitop-mimetischen Peptids **b12epi-M** wurden außerdem einige Punktmutationen eingeführt. Met373 wurde zu einem Threonin variiert, um den CD4-binding loop sequentiell an das gp120 im b12-Komplekxkristall anzupassen, welches vom HXBc2 Stamm abgeleitet worden war. Um die UV-Analytik zu vereinfachen wurde Ser375 durch Trp ersetzt, welches auch im rekombinanten gp120-Protein, mit dem die Aufklärung der Komplexstruktur gelang, zur Stabilisierung eingeführt worden war, aber nicht direkt an der Interaktion mit b12 beteiligt ist. Um die Sequenz des **b12epi-M** noch weiter an den Sequenzabschnitt 365-420 des gp120 Proteins anzupassen, welches für die Komplexstrukturen von b12 und gp120 verwendet wurde, wurde auch ein Austausch des Ala388 gegen Threonin angestrebt, was sich jedoch synthetisch, auch nach Optimierung der Synthesemethode, nicht verwirklichen ließ.

Die Synthese des **b12epi-M** ist nicht trivial und gelang mit der vollautomatisierten Methode, wie sie im Material und Methoden-Teil beschrieben ist (5.2.1.1.2), zunächst nicht. Erst durch das Einführen strukturbrechender Synthesebausteine wie Fmoc-Asn(Trt)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}\text{pro}$)-OH an zwei Positionen im Peptid gelang die Synthese von acetyliertem **b12epi-M**. Durch Ersatz des Pseudoprolins durch das Isoacyldipeptid Boc-Ser(Fmoc-Asn(Trt))-OH wurde bei der Synthese die Ausbeute von 2,8 % auf 12,3 % gesteigert.

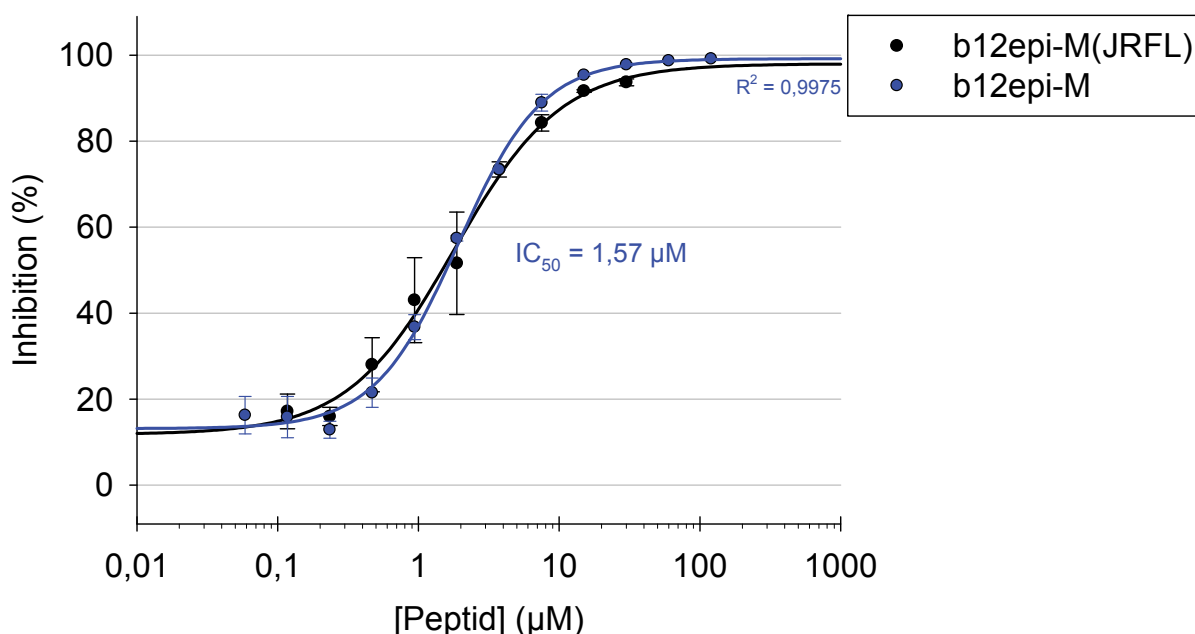


Abb. 21 Einfluss von b12epi-M(JRFL) und dem verkürzten b12epi-M auf die b12 – gp120 Interaktion:
Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α -gp120

Wie in Abb. 21 zu ersehen ist, unterscheiden sich **b12epi-M(JRFL)** und **b12epi-M** trotz unterschiedlicher Sequenzen nicht in ihrer Fähigkeit, die b12 - gp120 Bindung zu inhibieren. Der IC_{50} -Wert ist mit 1,57 µM fast dem des **b12epi-M(JRFL)** mit 1,47 µM gleich und auch der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve ist annähernd identisch. Folglich scheint der variable V4-

loop des **b12epi-M(JRFL)** für die Bindung an b12 nicht wichtig zu sein, da er sich durch Platzhalteraminoacids ersetzen lässt. Auch die punktuellen Veränderungen scheinen keinen Effekt auf die Bindung des **b12epi-M** an b12 auszuüben. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da laut Komplexstruktur von b12 mit gp120 die ausgetauschten Reste, abgesehen von Met373 bzw. Thr373, nicht an der direkten Interaktion mit b12 beteiligt sind.

Zusätzlich zur Fähigkeit des **b12epi-M** und seiner Varianten mit b12 um die Bindung an gp120 zu kompetieren, wurde auch sein Kompetitionsvermögen mit CD4 untersucht. Es stellte sich die Frage, ob **b12epi-M** sich in diesem Punkt ähnlich verhält wie sein CD4-Bindungsstellen-Pendant **CD4bs-M**, welches in der Lage ist sowohl die CD4-gp120-Interaktion als auch die b12-gp120-Interaktion zu inhibieren. Diese Fähigkeit scheint durchaus nicht abwegig in Anbetracht der Tatsache, dass die beiden Bindungsstellen von CD4 und b12 auf gp120 teilweise überlappen (siehe Einleitung). Von besonderem Interesse ist, ob **b12epi-M** die gp120-b12-Interaktion besser inhibiert als die gp120-CD4-Interaktion, ob eine Selektivität zu beobachten ist und wie die Kurve im Vergleich zu der für **CD4bs-M** verläuft.

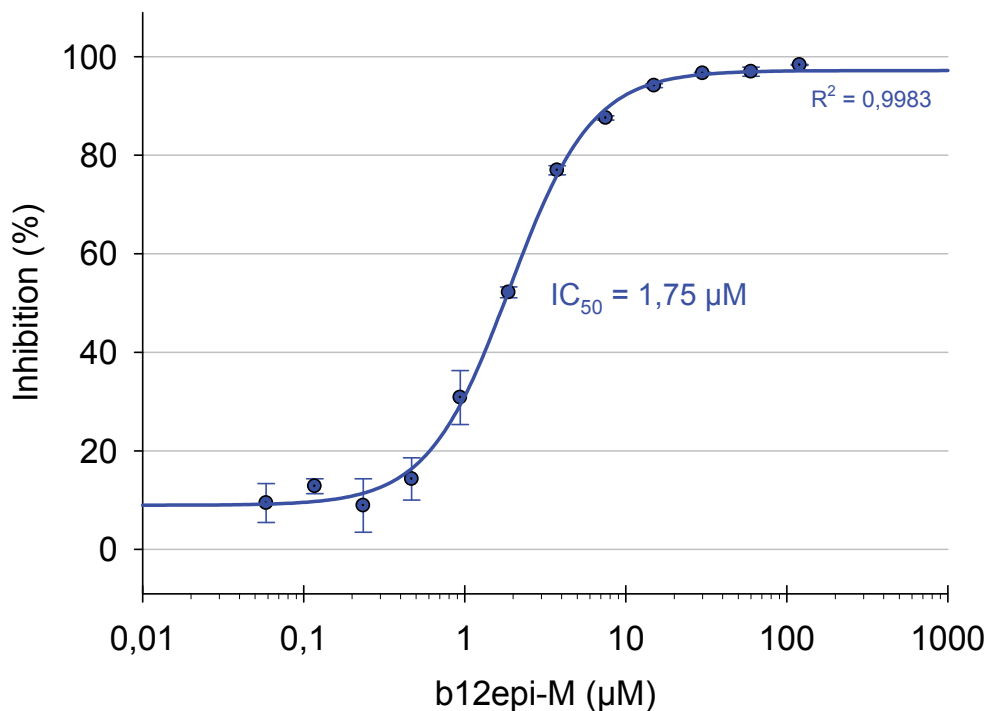


Abb. 22 Einfluss von b12epi-M auf die CD4 – gp120 Interaktion: Beschichtung (CD4) 1 μg/mL, Ligand (gp120) 0,5 μg/mL, Detektion α-gp120

Aus der Regressionskurve des Kompetitions-Experiments mit CD4 (Abb. 22) ergibt sich ein IC_{50} -Wert von 1,75 μM, welcher annähernd identisch ist zu dem, der für die Inhibition der b12 - gp120 Interaktion erhalten wurde.

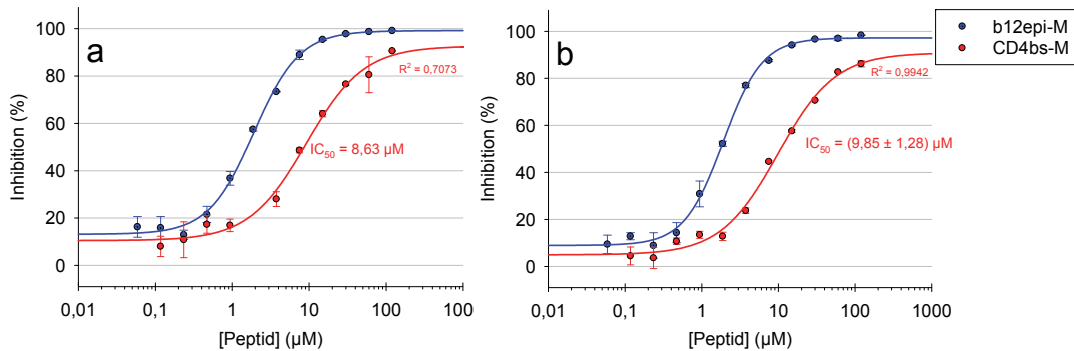


Abb. 23 Einfluss von b12epi-M und CD4bs-M auf die Interaktion von b12 [a] bzw. CD4 [b] mit gp120: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL bzw. (CD4) 1 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120

Vergleicht man den Einfluss von **b12epi-M** und **CD4bs-M** in beiden kompetitiven Assays (Abb. 23), fällt auf, dass es unerheblich ist, ob die Bindung an b12 oder CD4 betrachtet wird. Die Kurven sind für **CD4bs-M** ebenso wie für **b12epi-M** qualitativ und quantitativ nahezu identisch. Die IC_{50} -Werte von **CD4bs-M** entsprechen mit 6 µM weitgehend den veröffentlichten Daten¹⁴¹ und sind um den Faktor 5 bis 6 größer als die des **b12epi-M**. Dies macht **b12epi-M** neben **CD4bs-M** potentiell zu einem weiteren peptidischen Immunogen, welches in der Lage sein könnte, eine HIV-1-neutralisierende Immunantwort auszulösen.

Da sowohl **CD4bs-M** als auch **b12epi-M** auf der Grundlage von Komplexkristallstrukturen des gp120 mit CD4 bzw. b12 entworfen wurden (**CD4bs-M** PDB Eintrag 1RZJ, **b12epi-M** PDB Eintrag 2NY7), erscheint es zunächst unerwartet, dass beide Peptide als Inhibitoren keine Selektivität gegenüber dem entsprechenden Liganden aufweisen von dessen Bindungsstelle sie abgeleitet wurden. Ein möglicher Erklärungsansatz für die fehlende Selektivität kann jedoch die genaue Betrachtung der Komplexstrukturen von gp120 mit b12 und CD4 liefern, bei denen die verwendeten gp120 Proteine zwar ähnlich, jedoch nicht identisch sind. Im Falle der Komplexstruktur für b12 mit gp120 wurde ein genetisch modifiziertes und rekombinant exprimiertes gp120 verwendet, welches ursprünglich dazu entworfen wurde, die CD4-gebundenen Konformation und die Ausbildung des bridging-sheets zu begünstigen. Dazu wurden unter anderem zusätzliche Disulfidbrücken eingeführt, um die Bewegung zwischen innerer und äußerer Domäne des gp120 einzuschränken. Mit diesem modifizierten gp120-Protein gelang die Kristallisation eines Komplexes mit b12 (Abb. 24a). Allerdings unterscheidet sich diese b12-gebundene Konformation des gp120-Proteins von der, wie sie im Komplex mit CD4 eingenommen wird (Abb. 24b). Im Besonderen die Lage des $\beta 20$ - $\beta 21$ *hairpins* ist verändert. Dieser bildet in der CD4-gebundenen Konformation zusammen mit dem *CD4-binding loop* die sogenannte Phe43-Bindungstasche aus. Möglicherweise wird von b12, sobald der $\beta 20$ - $\beta 21$ *hairpin* durch die künstliche Disulfidbrücke fixiert ist, zusätzlich der V4-loop-Stamm als Interaktionsstelle hinzugezogen. Bereits 2001 wurde durch computergestützte Docking-Studien auf der Basis der Kristallstruktur von

ungebundenem b12 postuliert, dass der Indolring des Trp100 an der Spitze des extralangen CDR H3 *loops* dieselbe Bindungstasche belegt wie der Phenylring des Phe43 des CD4, nach welcher sie benannt wurde ¹⁶² (siehe Abb. 24b). Bublil *et al.* sagten 2006 mit Hilfe des Algorithmus Mapitope ¹⁶³ voraus, dass das b12-Epitop ein diskontinuierliches Epitop darstellt, welches den *CD4-binding loop* und dessen Peripherie umfasst ¹⁶⁴. Die computergestützten Vorhersagen der Sequenzabschnitte des b12-Epitops stimmen zwar weitgehend mit den Sequenzabschnitten, die auch in der Komplexkristallstruktur intermolekulare Kontakte ausbilden, überein. Eine Ausnahme bildet aber genau der V4-*loop* Stamm, welcher in diesen computergestützten Vorhersagen nicht als Teil des b12-Epitops beschrieben wird.

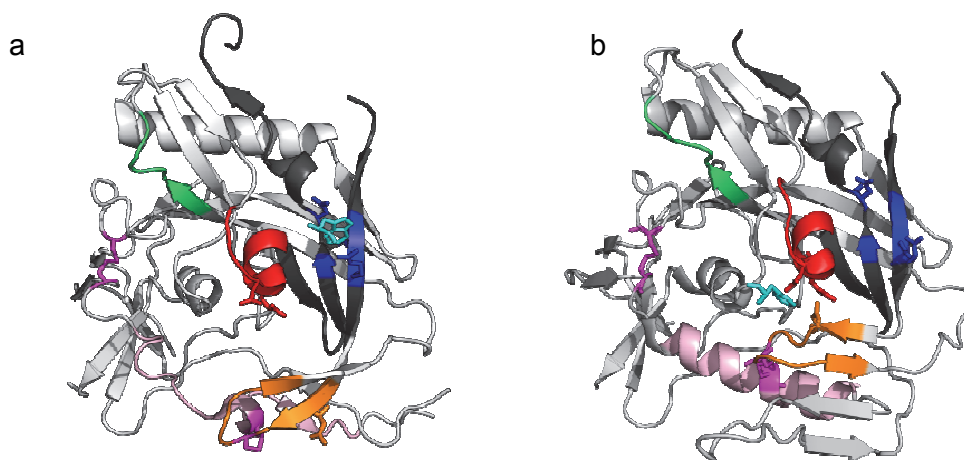


Abb. 24 Kristallstruktur eines gp120-Proteins im Komplex mit b12 (PDB 2NY7) [a] bzw. CD4 und 17b (PDB 2NY5) [b]. Das Rückgrat des gp120 ist als Ribbon-Diagramm dargestellt (grau). Farblich hervorgehoben sind der CD4-binding loop (rot), der V4-loop Stamm (blau), der β 20- β 21 hairpin (gelb) und das β 23-Fragment (grün). Außerdem ist die Seitenkette des Trp100 der schweren Kette des b12 [a] und Phe43 des CD4 [b] in blaugrün dargestellt. Die zusätzlich eingebrachten Disulfidbrücken sind in magenta dargestellt und die Reste, welche die α 1-Helix ausbilden in hellem pink.

Die künstliche Ile109Cys / Gln428Cys-Disulfidbrücke fixiert den β 20- β 21 *hairpin* von gp120 im Komplex mit b12 in einer Konformation, die nicht der Konformation im Komplex mit CD4 entspricht, was in Zusammenhang damit steht, dass sich die α 1-Helix (Abb. 24b, hellpink) nicht ausbilden kann. Somit liegen die C_{α} -Atome der Aminosäuren, welche Wasserstoffbrücken mit Phe43 des CD4 ausbilden, nämlich Asp368 (*CD4-binding loop*) und Asn425 (β 20- β 21 *hairpin*), statt nur 8 Å wie in der CD4-Komplexkristallstruktur (Abb. 24b, dargestellt als Stab-Model) in der b12-Komplexkristallstruktur 20,2 Å voneinander entfernt. Außerdem ist der β 20- β 21 *hairpin* hier im Vergleich zur CD4-Komplexkristallstruktur um 180 ° verdreht und durch MD-Simulationen wurde gezeigt, dass diese Disulfidbrücke einen Einfluss auf die Lage des β 20- β 21 *hairpins* hat ¹⁶⁵.

Die gegenseitige Kompensation des β 20- β 21 *hairpins* durch den V4-*loop* Stamm ist also eine mögliche Erklärung dafür, dass sich **CD4bs-M**, welches Teile des β 20- β 21 *hairpin* enthält,

und **b12epi-M**, welches den V4-loop Stamm enthält, sich in den kompetitiven Bindungsassays mit gp120 sehr ähnlich verhalten, unabhängig davon ob Bindung an CD4 oder b12 gemessen wurde.

Der *CD4-binding loop*, dessen Sequenz in beiden Peptiden vorhanden ist, ist alleine nicht in der Lage, die CD4 - gp120 Interaktion¹⁴¹ oder b12 - gp120 Interaktion (Abb. 25) zu stören und kann folglich auch nicht der einzige Grund für das ähnliche Verhalten von **b12epi-M** und **CD4bs-M** sein.

6.2.3 Bestätigung des Peptiddesigns

Im folgenden Kompetitionsexperiment wurden der *CD4-binding loop* und der V4-loop Stamm als einzelne Peptide und in Kombination mit dem Sequenzabschnitt, der *CD4-binding loop* und den V4-loop Stamm verbindet, untersucht.

Biotin-Ahx-**SGGDPEIVT**HWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Ahx-G-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M

Biotin-Ahx-**SGGDPEIVT**-NH₂

Sequenz CD4bl

Biotin-Ahx-**CNSAQLF**-Ahx-G-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz V4-loop Stamm

Biotin-Ahx-HWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Ahx-G-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(Δ CD4bl)

Biotin-Ahx-**SGGDPEIVT**HWFNSGGEFFY-NH₂

Sequenz b12epi-M(Δ V4loop)

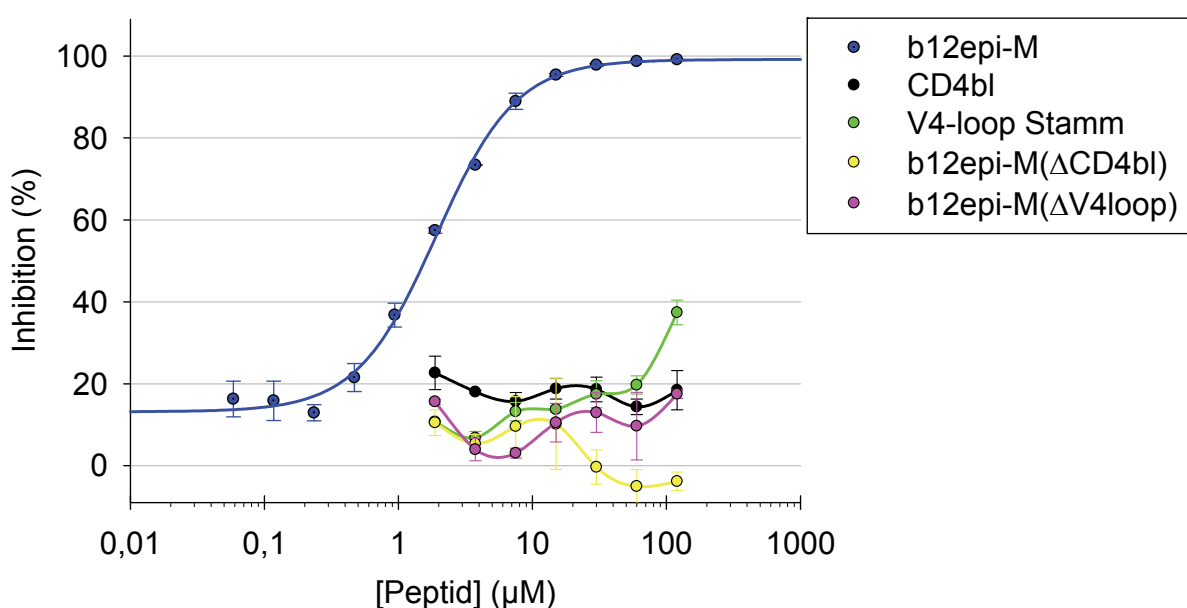


Abb. 25 Einfluss der verkürzten b12epi-M-Derivate auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 μg/mL, Ligand (gp120) 0,5 μg/mL, Detektion α -gp120

Im untersuchten Konzentrationsbereich ist weder der *CD4-binding loop* (**CD4bl**) noch der *V4-loop* Stamm (**V4-loop Stamm**) alleine fähig, die Interaktion von b12 und gp120 zu inhibieren (Abb. 25). Entfernt man einen dieser für die b12-Bindung wichtigen Sequenzabschnitte aus **b12epi-M** (**b12epi-M(Δ CD4bl)** bzw. **b12epi-M(Δ V4loop)**) verlieren diese Peptide auch ihre Aktivität. Nur wenn beide Sequenzabschnitte gleichzeitig in einem Peptid präsentiert werden, wie es in **b12epi-M** der Fall ist, ist das Peptid im kompetitiven Bindungsassay aktiv. Die simultane Interaktion der wichtigen Sequenzabschnitte spielt also nicht nur für die Erkennung des gp120 durch b12 eine wichtige Rolle, sondern auch für die Erkennung des **b12epi-M**. Dieses Erkenntnis unterstützt das initiale Peptiddesign, bei dem verschiedene wichtige Sequenzabschnitte berücksichtigt und in dem inhibitorisch aktiven **b12epi-M** zusammengefasst wurden.

Auch die räumliche Anordnung dieser Sequenzabschnitte (*CD4-binding loop* und *V4-loop* Stamm) beeinflusst die Aktivität des Peptids. Hebt man die räumliche Nähe der Reste des *V4-loop* Stammes zueinander auf, indem man die Cysteine der Disulfidbrücke durch Serin ersetzt, erhält man ein lineares Peptid (**b12epi-M(lin)**).

Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYSNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPSRI-NH₂

Sequenz **b12epi-M(lin)**

Dieses ist zwar immer noch aktiv im durchgeführten Bindungsassay, weist allerdings einen IC₅₀-Wert von 21 μ M auf, welcher um ca. den Faktor 10 bis 15 größer ist als der des **b12epi-M** (Abb. 26). Das Ergebnis zeigt, dass eine durch die Disulfidbrücke erzwungene räumliche Nähe der beiden Stränge des *V4-loop* Stammes, wie es in der Tertiärstruktur des gp120-Proteins auch der Fall ist, zu einer für Bindung günstigeren Konformation des Peptids führt. Dieses allgemeine Prinzip wird im Review von John S. Davies beschrieben ¹⁶⁶.

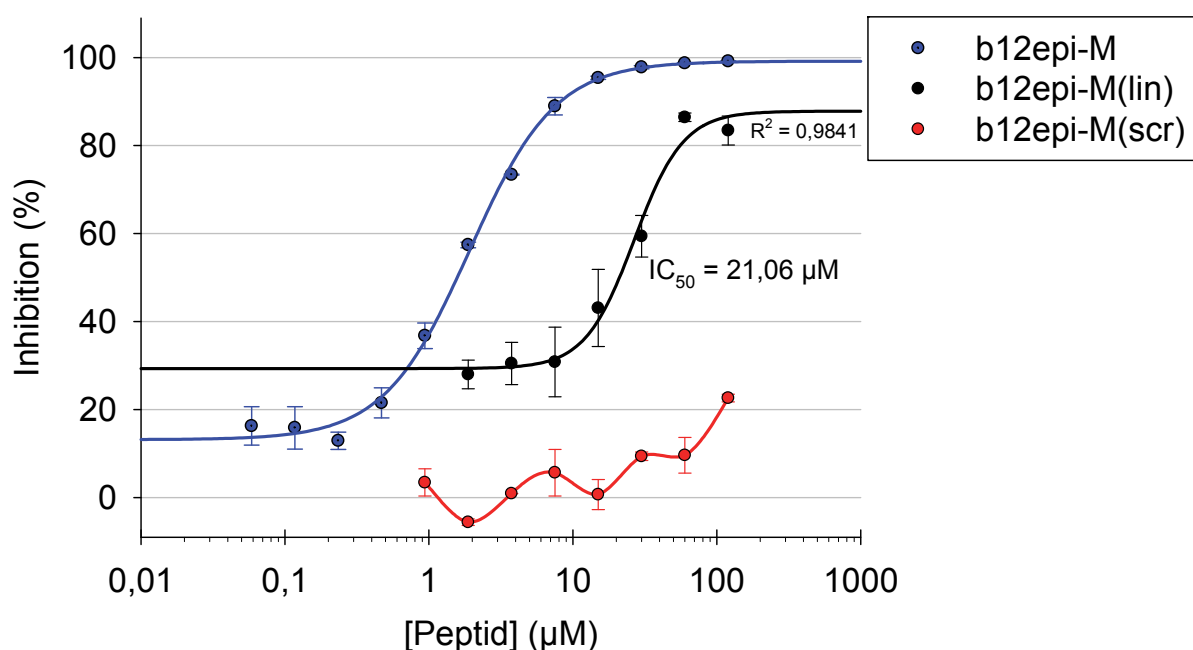


Abb. 26 Einfluss von der linearen und scrambled-Variante auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 μg/mL, Ligand (gp120) 0,5 μg/mL, Detektion α-gp120

Auch die Rolle der Primärstruktur des Peptids wurde mit Hilfe von **b12epi-M(scr)** untersucht. **b12epi-M(scr)** beinhaltet genau die gleichen Aminosäuren wie **b12epi-M**, allerdings ist die Reihenfolge der proteinogenen Aminosäuren zufällig.

Biotin-Ahx-IQYLVGSGLPFDHWRTANSICGENSTG-Ahx-G-Ahx-FIFTECFP-NH₂

Sequenz **b12epi-M(scr)**

Dieses Peptid ist genau wie die verkürzten Peptidvarianten nicht fähig, die Bindung von b12 an gp120 zu unterbinden.

Aus diesen Beobachtungen kann man schlussfolgern, dass die Aktivität von **b12epi-M** sowohl von der Sequenz als auch von der räumlichen Anordnung der Aminosäuren abhängt. Dies ist für mimetische Peptide typisch und bestätigt die richtige Auswahl relevanter Sequenzabschnitte für das **b12epi-M** während des Peptiddesigns.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit **b12epi-M** ein Peptid auf der Basis der Komplexkristallstruktur von b12 und gp120 entworfen und synthetisiert wurde, welches wie **CD4bs-M** in der Lage ist, sowohl die b12 - gp120 als auch die CD4 - gp120 Interaktion zu inhibieren. Dabei ist **b12epi-M** aufgrund des geringeren IC₅₀-Wertes von 1,57 μM bzw. 1,75 μM der potentere Inhibitor. Es fällt auf, dass **CD4bs-M** und **b12epi-M** in beiden kompetitiven Assayformaten unabhängig davon, ob CD4 oder b12 immobilisiert wurde, die gleichen IC₅₀-Werte aufweisen und die Kurvenverläufe annähernd deckungsgleich sind. Deshalb wird im nächsten Abschnitt die Frage behandelt, ob es möglich ist, **b12epi-M** selektiver für b12 als für CD4 zu gestalten.

6.2.4 Erhöhung der Selektivität von b12epi-M gegenüber b12

Das Mimetikum des b12 Epitops **b12epi-M** ist vom gp120 des HIV-1-Stamm HXBc2 abgeleitet worden. Dieser HIV-Stamm gehört zum Clade B und ist sowohl durch lösliches CD4 als auch durch b12 *in vitro* neutralisierbar¹⁶⁷. Die Infektion von CD4⁺-Zellen wird also durch Bindung von b12 bzw. sCD4 an das Env-Trimer des Virions verhindert. In der Natur gibt es HIV-1 Isolate (z.B.3988.25), bei welchen die Infektion *in vitro* durch lösliches sCD4 nur schlecht bis gar nicht inhibiert werden kann, b12 jedoch aktiv ist¹⁶¹. Eines dieser Isolate heißt 3988.25 und zeichnet sich durch drei Mutationen (P369A, I171L und T173M) im *CD4-binding loop* des gp120 und zwei Mutationen im *outer domain exit loop* aus, welcher allerdings nicht im **b12epi-M** präsentiert ist. Mit Hilfe des Peptids **b12epi-M(ALM)** wurde der Effekt dieser Dreifach-Mutation im *CD4-binding loop* auf die Selektivität des Peptids untersucht. Da außerdem gp120-Mutanten mit der Punktmutation P369A und deren Effekt auf die b12- bzw. CD4-Bindung in der Literatur beschrieben wurden¹⁶⁸, wurde auch diese Variation in Form des Peptids **b12epi-M(P->A)** synthetisiert und untersucht.

Biotin-Ahx-**SGGDAELVM**HWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Ahx-G-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(ALM)

Biotin-Ahx-**SGGDAEIVT**HWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Ahx-G-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(P->A)

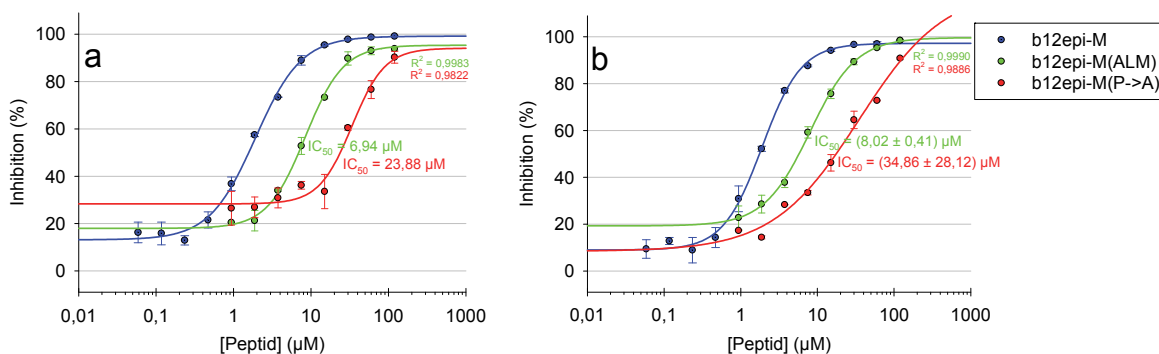


Abb. 27 Einfluss der Punktvariationen von b12epi-M auf die Inhibition der b12 – gp120 Interaktion [a] und die CD4-gp120 Interaktion [b]: Beschichtung (b12) 0,2 μg/mL [a] bzw. (CD4) 1 μg/mL [b], Ligand (gp120) 0,5 μg/mL, Detektion α-gp120

Beide Varianten von **b12epi-M** inhibieren die b12 - gp120 Interaktion nicht so effizient wie **b12epi-M**. **b12epi-M(ALM)** weist einen IC₅₀-Wert von 6,94 μM auf und **b12epi-M(P->A)** sogar einen IC₅₀-Wert von 23,88 μM (Abb. 27a). Das Einführen des Alanins an Stelle des Pro369 im **b12epi-M** reduziert also die Fähigkeit, die b12 - gp120 Bindung zu unterdrücken. Der Einfluss der zwei weiteren eingeführten Punktvariationen im **b12epi-M(ALM)** kompensiert den Aktivitätsverlust durch den P369A Austausch teilweise, die Effizienz des **b12epi-M** kann dadurch allerdings nicht komplett zurückgewonnen werden.

Vergleicht man die Kurvenverläufe der drei Peptide im kompetitiven Assay mit b12 bzw. CD4 (Abb. 27b) fällt wieder auf, dass sie für beide Proteine sehr ähnlich sind. Anhand der ähnlichen IC_{50} -Werte lässt sich in diesem kompetitiven Assayformat in beiden Fällen keine Veränderung der Selektivität hin zu b12 feststellen, da man dann einen kleineren IC_{50} -Wert für die b12-gp120-Interaktion als für die CD4-gp120-Interaktion erwarten würde. Deshalb wurden zusätzlich direkte Bindungsassays durchgeführt, um zu untersuchen, ob zumindest bei der direkten Erkennung der Bindungspartner eine Veränderung der Selektivität der Peptide beobachtet werden kann.

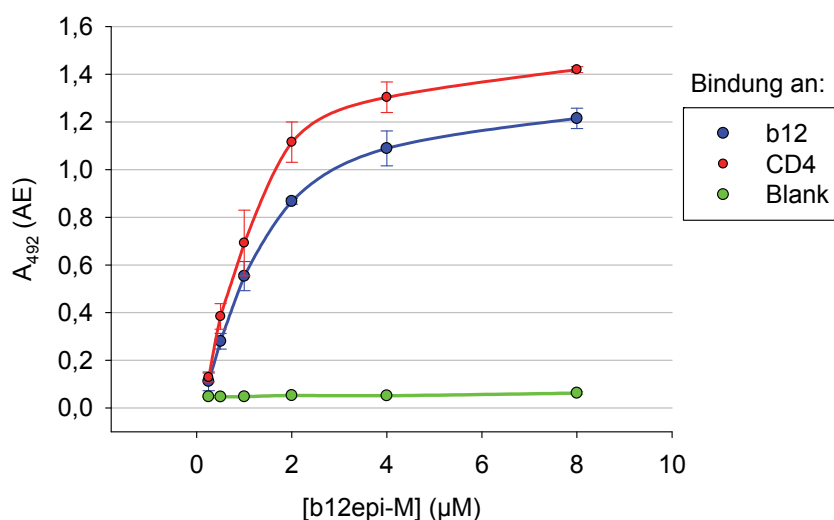


Abb. 28 Bindung von b12epi-M an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Detektion α-Biotin

Abb. 28 zeigt die direkte Bindung von **b12epi-M** an b12 und CD4. Die Menge an gebundenem **b12epi-M** nimmt für steigende Konzentrationen sowohl für b12 als auch für CD4 zu und scheint einer Sättigung zuzustreben. **b12epi-M** bindet also konzentrationsabhängig an b12 und CD4. Um Unterschiede durch Detektionszeiten und schwankende Zimmertemperaturen zwischen verschiedenen Experimenten zu kompensieren und sie direkt vergleichbar zu machen, wurde **b12epi-M** bei allen weiteren Experimenten als Referenzsubstanz mituntersucht und die gemessene Extinktion als relative Signalstärke bezogen auf **b12epi-M** ausgedrückt.

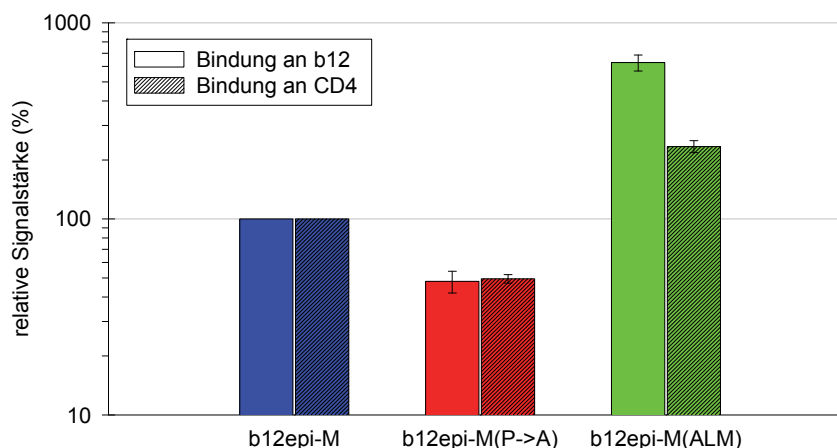


Abb. 29 Bindung von b12epi-M und den Punktvarianten an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion α-Biotin

In Abb. 29 wird die relative Signalstärke der Peptide **b12epi-M(P->A)** und **b12epi-M(ALM)** für die direkte Bindung an b12 und CD4 im Bezug auf **b12epi-M** gezeigt. Die Extinktion des **b12epi-M** wurde dazu auf 100 % gesetzt und die der beiden anderen Peptide proportional angepasst. Das **b12epi-M(P->A)** bindet mit 48,0 % und 49,5 % in gleichem Maße schlechter an b12 und CD4 als **b12epi-M**. Dieses Ergebnis passt qualitativ zu dem der kompetitiven ELISA Experimente, bei denen die Kompetitionsfähigkeit des **b12epi-M(P->A)** im Vergleich zu **b12epi-M** ebenfalls ähnlich stark verringert war. Auch in diesem Experiment kann für **b12epi-M(P->A)** keine Veränderung der Selektivität gegenüber b12 oder CD4 festgestellt werden, obwohl in der Literatur beschrieben wurde, dass eine P369A-Mutation eines gp120 JR-CSF zu einer leichten Verstärkung der Bindung durch b12 und CD4 führt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Konformation des *CD4-binding loops* im mutierten Protein durch Wechselwirkungen mit den umgebenden anderen Teilen des gp120 noch ausreichend stabilisiert wird und so ein positiver Effekt auf die b12 Bindung möglich ist, während diese Stabilisierung im **b12epi-M(P->A)** nicht stattfinden kann und somit der Effekt der Erhöhung der konformationellen Freiheit durch Einführen des Alanins anstelle von Prolin im Peptid viel stärker zum Tragen kommt. Dies könnte dazu führen, dass Konformationen, die für eine Bindung günstig sind, seltener eingenommen werden.

b12epi-M(ALM) zeigt eine stärkere Bindung an b12 und CD4 als **b12epi-M**. Da der IC_{50} -Wert von **b12epi-M(ALM)** für die Interaktion von b12 und CD4 mit gp120 höher war als der von **b12epi-M**, war das ein unerwartetes Ergebnis. Im Gegensatz zu **b12epi-M(P->A)** zeigt **b12epi-M(ALM)** eine leichte Selektivitätssteigerung hin zu b12. Die relative Signalstärke für b12 beträgt 630 %, die für CD4 nur 230 %. Das relative Signal für die b12-Bindung ist also ca. 2,7 Mal höher.

Die Tatsache, dass Effekte, welche durch Proteinmutationen herbeigeführt werden können, qualitativ durch ein entsprechendes Peptid, hier **b12epi-M**, nachgeahmt werden können, bestätigt zusätzlich das gewählte Design des **b12epi-M**.

6.2.5 Optimierung von b12epi-M

Eine weitere Optimierung des **b12epi-M** war dennoch notwendig, da das Peptid, genauer gesagt eine Variante **b12epi-M(lac)-Cys**, bei der die Cysteinbrücke durch eine Lactambrücke ersetzt und ein zusätzliches Cystein zur Konjugation angefügt worden war, keine mit gp120 kreuzreaktive oder neutralisierende Immunantwort in Kaninchen auslöste (Abb. 30).

Ac-**SGGDPEIVTHWFNSGGEFFY-[Asp-NSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLP-Dpr]-RI-Ahx-G-Ahx-Cys(H)-NH₂**
 Sequenz b12epi-M-Cys(lac)

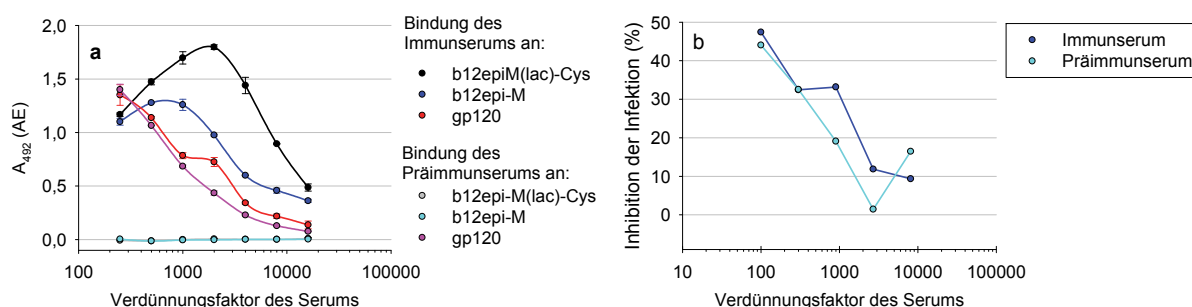


Abb. 30 Verhalten der Kaninchenserum: (a) Bindung von Immun- und Präimmunsereum an b12epi-M, b12epi-M-Cys(lac) und gp120; Beschichtung: 16,7 nM; Detektion: α -Kaninchen

Sowohl Immunserum als auch Präimmunsereum erkannten gp120 und neutralisierten die Infektion in gleichem Maße, weshalb beide Eigenschaften keine Folge der durchgeführten Immunisierung sein können.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den Immunisierungsversuchen mit **CD4bs-M** kann man sagen, dass **b12epi-M(lac)-Cys** anders als **CD4bs-M** in Kaninchen nicht in der Lage ist, das Immunsystem zu einer kreuzreaktiven oder gar HIV-1-neutralisierenden Immunantwort zu stimulieren.

Möglicherweise sorgte das Einbringen der Lactambrücke statt der nativen Disulfidbrücke dafür, dass die wichtigen Aminosäurereste nicht so im **b12epi-M-Cys**-KLH-Konjugat präsentiert werden, dass gp120-kreuzreaktive Antikörper als Immunantwort hervorgebracht werden können. Neben der Verwendung eines **b12epi-M**-Derivates mit Disulfidbrücke in Kombination mit einer anderen Konjugationsstrategie zur Immunisierung könnte außerdem eine Optimierung des **b12epi-M** selbst zu einem verbesserten Immunogen führen. Hierzu

wurde die Komplexkristallstruktur von b12 und dem gp120-Protein noch einmal im Detail betrachtet.

In der b12-gp120-Komplexstruktur liegt eine ungewöhnliche Wechselwirkung zwischen einem N-Acetylglucosamin-Rest, der sich am Stamm des V4-*loops* befindet (siehe Abb. 31), und dem Rückgrat des b12 Antikörpers vor. Um eine solche Interaktion auch auf Peptidebene zu ermöglichen, wurde entsprechend ein N-acetylglucosaminhaltiges Asparagin in die Sequenz des **b12epi-M** eingeführt und so **b12epi-M(NAcGlc)** hergestellt.

Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCN(NAcGlc)SAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
Sequenz b12epi-M(NAcGlc)

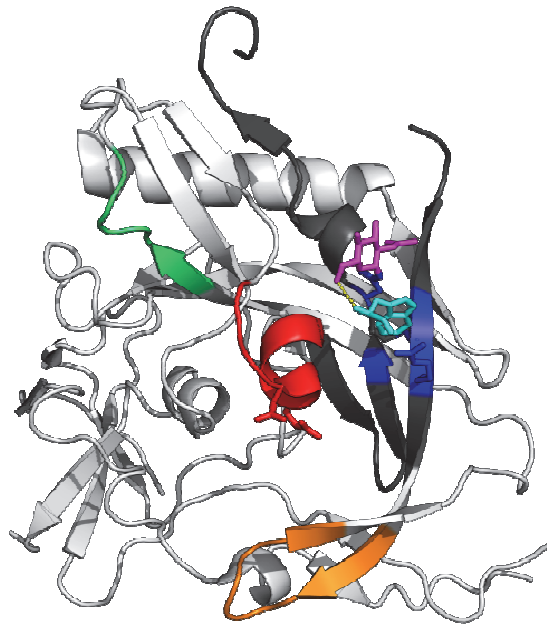


Abb. 31 Struktur des Herzstückes des gp120 HXBc2 Proteins (grau) im Komplexkristall mit b12 (PDB 2NY7). Die Farbgebung ist identisch zu Abb. 19. und der N-Acetylglucosamin-Rest ist in magenta dargestellt.

Zunächst wurde **b12epi-M(NAcGlc)** im direkten Bindungsassay untersucht.

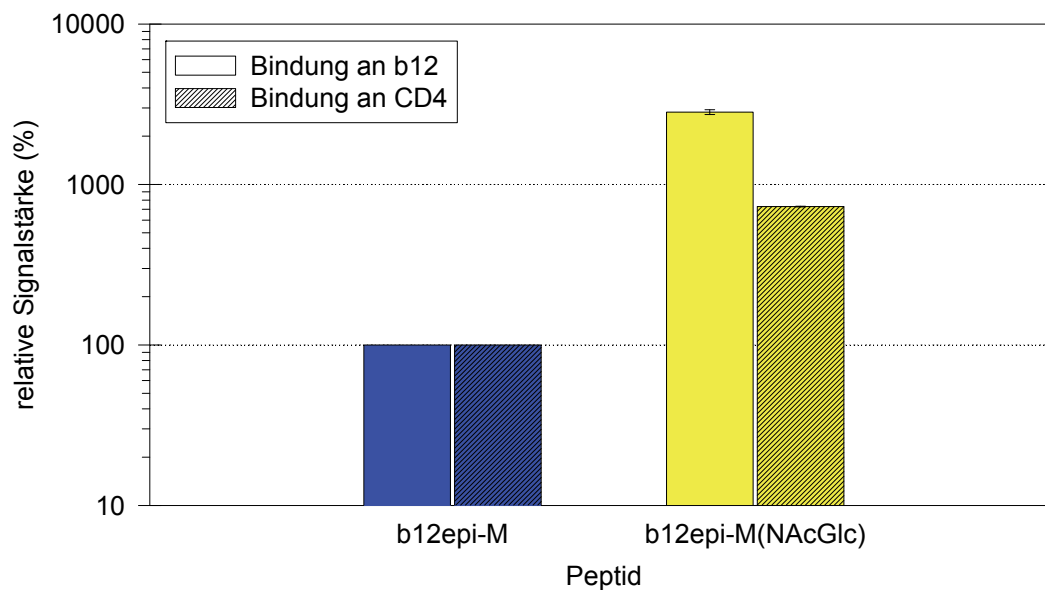


Abb. 32 Bindung von b12epi-M und dem aminozuckerhaltigen b12epi-M(NAcGlc) an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion α-Biotin

Das Einführen des Zuckerrestes in das Peptid verstärkt die Bindung sowohl an b12 als auch an CD4 auf das 28- bzw. 7,3-fache. Zusätzlich kann hier erneut genau wie bei **b12epi-M(ALM)** eine erhöhte Selektivität des Peptids für b12 beobachtet werden (ca. vierfach), was für eine gelungene Optimierung des **b12epi-M** spricht (Abb. 32).

Im kompetitiven b12 - gp120 Bindungsassay konnte dies allerdings nicht bestätigt werden.

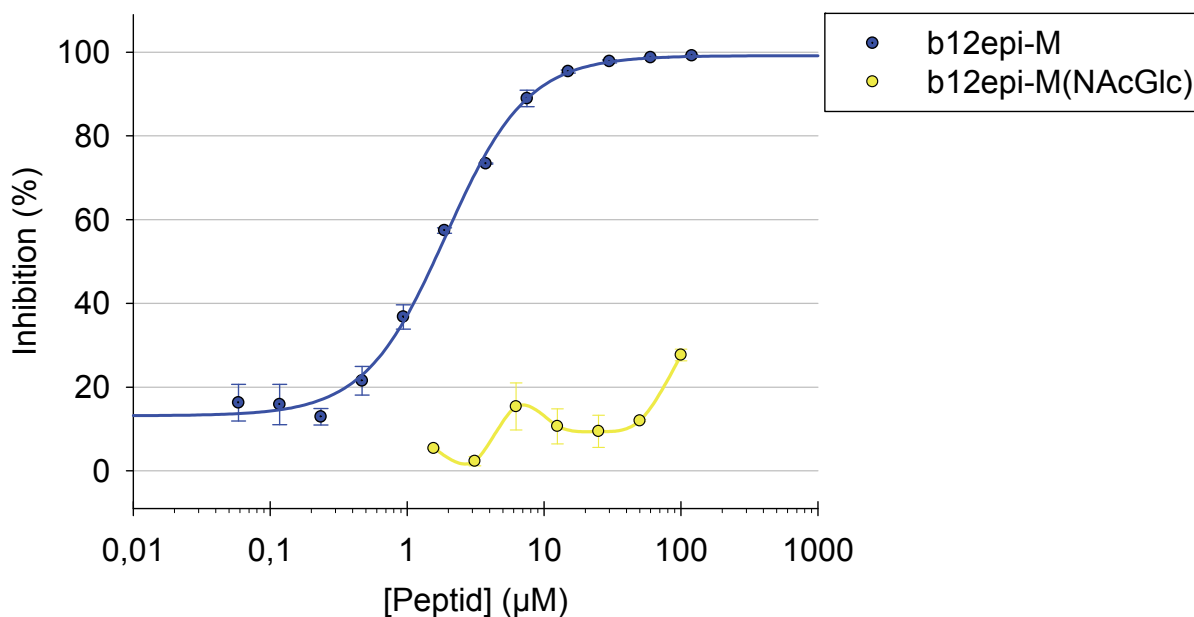


Abb. 33 Einfluss von b12epi-M und b12epi-M(NAcGlc) auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120

Die Einführung des N-Acetylglucosamin-Restes im **b12epi-M(NAcGlc)** führt zu einem Verlust der Fähigkeit, die b12 - gp120 Interaktion zu stören (Abb. 33). Dass bei einer

Konzentration von 100 μM keine 30 % Inhibition erreicht wurden, war sehr überraschend, da man bei einer derart verstärkten direkten Bindung auch einen kleineren IC_{50} -Wert erwarten würde. Im untersuchten Konzentrationsbereich lässt sich dieser für **b12epi-M(NAcGlc)** jedoch nicht bestimmen. Diese Beobachtungen konnten nur so interpretiert werden, dass das zuckerhaltige Peptid zwar stärker an b12 bindet, jedoch nicht mehr spezifisch an die CDR-Regionen des b12, sondern vornehmlich an andere Bereiche des b12, wodurch es nicht mehr zur Competition um Bindung mit gp120 im untersuchten Konzentrationsbereich kommen kann.

Die HPLC-Retentionszeiten (Kap. 9.2) des gereinigten **b12epi-M** mit 8,71 min und des **b12epi-M(NAcGlc)** mit 8,40 min unterscheiden sich um über 0,3 min. **b12epi-M(NAcGlc)** scheint deutlich polarer zu sein. Um zu untersuchen, ob die bloße Erhöhung der Polarität durch Einführung des hydrophilen Zuckers oder auch andere Effekte die Ursache für das kontroverse Verhalten von **b12epi-M** und **b12epi-M(NAcGlc)** in direktem und kompetitiven Bindungsassay sind, wurden neue Peptide entworfen und synthetisiert, welche nicht in der putativen Bindungsregion des **b12epi-M** variiert wurden, sondern in der Region der künstlich eingeführten Platzhalteramino-säuren Ahx-G-Ahx. Die ϵ -Aminohexansäure wurde durch die hydrophile 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (Aoa) ersetzt, Glycin durch das OH-gruppenhaltige Serin oder Prolin. Prolin könnte einen Knick der Sekundärstruktur induzieren, da es in Proteinen oft in Schleifen zu finden ist ¹⁶⁹, häufiger *cis*-Peptidbindungen ausbildet als andere proteinogene Aminosäuren ¹⁷⁰ und so die Ausbildung einer Schleife begünstigen könnte. Eine stabilisierte Schleifenausbildung könnte auch einen Effekt auf die Struktur des V4-loop Stamms um die Disulfidbrücke haben. Durch Kombination ergaben sich daraus fünf neue von **b12epi-M** abgeleitete Peptide.

Biotin-Ahx-**SGGDPEIV**THWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Ahx-P-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(XPX)

Biotin-Ahx-**SGGDPEIV**THWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Ahx-S-Ahx-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(XSX)

Biotin-Ahx-**SGGDPEIV**THWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Aoa-G-Aoa-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(OGO)

Biotin-Ahx-**SGGDPEIV**THWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Aoa-P-Aoa-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(OPO)

Biotin-Ahx-**SGGDPEIV**THWFNSGGEFFY**CNSAQLF**-Aoa-S-Aoa-TITL**PCRI**-NH₂

Sequenz b12epi-M(OSO)

Diese Peptide wurden nun parallel zu **b12epi-M** erneut im direkten und kompetitiven Assayformat untersucht.

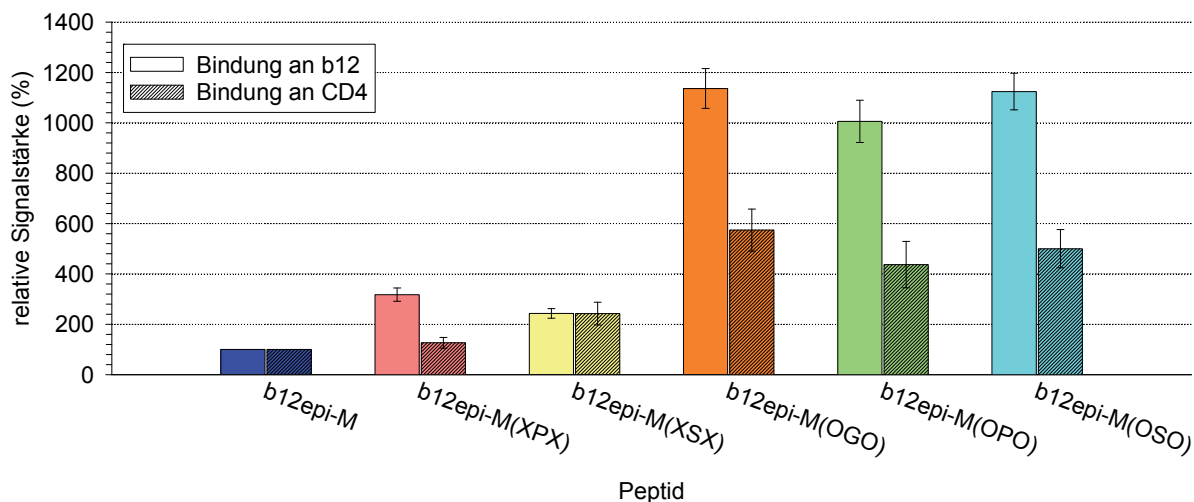


Abb. 34 Bindung von b12epi-M und von den V4-loop-Varianten an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion α-Biotin

Die neuen b12epi-M-Varianten zeigen alle sowohl an b12 als auch an CD4 eine stärkere Bindung als **b12epi-M** selbst, wobei in 4 von 5 Fällen die direkte Bindung an b12 zwei- bis dreimal stärker ist als an CD4 (Abb. 34). Nur für **b12epi-M(XSX)** gilt letzteres nicht. Die stärksten Bindungen zeigen die Peptide, welche 8-Amino-3,6-dioxaoctansäuren in ihren Sequenzen aufweisen.

Wie **b12epi-M(NAcGlc)** verhalten sich diese (**b12epi-M(OGO)**, **b12epi-M(OSO)**, **b12epi-M(OPO)**) in Wettbewerbsversuchen auch entgegengesetzt zu den Bindungsassays und sind diejenigen, welche im untersuchten Konzentrationsbereich keine 40% Inhibition erreichen (Abb. 35).

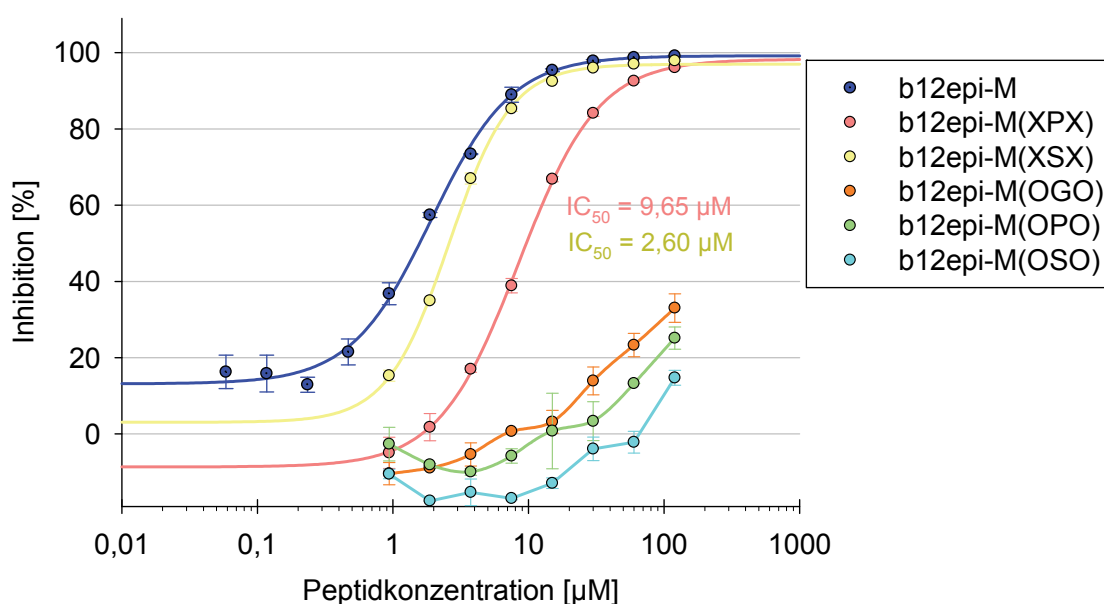


Abb. 35 Einfluss von b12epi-M und den V4-loop-Varianten auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120

b12epi-M(XSX) und **b12epi-M(XPX)** verlieren in diesem Assay hingegen kaum an Aktivität und es lassen sich IC_{50} -Werte von 2,60 μ M bzw. 9,65 μ M bestimmen.

Das Einbringen der polaren Aminosäure Aoa verstärkt also in allen Peptiden die direkte Bindung an b12 gegenüber **b12epi-M** enorm, während die Fähigkeit zur Inhibition der b12-gp120 Interaktion weitgehend verloren geht. Qualitativ lässt sich dieser gegensätzliche Verlauf auch beim Vergleich der Ahx-haltigen Peptide beobachten. **b12epi-M(XPX)** bindet am stärksten an b12 und **b12epi-M** am schwächsten, jedoch ist **b12epi-M** der beste Inhibitor ($IC_{50} = 1,57 \mu$ M) im kompetitiven Assay und **b12epi-M(XPX)** der schwächste ($IC_{50} = 9,65 \mu$ M) in diesem Vergleich. Zusammenfassend erhöht das Einbringen von hydrophilen Gruppen in das **b12epi-M** in jedem Fall die direkte Bindung und senkt die Kompetitionsfähigkeit im b12-gp120-Bindungsassay. Dies lässt auf einen zugrundeliegenden Mechanismus schließen, der im Zusammenhang mit der Löslichkeit der Peptide steht.

Eine direkte Korrelation der erhöhten Hydrophilie mit der verstärkten direkten Bindung bzw. erhöhtem IC_{50} -Wert lässt sich daraus allerdings nicht ableiten, da es mit **b12epi-M(XPX)** eine Ausnahme gibt, die zwar auch eine erhöhte direkte Bindung und eine geringere Aktivität im kompetitiven Assay zeigt, aber gleichzeitig mit einer Retentionszeit von 8,79 min hydrophober als **b12epi-M** ist. Das eingebrachte Prolin stabilisiert möglicherweise tatsächlich eine Schleife im Peptid, was einen positiven Effekt auf die Struktur des Peptids am V4-loop Stamm oder im Ganzen haben könnte.

Dass der Aufbau der Platzhalter-Region im Peptid jedoch so entscheidend für das Verhalten eines b12 Epitop Mimetikums des **b12epi-M**-Typs spielt, wurde nicht erwartet und weckte Zweifel an der angenommenen Bindungshypothese, dass **b12epi-M** und dessen Varianten mit den CDRs der antigenbindenden Domäne des b12 ähnlich wie gp120 interagieren, wofür sie entworfen worden waren. Würden alle **b12epi-M**-Varianten der Hypothese folgen, dürfte die Variation der Platzhalteramino-säuren keinen derart starken, gegenläufigen Einfluss in beiden Assayformaten haben, weil sie potentiell nicht an den Interaktionen mit b12 beteiligt sein sollten. Wenn die direkte Bindung, vor allem von **b12epi-M(OGO)**, **b12epi-M(OSO)** und **b12epi-M(OPO)**, aber nicht durch Bindung an die CDRs des b12 zustande kommt, stellt sich die Frage, woher die beobachtete Konkurrenz für **b12epi-M** dann rührt.

Eine echte Optimierung des **b12epi-M** durch Einbringen des N-Acetylglucosaminrestes wurde also nicht erreicht, stattdessen lieferten die Folgeversuche mit den Peptiden, in welchen die Platzhalterregionen variiert wurden, neue Daten, die an diesem Punkt nur schwer interpretiert werden können. Im folgenden Kapitel wurde deshalb untersucht, ob die Inhibition der b12-gp120-Interaktion durch **b12epi-M** möglicherweise durch Bindung an gp120 ausgelöst wird.

6.3 Bindung von b12epi-M an HIV-1 gp120

Die beobachtete Inhibition der b12-gp120-Interaktion durch **b12epi-M** und einiger seiner Varianten kann nicht nur durch die Bindung an das immobilisierte b12 zustande kommen, sondern ebenso durch Bindung an gp120. Deshalb wurde untersucht, ob **b12epi-M** auch an gp120 bindet.

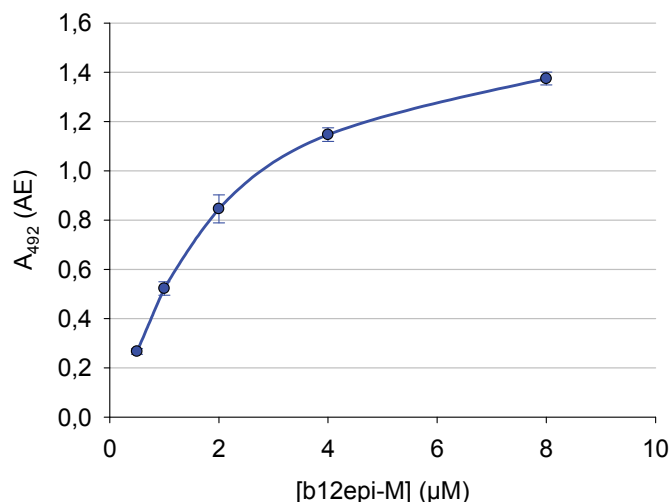


Abb. 36 Bindung von b12epi-M an gp120: Beschichtung (gp120) 1 µg/mL; Detektion: α-Biotin

In Abb. 36 sieht man, dass **b12epi-M** nicht nur an b12 oder CD4 (Abb. 28) bindet, sondern auch konzentrationsabhängig an gp120. Wenn ungeachtet der Bindung von **b12epi-M** an b12 oder CD4 die Bindung an gp120 die Ursache für das Kompetitionsverhalten in den kompetitiven Assayformaten wäre, würde man erwarten, dass die Bindung derjenigen Varianten, die die b12-gp120-Interaktion nur schlecht inhibieren auch nur schwach an gp120 binden.

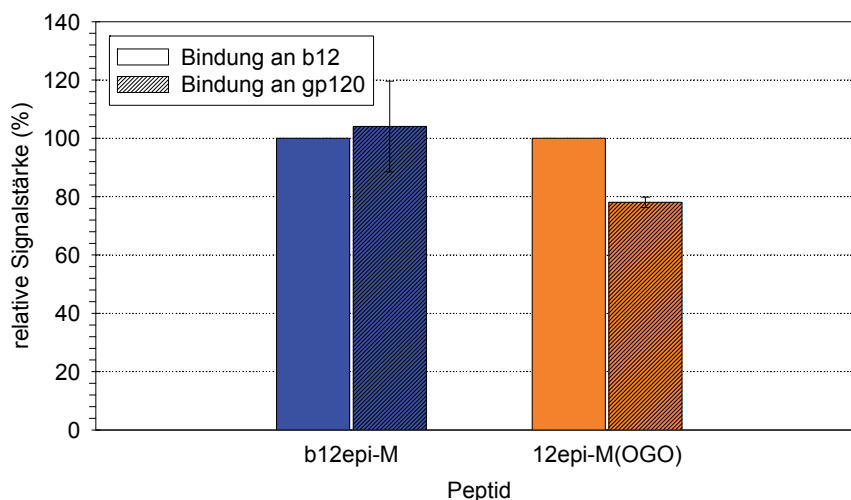


Abb. 37 Bindung von b12epi-M und von b12epi-M(OGO) an b12 und gp120: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (gp120) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion: anti-Biotin-HRP. Die Bindung der beiden Peptide jeweils an b12 wurde auf 100 % gesetzt und die Bindung an gp120 relativ dazu dargestellt.

Vergleicht man nun exemplarisch die Bindung von **b12epi-M(OGO)** an b12 und gp120 mit **b12epi-M** erkennt man, dass **b12epi-M** in der Tat bei den gewählten Beschichtungskonzentrationen gleich stark an b12 und gp120 bindet, **b12epi-M(OGO)** hingegen ca. 20 % weniger Bindung an gp120 zeigt als an b12. Die geringe Konkurrenz von **b12epi-M(OGO)** im kompetitiven b12 – gp120 Bindungsassay könnte deshalb möglicherweise tatsächlich mit der geringeren Bindung an gp120 zusammenhängen und somit die Bindung an gp120 ebenfalls für die beobachteten Kompetitionen verantwortlich sein. Berücksichtigt man jedoch auch den direkten Vergleich der Bindungen von **b12epi-M** und **b12epi-M(OGO)** an b12 (Abb. 34), bei dem **b12epi-M(OGO)** ein mehr als zehnfach stärkere Bindung an b12 als **b12epi-M** zeigt, so kann auch die Bindung der b12-Epitop-mimetischen Peptide an gp120 nicht der alleinige Grund für die kontroversen Ergebnisse der direkten und kompetitiven Bindungsassays sein. Fasst man beide Versuche zusammen, erhält man absolut gesehen für **b12epi-M(OGO)** immer noch eine 887 % stärkere Bindung an gp120 als für **b12epi-M**.

6.4 Aggregationspotential von b12epi-M und dessen Varianten

Im Jahr 2013 wurde das gp120-abgeleitete Peptid **ef-c** beschrieben, welches die HIV-1 Infektion verstärkt. Es überlappt mit dem N-Terminus den C-Terminus von **b12epi-M**. Seine Fähigkeit die HIV-1-Infektion zu verstärken steht mit Fibrillenbildung in Verbindung, was unter anderem mit Hilfe eines amyloidspezifischen ThT-Bindungsassay gezeigt werden konnte.¹⁷¹

Da sowohl die Sequenzen von **ef-c** als auch **b12epi-M** von überlappenden Bereichen der äußeren Domäne des gp120 abgeleitet wurden, wurde **b12epi-M** im ThT-Bindungsassay untersucht und die Emissionsspektren analog einer in der Literatur für **ef-c** beschriebenen Methoden aufgenommen¹⁷¹ (Abb. 38).

H-QCKIKQINMWQ-OH
Sequenz ef-c

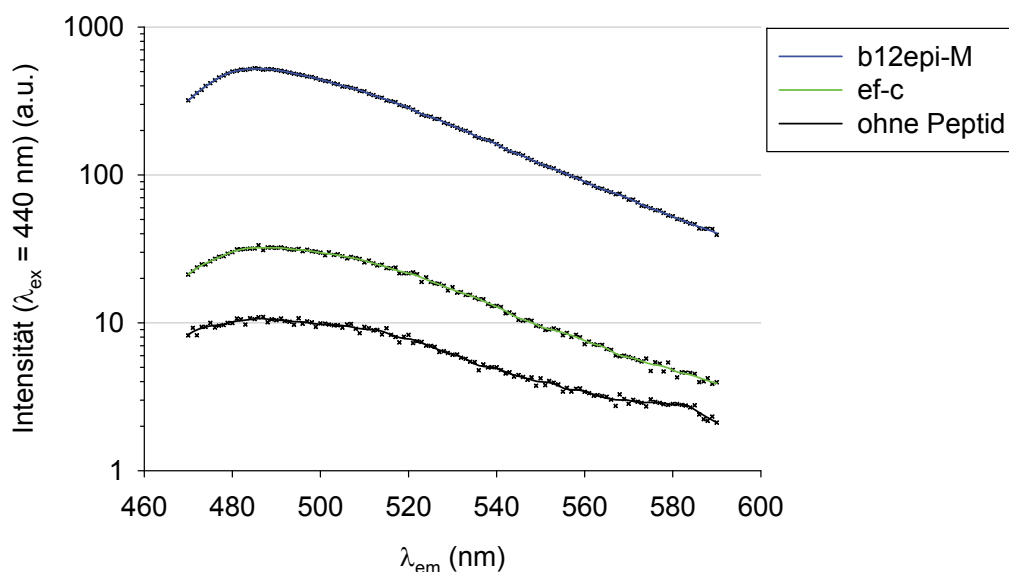


Abb. 38 Emissionsspektren von ThT in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 in Anwesenheit von 25 μ M b12epi-M bzw. ef-c und ohne Peptidzusatz

b12epi-M verstärkt in diesem Assay die Fluoreszenz des ThT sogar noch ca. 20 mal stärker als **ef-c**. Dies lässt vermuten, dass b12epi-M im wässrigen Milieu aggregiert. Deshalb wurden auch die anderen Varianten von **b12epi-M** untersucht, welche zuvor kontroverse Ergebnisse geliefert hatten. Damit die Ergebnisse besser mit den durchgeführten Bindungsassays vergleichbar waren, in denen als Lösemittel nicht DMSO sondern MeCN:HPW 50:50 + 0,1 % TFA verwendet wurde, wurden die Peptide in beiden Lösemitteln gelöst und vermessen.

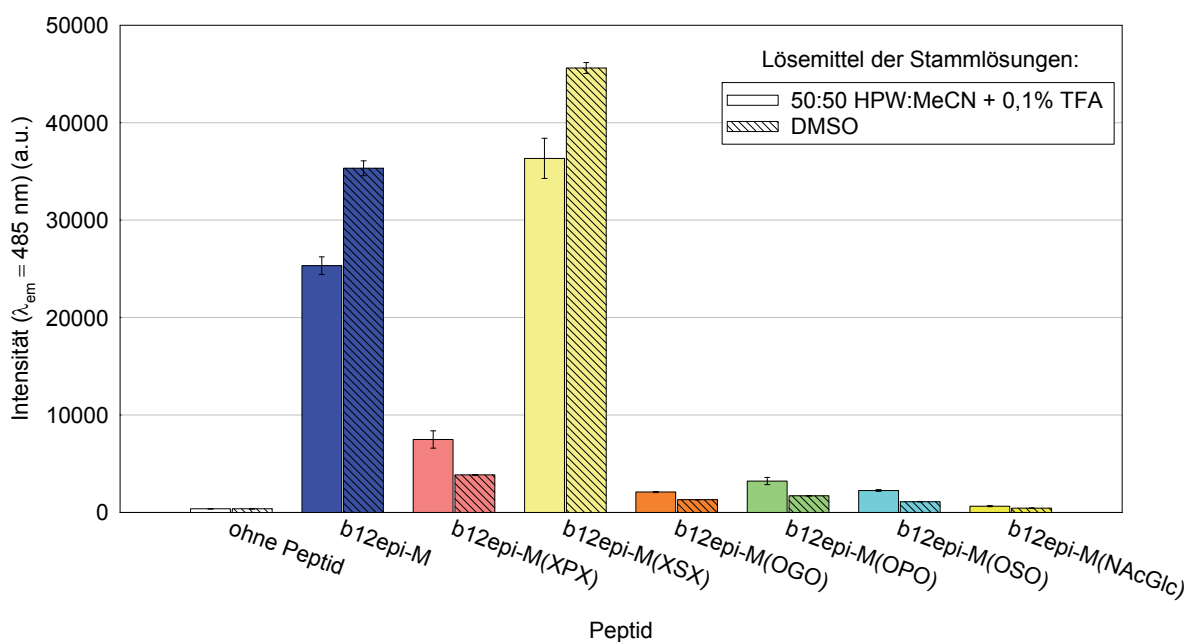


Abb. 39 ThT-Bindungsassay in Anwesenheit von b12epi-M bzw. einiger Varianten (25 μ M): 2,5 mM Stammlösungen in HPW:MeCN 50:50 + 0,1% TFA bzw. DMSO 100-fach mit Thioflavinlösung verdünnt

Zunächst erkennt man, dass das Lösemittel, mit welchem die Stammlösung angesetzt wurde, einen Einfluss auf die Verstärkung des Fluoreszenzsignals hat. Dabei gibt es sowohl Peptide, bei denen das Fluoreszenz-Signal nach Verdünnung in ThT-Puffer aus einer DMSO-Stammlösung höher ist, als auch Peptide, bei denen dies für die MeCN:HPW-Stammlösung der Fall ist.

b12epi-M(OGO), **b12epi-M(OPO)**, **b12epi-M(OSO)** und **b12epi-M(NAcGlc)** weisen die geringste ThT-Fluoreszenzverstärkung auf und sind auch die Peptide, welche im kompetitiven Assay kaum aktiv sind (Abb. 35). Die beiden aktivsten Peptide im ThT-Bindungsassay (**b12epi-M** und **b12epi-M(XSX)**) sind auch diejenigen, die im kompetitiven Assay am aktivsten waren.

Die untersuchten Peptide können also in drei Kategorien eingeteilt werden (Abb. 40a). **b12epi-M** und **b12epi-M(XSX)** werden dabei der ersten Kategorie zugeordnet, welche sich durch eine gute Inhibition der b12-gp120-Interaktion und eine hohe ThT-Fluoreszenzverstärkung, aber eine vergleichsweise geringe Bindung an b12 bzw. CD4 auszeichnet. Die zweite Kategorie umfasst die Peptide **b12epi-M(OGO)**, **b12epi-M(OPO)**, **b12epi-M(OSO)** und **b12epi-M(NAcGlc)** und weist genau entgegengesetzt zur ersten Gruppe eine geringe Inhibitionsfähigkeit und ThT-Fluoreszenzverstärkung auf, aber eine starke Bindung an b12 und CD4. Die dritte Kategorie umfasst nur einen Vertreter **b12epi-M(XPX)** und ihre Eigenschaften können als gemäßigt betrachtet werden. **b12epi-M** zeigt eine mäßige ThT-Fluoreszenzverstärkung, welche um Faktor zwei bis vier höher liegt als für die Aoa-haltigen Peptide, jedoch deutlich geringer als für **b12epi-M** und **b12epi-M(XSX)**. Die Fähigkeit der Inhibition der b12-gp120-Interaktion ist mit einem IC_{50} -Wert von 9,65 μ M etwas geringer als bei **b12epi-M** und **b12epi-M(XSX)**, jedoch deutlich höher als bei den Vertretern der zweiten Kategorie, für die keine IC_{50} -Werte bestimmbar waren. Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen der stark erhöhten ThT-Fluoreszenz, welche das Vorliegen von amyloidartigen Faltblattstrukturen anzeigen kann, und der Fähigkeit an b12 und CD4 zu binden bzw. die b12/CD4 – gp120 Interaktion zu inhibieren. Um diesen Zusammenhang graphisch darzustellen wurde die ThT-Fluoreszenzverstärkung auf die relative Bindung der Peptide an b12 bezogen.

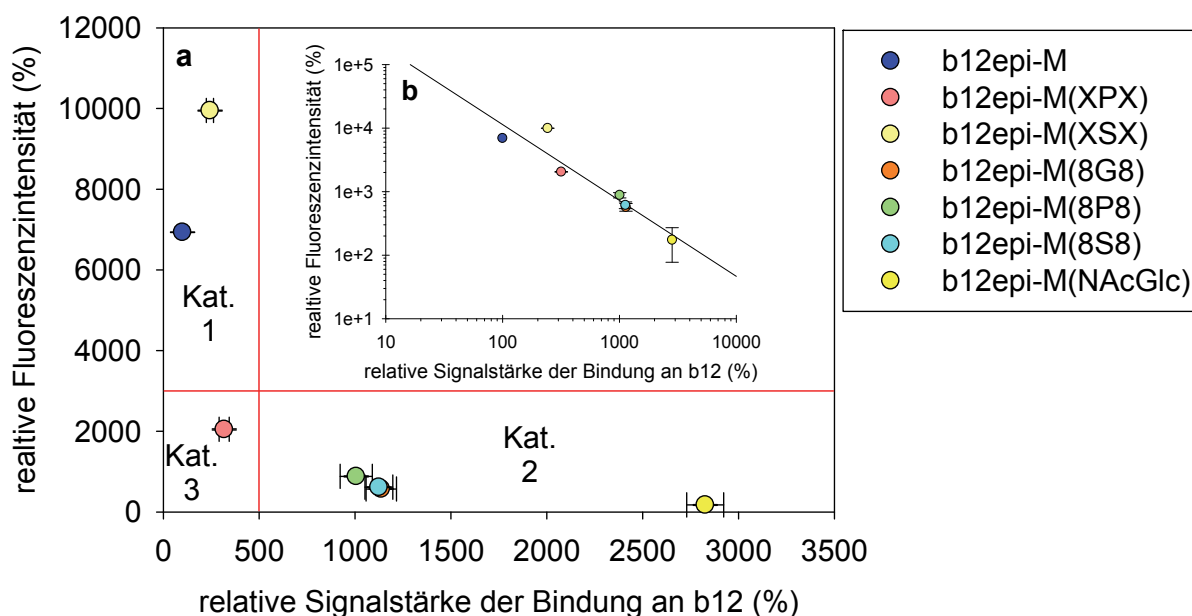


Abb. 40 Zusammenhang zwischen der relativen, auf b12epi-M bezogenen Bindungsstärke der b12epi-M-Varianten an b12 und deren Fluoreszenzsignal im ThT-Bindungsassay: doppeltlineare Darstellung [a] und doppeltlogarithmische Darstellung [b]

Die aufgespannte Fläche der doppelt linearen Darstellung dieses Zusammenhangs (Abb. 40a) lässt sich in vier Rechtecke unterteilen, wobei die einzelnen Peptide jeweils in einem der drei Rechtecke zu finden sind, die die Kategorien beschreiben. Durch die doppeltlogarithmische Darstellung ist gut zu erkennen, dass zwischen beiden Messgrößen ein Zusammenhang besteht, da sie mit einer Geraden gut angenähert werden können (Abb. 40b). Je höher die Fluoreszenzintensität ist, desto geringer ist die relative Signalstärke.

b12epi-M(XPX) stellt währenddessen einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Optimierung des **b12epi-M** dar, da seine ThT-Fluoreszenzverstärkung im Vergleich zu **b12epi-M** deutlich vermindert wurde, die Fähigkeit die b12-gp120-interaktion zu inhibieren aber nahezu erhalten bleibt.

6.5 Zusammenhang zwischen Infektionsinduktion, Aggregation und Fibrillenbildung

Aufgrund der beobachteten hohen Fluoreszenzverstärkung des **b12epi-M** im ThT-Bindungsassay wurde nun untersucht, ob **b12epi-M** wie **ef-c** in der Lage ist, die HIV-1-Infektion zu verstärken. Hierzu wurden beide Peptide in Infektionsassays mit verschiedenen Zelllinien untersucht.

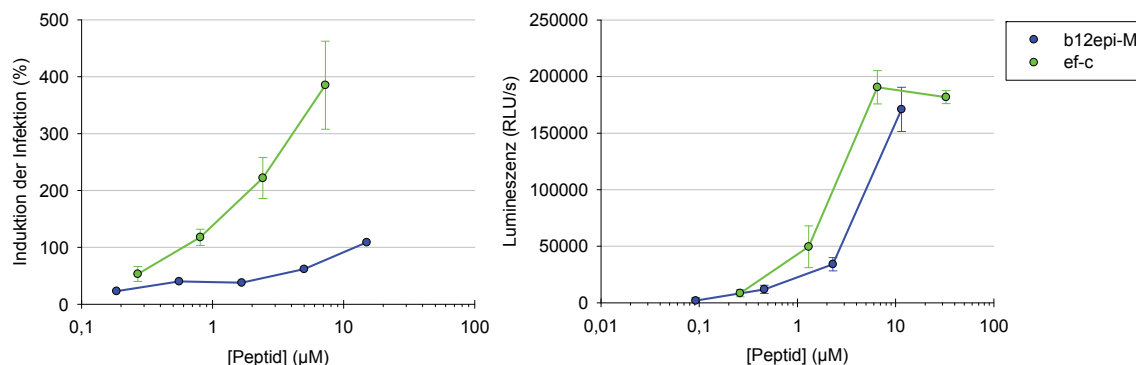


Abb. 41 Infektionsassay mit b12epi-M und ef-c: (a) SEAP-Infektionsassay und (b) TzM-bl-Infektionsassay

Obwohl der Effekt im SEAP-Infektionsassay für **b12epi-M** weniger stark ausgeprägt ist als im TzM-bl-Infektionsassay, so zeigen doch beide Versuche, dass neben **ef-c** auch **b12epi-M** die Infektion mit HIV-1 induziert (Abb. 41). Um zu untersuchen, ob die Wirkungsmechanismen von **b12epi-M** und **ef-c** ähnlich sind, wurde zunächst das ζ -Potential von **b12epi-M** bestimmt. Ein ζ -Potential ist für eine Probe nur dann bestimmbar, wenn Partikel vorliegen, beispielsweise in Form von Aggregaten, deren Oberflächen Ladungen tragen.

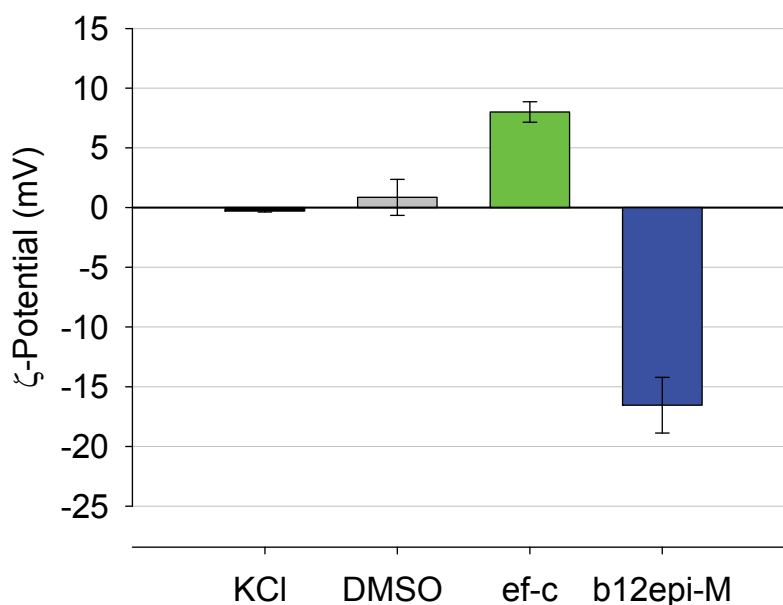


Abb. 42 ζ -Potential von ef-c und b12epi-M. Stammlösemittel DMSO und wässriges KCl wurden zur Kontrolle mitgeführt

Die Nettoladung von **b12epi-M** beträgt -2 und das gemessene ζ -Potential beträgt $-(16,55 \pm 2,3)$ mV. Die Messung verdeutlicht, dass **b12epi-M** im wässrigen Milieu aggregiert und negativ geladene Partikel ausbildet. Bisher wurden nur kationische, polymerbasierte Moleküle^{172–174} oder kationische bzw. ungeladene Peptide in Literatur beschrieben, welche die HIV-1-Infektion verstärken, wie Protaminsulfat¹⁷⁵, Vectofusin-1¹⁷⁶, Peptidfragmente der

prostataspezifischen sauren Phosphatase ^{177,178} sowie anderen Proteinen in Samenflüssigkeit ¹⁷⁹ und der Peptide ef-c ¹⁷¹, P13 und P16 ¹⁸⁰, welche von HIV-1 abgeleitet wurden. Negativ geladenen Peptiden oder sonstigen Molekülen werden oft eine inhibierende Wirkung ^{173,181–185} oder keine Wirkung ¹⁸⁶ auf Virusinfektionen zugeschrieben, nie jedoch infektionsverstärkende Wirkung. Für **ef-c** und die anderen fibrillenbildenden Peptide geht man grundlegend davon aus, dass die gebildeten Fibrillen durch ihre positive Oberflächenladung in der Lage sind, negativ geladene Virionen und Wirtszellmembranen in enge räumliche Nähe zu bringen und so die Verschmelzung des Virions mit der Wirtszellmembran zu unterstützen ¹⁸⁷. Dass **b12epi-M** als negativ geladener aggregierter Partikel jedoch auch in der Lage ist, solch eine infektionsverstärkende Wirkung auszuüben, war unerwartet.

Zur Überprüfung, ob die gebildeten Partikel des **b12epi-M** fibrilläre Strukturen wie **ef-c** aufweisen, wurden Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchgeführt.

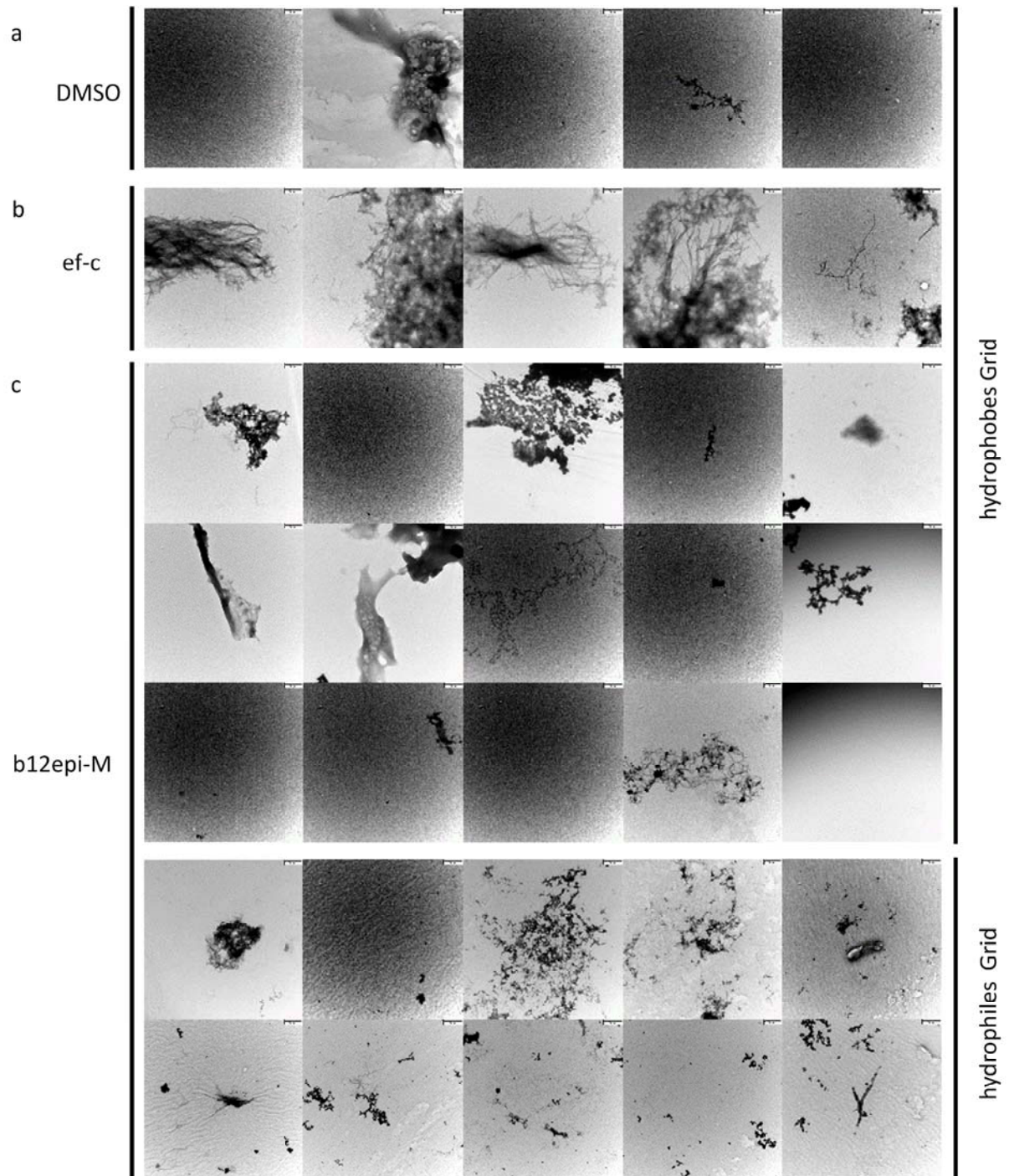


Abb. 43 TEM-Aufnahmen von b12epi-M und ef-c im wässrigen Milieu: [a] Negativkontrolle mit DMSO, welches als Lösemittel für die Peptidstammlösungen verwendet wurde, [b] ef-c nach wässriger Verdünnung, [c] b12epi-M nach wässriger Verdünnung auf hydrophilem und hydrophobem Grid. Der Maßstabsbalken oben rechts in jeder Aufnahme beträgt eine Länge von 300 nm

Beim Betrachten der TEM-Aufnahmen erkennt man, dass **ef-c** nach dem Verdünnen der Peptid-Stammlösung in DMSO mit wässrigem Medium fibrilläre Strukturen formt, welche ein Netzwerk ausbilden¹⁷¹ (Abb. 43b). Für **b12epi-M** (Abb. 43c) können in einigen TEM-Aufnahmen lediglich klumpige Aggregate nachgewiesen werden, welche vor allem bei der Verwendung eines hydrophilen TEM-Grid sichtbar sind, aber keine Fibrillen, wie es bei **ef-c** der Fall ist. Yolamanova *et al.* postulierten, dass die Ausbildung von Fibrillen notwendig für

gp120-abgeleitete Peptide sei, um die Infektiosität zu verstärken. **b12epi-M** zeigt, dass diese Hypothese nicht in jedem Fall zutrifft. Auch wenn für **b12epi-M** keine fibrillären Strukturen mittels TEM nachweisbar waren, so konnten doch klumpenartige Aggregate identifiziert werden, vor allem auf dem hydrophilen Grid. Da diese Partikel laut des gemessenen ζ -Potentials ein negatives Oberflächenpotential und damit eine negative Ladung trägt, scheint der postulierte Wirkmechanismus von **ef-c**, welches durch eine positive Oberflächenladung die Abstoßung zwischen negativ geladenem Virion und der Zellmembran aufhebt und beide in enge räumliche Nähe bringt, um so die Verschmelzung der Membranen zu begünstigen, hier zunächst unwahrscheinlich. Trotzdem ist **b12epi-M** offenbar ähnlich wie **ef-c** in der Lage *virus like particles* (VLPs) an der Aggregatoberfläche anzureichern, was mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 44). VLPs enthalten im Gegensatz zu Virionen keine funktionelle genetische Information. Sie können durch Transfektion von DNA hergestellt werden, welche virale Gag-Proteine codiert, und können als "leere" Virionen bezeichnet werden. Als Fusionsprotein mit YFP fluoreszieren die gebildeten VLPs gelbgrün.

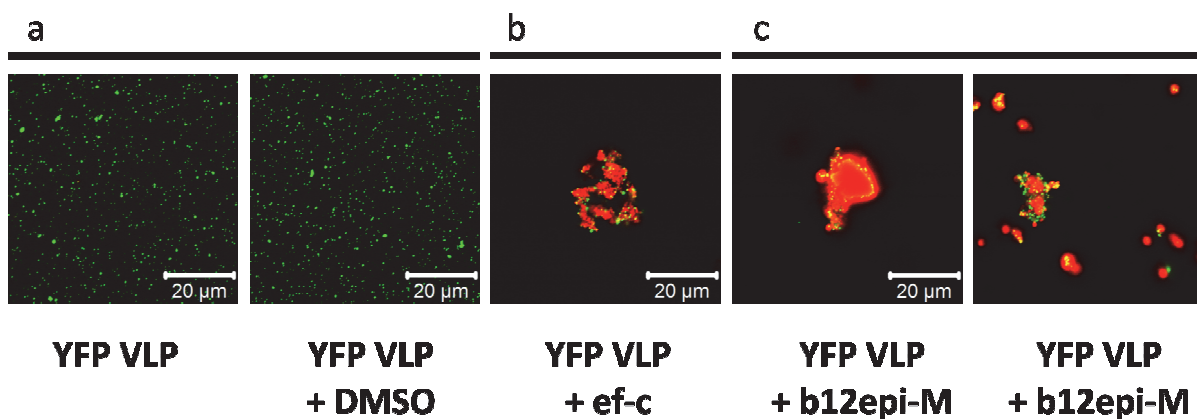


Abb. 44 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von **b12epi-M** und **ef-c** nach der Färbung mit Proteostat in Gegenwart von MLV-gag-YFP VLPs: [a] Negativkontrollen der VLPs alleine und mit Zusatz von DMSO, welches als Lösemittel für die Peptidstammlösungen verwendet wurde, [b] **ef-c** 50 μ M und [c] **b12epi-M** 50 μ M. Die Fluoreszenz des Proteostat-Farbstoffes wurde im roten Kanal gemessen, die Fluoreszenz des YFP im gelbgrünen, gezeigt sind die Überlagerungen beider Kanäle.

Elektrostatische Anziehung wie für **ef-c** angenommen kann nicht der Grund für die Anreicherung der VLPs an der Aggregatoberfläche sein da sowohl die Aggregate als auch die VLPs negativ geladen sind. Bei **b12epi-M** müssen andere Kräfte zur Anheftung der VLPs an die Aggregate führen, welche die Abstoßungskräfte überwinden, die auftreten, wenn man zwei gleichartig geladene Objekte einander annähert. Nimmt man an, dass amyloidartige Aggregate durch **b12epi-M** ausgebildet werden, was durch den positiven ThT-Bindungsassay naheliegend ist, so erfolgt die Bindung der einzelnen **b12epi-M**-Moleküle untereinander im Kern des Aggregates vermutlich hauptsächlich über Wasserstoffbrücken, was aber nicht für die Oberfläche und die Überwindung der elektrostatischen Abstoßung zwischen VLPs und Aggregaten gelten muss. Dass die verwendeten VLPs nicht von HIV-1

abgeleitet waren, sondern vom murinen Leukämievirus (MLV), deutet darauf hin, dass der zugrundeliegende Wirkungsmechanismus wie bei ef-c neben HI- und ML-Virionen auch für andere Viren funktioniert.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich das in dieser Arbeit entwickelte, gp120-abgeleitete Peptid **b12_{epi}-M** und die zu seiner Charakterisierung gesammelten Ergebnisse gut in die aktuelle Forschung und Literatur eingliedern lassen. In den letzten beiden Jahren sind bereits einige Publikationen, zum Beispiel aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jan Münch, erschienen, die sich mit dem Phänomen der Peptid-Aggregation und unter anderem mit einer daraus resultierenden Verstärkung von Virus-Infektionen befassen. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag dazu, diese Effekte weiter aufzuklären und die Zusammenhänge zwischen chemischen Eigenschaften der Peptide, unkontrollierter Aggregat-Bildung und HIV-1-Infektionsinduktion noch genauer zu definieren, und somit neue Kriterien festzulegen, die beim Design von erfolgversprechenden peptidischen HIV-Vakzinen oder -Eintrittsinhibitoren berücksichtigt werden sollten.

7 Zusammenfassung

Die Infektion von T-Zellen und Makrophagen mit dem humanen Immundefizienzvirus HIV-1 wird durch Anheftung des viralen Hüllproteins gp120 an den zellulären Rezeptor CD4 eingeleitet. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Epitope einer Reihe breit neutralisierender α -HIV-1-Antikörper, die in den vergangenen Jahren aus den Seren HIV-1-infizierter Personen isoliert wurden, die CD4-Bindungsstelle (CD4bs) des gp120 überlappen. Durch die Blockade der CD4bs durch den Antikörper wird der Virus-Zell-Kontakt und damit eine Infektion unterbunden. Innerhalb der HIV-1-Vakzinforschung stellt die CD4bs des gp120 somit ein vielversprechendes Target für das Immunogen-Design zur Auslösung einer breit neutralisierenden Immunantwort dar.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die beobachtete Immunantwort von Kaninchen auf **CD4bs-M**, ein Peptid, welches drei Sequenzabschnitte präsentiert, die im gp120 dessen CD4bs bilden, im Mausmodell nachzustellen, um monoklonale Antikörper zu gewinnen, welche mit gp120 kreuzreagieren und näher charakterisiert werden können. Kreuzreaktive Antikörper, die außer **CD4bs-M** auch gp120 erkennen, konnten in den α -**CD4bs-M**-Mausseren jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits an der unterschiedlichen genetischen Ausstattung des Immunsystems von Maus und Kaninchen liegen, andererseits aber auch mit einem Phänomen in Zusammenhang stehen, welches im Laufe der Arbeit anhand des Peptids **b12epi-M** aufgedeckt wurde.

Das Peptid **b12epi-M** wurde nach dem Vorbild von **CD4bs-M** entworfen und hergestellt, um das Epitop des breit neutralisierenden Antikörpers b12 nachzuahmen. Dieses Epitop überlappt die CD4bs und stellt einen weiteren Bereich von gp120 dar, der für das Design von peptidischen Immunogenen zur Auslösung HIV-1-neutralisierender Immunantworten interessant ist. **b12epi-M** bindet an b12 und ist in der Lage, die Bindung von gp120 an b12 zu verhindern. Darüber hinaus bindet **b12epi-M** wie **CD4bs-M** an CD4 und verhindert dessen Interaktion mit gp120; eine ausgeprägte Selektivität zwischen CD4 und b12 war in den durchgeführten kompetitiven Bindungsassays allerdings nicht zu beobachten. Im Gegensatz zu **CD4bs-M** brachte die Immunisierung von Kaninchen mit modifiziertem **b12epi-M** allerdings keine gp120-kreuzreaktive Immunantwort hervor.

Bei der Untersuchung von **b12epi-M**-Varianten zeigte sich, dass einige der Varianten zwar sehr stark an b12 binden, ihre Fähigkeit, die b12 – gp120-Interaktion zu stören jedoch weitgehend verloren ging. So kamen Zweifel auf, ob **b12epi-M** wirklich an die Antigenbindungsregion des b12 bindet. Da die beobachtete Inhibition der b12 – gp120 Interaktion auch nicht mit Bindung von **b12epi-M** an gp120 erklärt werden konnte, mussten andere Effekte hierfür verantwortlich sein.

Für **b12epi-M** konnte gezeigt werden, dass es aggregiert und die HIV-1-Infektion verstärkt. Da ohne den Einsatz von strukturbrechenden Aminosäuren die Synthese nicht gelang, kann davon ausgegangen werden, dass bereits während der Synthese ein hohes Aggregationspotential von **b12epi-M** vorlag. Sein infektionsverstärkender Effekt steht wahrscheinlich damit in Zusammenhang, dass die gebildeten Aggregate trotz ihres negativen ζ -Potentials an der Oberfläche negativ geladene Viruspartikel anlagern und sie so in räumliche Nähe der Wirtszellen bringen kann. Welche Kräfte für die Anlagerung verantwortlich sind, ist bisher noch nicht bekannt. Der beobachtete Zusammenhang zwischen Aggregationspotential und Bindungsstärke bzw. Kompetitionsfähigkeit der untersuchten **b12epi-M**-Varianten in Verbindung mit der Anlagerung von Viruspartikeln legt den Schluss nahe, dass die beobachtete Kompetitionsfähigkeit mit gp120 ebenfalls dadurch zu Stande kommt, dass die effektive Konzentration in Lösung durch Anlagerung des zweiten Bindungspartner an Aggregatoberflächen minimiert wird. Für **CD4bs-M** könnte dies ebenfalls gelten.

Die Variante **b12epi-M(XPX)** unterscheidet sich nur durch den Austausch eines Glycinrestes durch Prolin von **b12epi-M**. Es zeichnet sich durch ein relativ geringes Aggregationspotential sowie erhöhte Bindung an b12 und kaum abgeschwächte Kompetitionsfähigkeit mit gp120 gegenüber **b12epi-M** aus. Deshalb stellt es einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Optimierungen mit dem Ziel eines b12-Epitop-mimetischen Peptids dar. Da jedoch auch für dieses Peptid eine geringe ThT-Fluoreszenzverstärkung gemessen werden kann, kann nicht ausgeschlossen werden, dass seine Aktivität den Aggregationseigenschaften zuzuschreiben ist oder dass diese mögliche Kompetitionseigenschaften überlagern, welche auf Gleichgewichtsbindungen beruhen. Selbst wenn die Eigenschaften von **b12epi-M** hauptsächlich auf Aggregation beruhen, muss man berücksichtigen, dass dem Design des **b12epi-M** die einzig verfügbare Kristallstruktur eines Komplexes aus gp120 und b12 zugrunde liegt, welche mit einem rekombinant veränderten gp120 erhalten wurde, welches zudem nicht als Trimer vorlag. Diese Komplexstruktur ist deshalb keine ideale Vorlage für strukturbasiertes Design.

Nicht nur beim Design von neuen gp120-abgeleiteten peptidischen Immunogenen sollte folglich zu Beginn deren Aggregationspotential berücksichtigt werden. Es wurden bereits verschiedene Computerprogramme entwickelt, die Vorhersagen über das Aggregationspotential von peptidischen Sequenzen liefern. Auch wenn diese meist auf recht einfachen Algorithmen basieren, können sie einen Anhaltspunkt geben, ob aggregationsfähige Sequenzabschnitte vorhanden sind. Mit Hilfe von Methoden wie dem ThT-Bindungsassay, der auch in dieser Arbeit zur Charakterisierung des **b12epi-M** verwendet wurden, kann das Verhalten von neuartigen Peptiden in Lösung zunächst ohne

großen Aufwand untersucht werden, um mögliche Fehlinterpretationen von Experimenten, die mit der Aggregation zusammenhängen können, von vorne herein zu vermeiden.

8 Summary

The infection of T-cells and macrophages with the human immunodeficiency virus HIV-1 is initiated by binding of the viral envelope glycoprotein gp120 to the cellular receptor CD4. Interestingly, the epitopes of a range of broadly neutralizing α -HIV-1-antibodies, which were isolated from sera of HIV-1-infected patients in recent years, overlap the CD4 binding site of gp120. Thus, i.e. by blocking the CD4 binding site (CD4bs), the antibody prevents virus-cell contact, precluding infection of the cell. Consequently, the CD4bs of gp120 constitutes a promising target for immunogen design to elicit a broadly neutralizing immune response.

The first goal of this project was to reproduce the previously reported immune response in rabbits against **CD4bs-M**, a peptide that presents the gp120 fragments that constitute its CD4bs, in a mouse model, with the aim to generate and characterize monoclonal antibodies that cross-react with gp120. No gp120-cross-reactive antibodies, however, could be detected in the α -**CD4bs-M** mouse sera. This might be due to the different genetic make-up of the immune system of mice and rabbits, or associated to another observation revealed during the investigation of the peptide **b12epi-M** later on.

The second goal was the structure-based design and generation, similar to **CD4bs-M**, of a peptide, termed **b12epi-M**, which presents the epitope of the broadly neutralizing α -HIV-1 antibody b12. The epitope of b12 overlaps the CD4bs of gp120 and therefore presents a promising target for the design of peptide immunogens potentially capable of eliciting a HIV-1-neutralizing immune response. **b12epi-M** binds to b12 and interrupts the interaction of gp120 and b12. Furthermore, **b12epi-M**, like **CD4bs-M**, binds to CD4 and inhibits the interaction of gp120 and CD4, but no selectivity for b12 or CD4 was observed in the competitive experiments with both peptides. In contrast to **CD4bs-M**, immunization of rabbits with **b12epi-M** did not yield gp120-cross-reactive antisera.

Evaluation of **b12epi-M** variants yielded some peptides that strongly bind to b12, although their power to inhibit the b12 – gp120 interaction was abrogated, questioning the ability of **b12epi-M** to interact with the antigen binding region of b12. As the observed inhibition of the b12 – gp120 interaction could not be explained by binding to gp120, other effects had to be responsible.

It could be shown that **b12epi-M** aggregates, and that it enhances HIV-1 infection. It is likely that **b12epi-M** has a high aggregation potential already during peptide synthesis as the peptide could be obtained only by incorporating structure-breaking building blocks that induce kinks in the peptide backbone. The infection enhancing effect of **b12epi-M** is likely connected to the fact that peptide aggregates, despite their negative ζ -potential, are able to capture virions on their surface and bring them into spatial proximity to the host cell. The

forces that govern capture of virions is yet unknown. The observed relationship between aggregation on one hand, and binding to b12 and ability to interrupt the b12- gp120 interaction, respectively, on the other hand, in context with the fact that **b12epi-M** aggregates capture virions, suggests that **b12epi-M**-aggregates might capture the competing gp120 in competitive assays in a similar way, thereby reducing the effective concentration of the competitor, which results in apparently reduced binding and competition, respectively. This might also be true for **CD4bs-M**.

In **b12epi-M(XPX)**, one glycine residue of **b12epi-M** is replaced by proline. This peptide has a low aggregation propensity, binds stronger to b12 than **b12epi-M** , and has a similar IC₅₀ value for the inhibition of the b12 – gp120 interaction. Therefore, **b12epi-M(XPX)** might be a good starting point for the optimization of b12 epitope mimetic peptides. Nevertheless, a low aggregation potential could be observed for this peptide as well, and it cannot be ruled out that the characteristics of **b12epi-M(XPX)** are due to aggregation, and not based on equilibrium binding. It should be noted, however, that the design of **b12epi-M** was based on the only available structure of b12 in complex with gp120, and that the gp120 used in these crystallization experiments was highly modified and not presented as a trimer. Therefore, the design template for the peptide cannot be considered as optimal.

The results of these studies indicate that during evaluation of newly designed and synthesized peptides, the aggregation potential should be considered, not only for **b12epi-M**-like peptides. Many computer programs for the prediction of the aggregation potential of peptides have been developed. Although these are based on simple algorithms, they can indicate aggregation prone sequences in a peptide. Using simple methods like the ThT assay, the properties of newly synthesized peptides can be assessed without extensive efforts in order to avoid misinterpretation of experiments due to aggregation.

9 Anhang

9.1 Peptidübersicht

Cysteine liegen als Disulfide vor, sofern sie nicht als Cys(H) beschrieben werden. Die fett gedruckten Aminosäuren wurden manuell eingeführt.

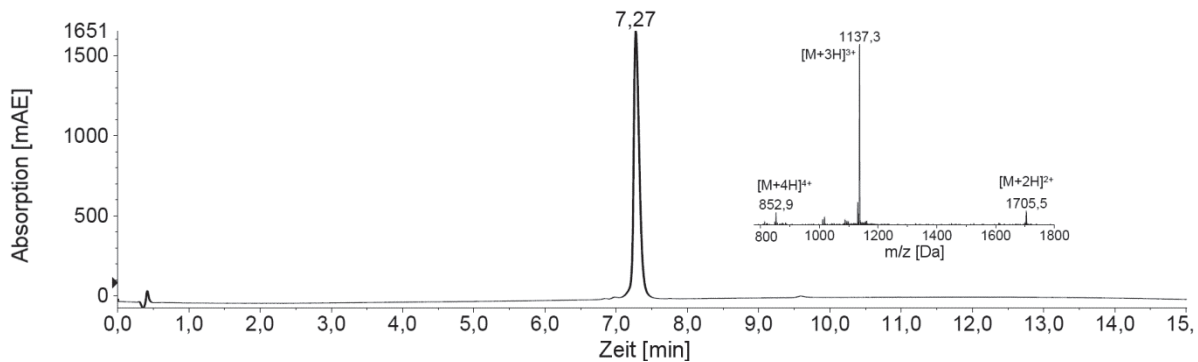
Peptidname	Sequenz
CD4bs-M	Ac-SGGDPEIVT-Ahx- Lys (Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGN-NH ₂
CD4bs-M-Bio	Ac-SGGDPEIVT-Ahx- Lys (Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGNXGX- Lys(Bio) -NH ₂
CD4bsM-Cys	Ac-SGGDPEIVT-Ahx- Lys (Ac-INMWQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRDGGNXGX-Cys(H)-NH ₂
CD4bs-M(4xAla)	Ac-SGGAPAIVT-Ahx- Lys (Ac-INMAQEVGKA-Ahx)-Ahx-Ahx-LTRAGGN-NH ₂
CD4bl(Ac)	Ac-SGGDPEIVT-NH ₂
LTR	Ac-LTRDGGN-NH ₂
β20-β21	Ac-INMWQEVGKA-NH ₂
b12epi-M(JRFL)	Ac-SGGDPEIVMHSFNSSGGEFFYCNSAQLFNSTWNNNTEGSNNTEGNTITLPCRIK-NH ₂
b12epi-M(Ac)	Ac-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(scr)	Biotin-Ahx-IQYLVGSGLPFDHWRTANSICGENSTG-Ahx-G-Ahx-FIFTECFP-NH ₂
b12epi-M(lac)-Cys	Ac-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFY-[Asp -NSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLP- Dpr]-RI-Ahx-G-Ahx-Cys(H)-NH ₂
b12epi-M(lin)	Ac-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYSNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPSRI-NH ₂
b12epi-M(lin)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYSNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPSRI-NH ₂
CD4bl	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTH-NH ₂
V4-loop Stamm	Biotin-Ahx-CNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(ΔCD4bl)	Biotin-Ahx-WFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(ΔV4loop)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFY-NH ₂
b12epi-M(P->A)	Biotin-Ahx-SGGDAEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(ALM)	Biotin-Ahx-SGGDAELVMHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(NAcGlc)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYC N(NAcGlc) SAQLF-Ahx-G-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(XPX)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-P-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(XSX)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Ahx-S-Ahx-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(OGO)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Aoa-G-Aoa-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(OPO)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Aoa-P-Aoa-TITLPCRI-NH ₂
b12epi-M(OSO)	Biotin-Ahx-SGGDPEIVTHWFNSGGEFFYCNSAQLF-Aoa-S-Aoa-TITLPCRI-NH ₂
ef-c	H-Q-Cys(H)-KIKQIINMWQ-OH

9.2 Chromatogramme und Massenspektren

Die Endanalytik der synthetisierten Peptide erfolgte mit der HPLC/MS mit dem in Tab. 10 beschriebenen Gradient.

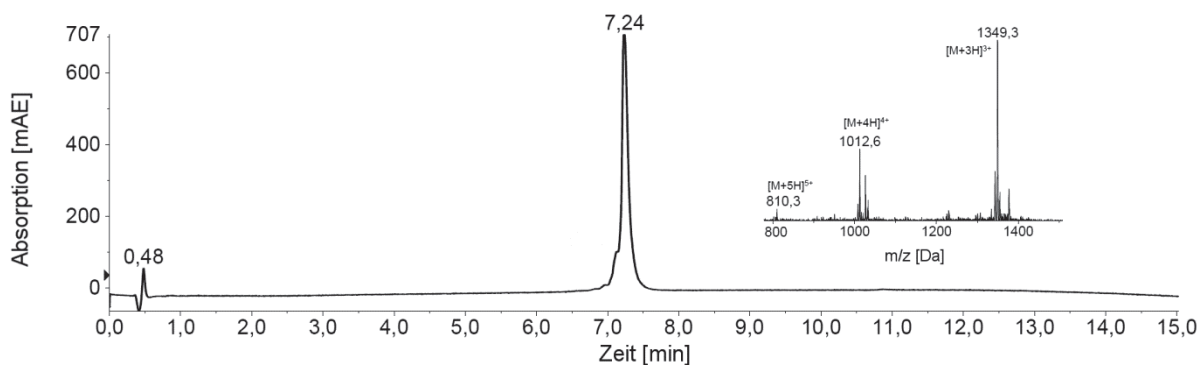
CD4bs-M

$M_{\text{calc}} = 3409,0 \text{ g/mol}$



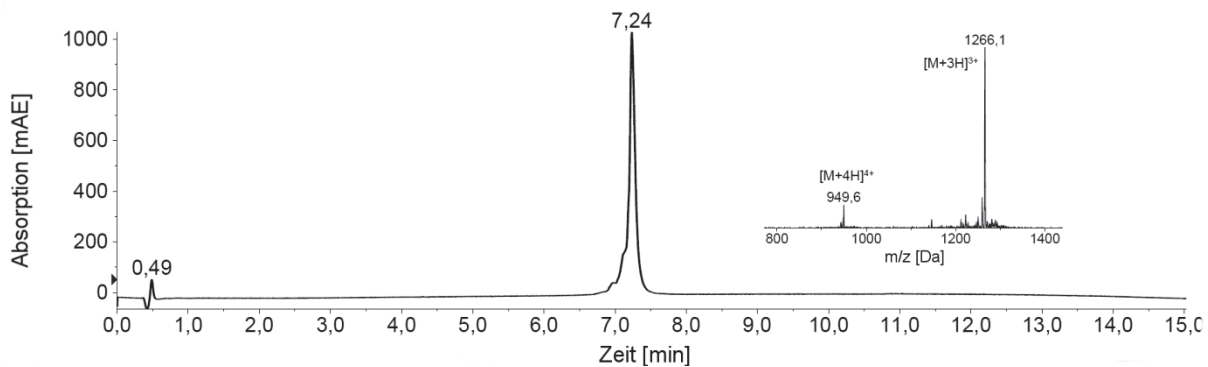
CD4bs-M-Bio

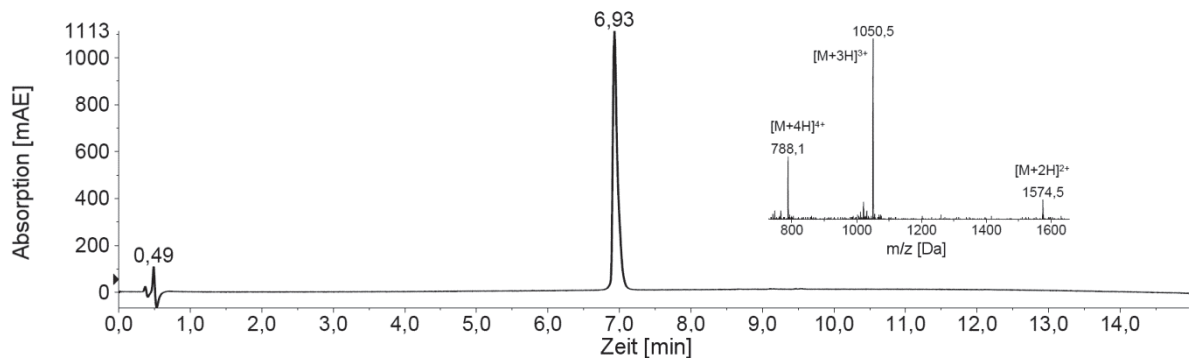
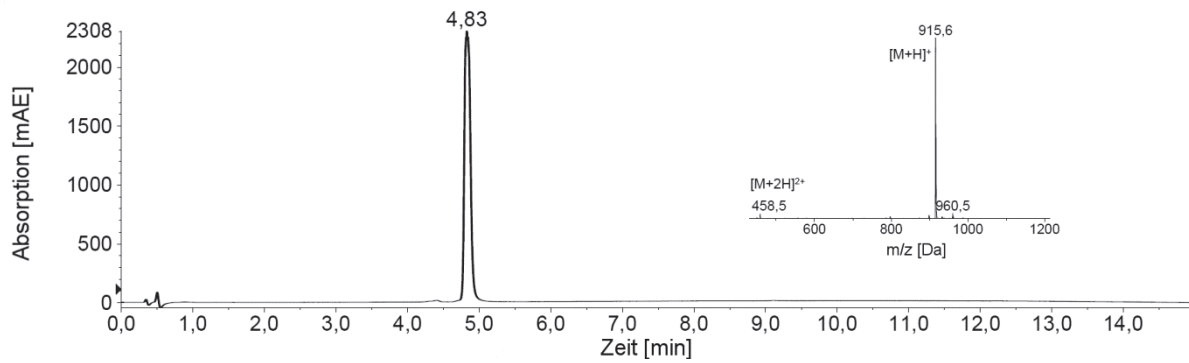
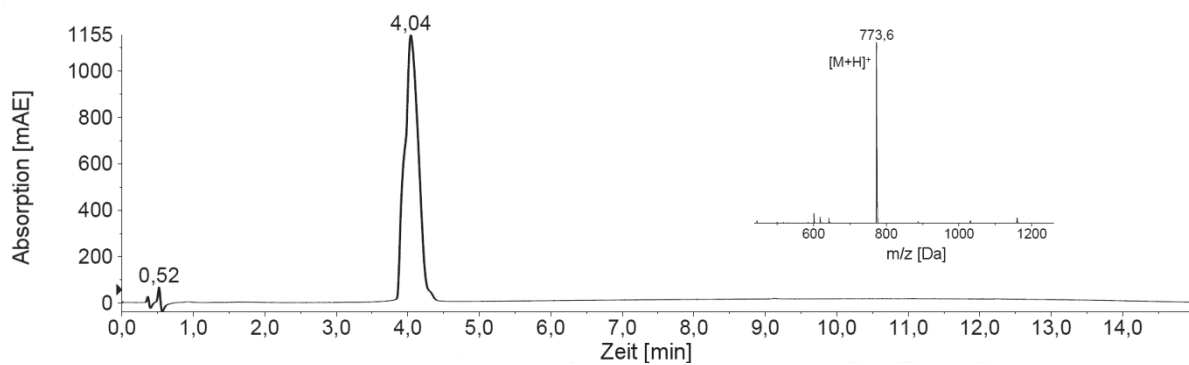
$M_{\text{calc}} = 4047,8 \text{ g/mol}$



CD4bs-M-Cys

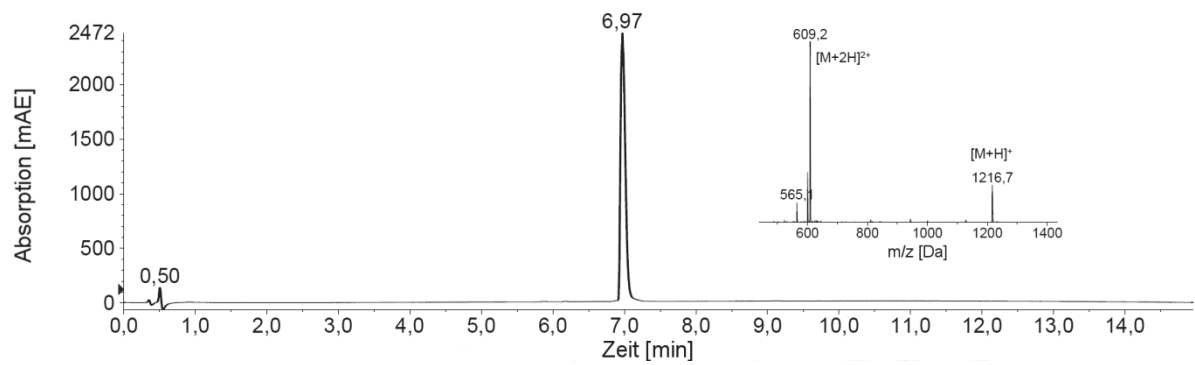
$M_{\text{calc}} = 3796,5 \text{ g/mol}$



CD4bs-M(4xAla) $M_{\text{calc}} = 3147,8 \text{ g/mol}$ **CD4bl(Ac)** $M_{\text{calc}} = 915,0 \text{ g/mol}$  **$\beta 23$** $M_{\text{calc}} = 772,8 \text{ g/mol}$ 

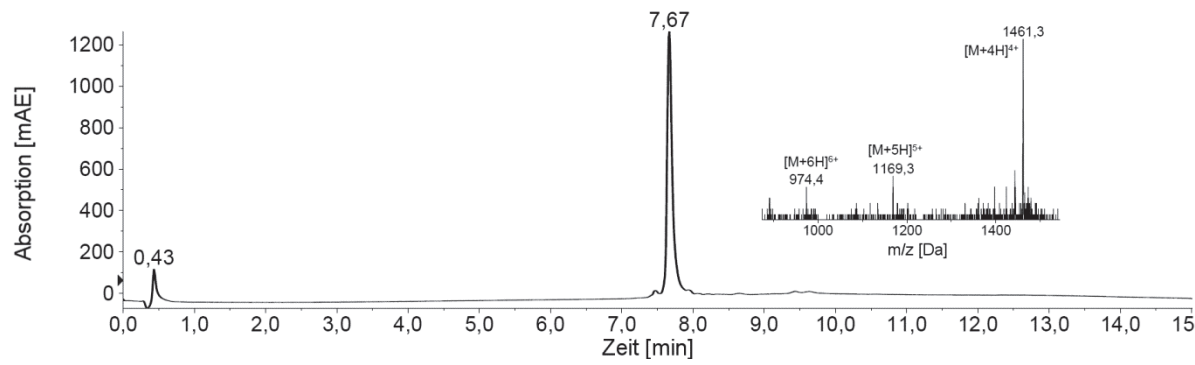
β20-β21

$M_{\text{calc}} = 1216,4 \text{ g/mol}$



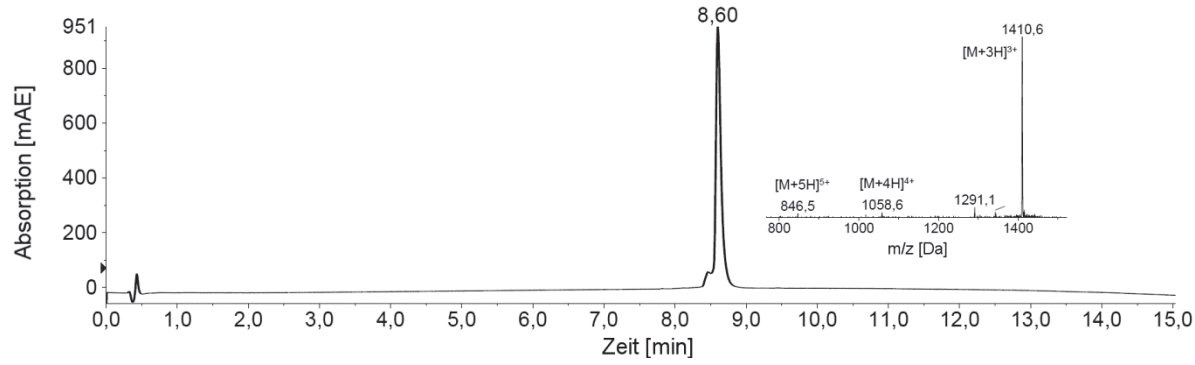
b12epi-M(JRFL)

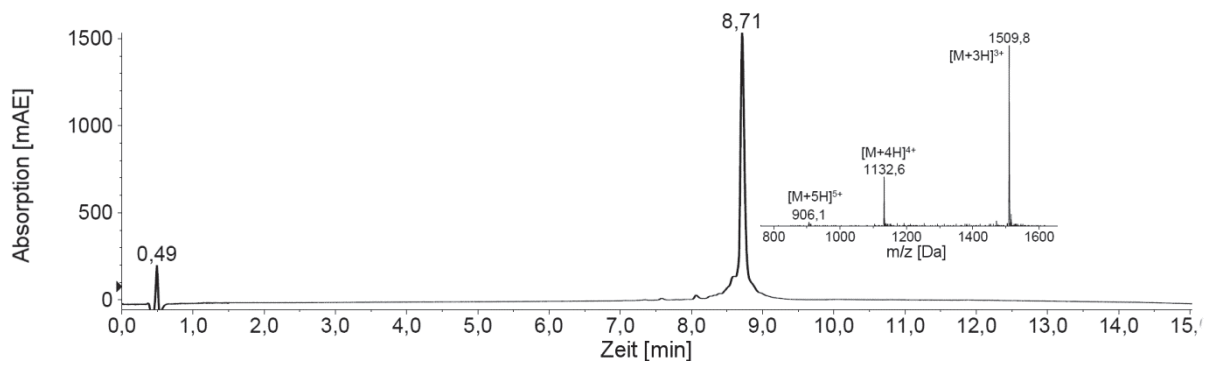
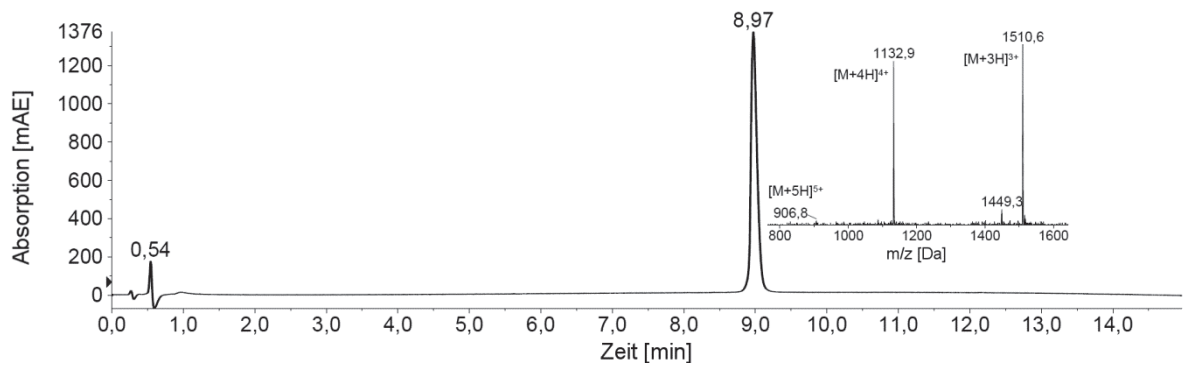
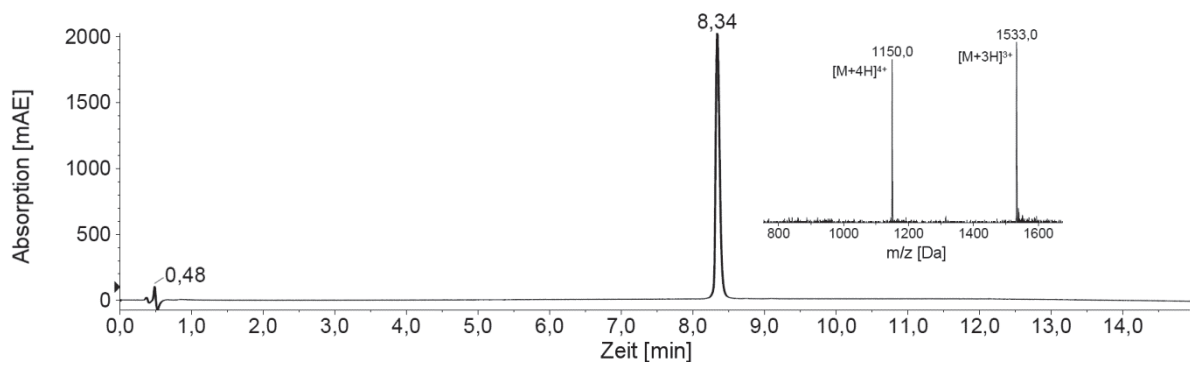
$M_{\text{calc}} = 5841,3 \text{ g/mol}$



b12epi-M(Ac)

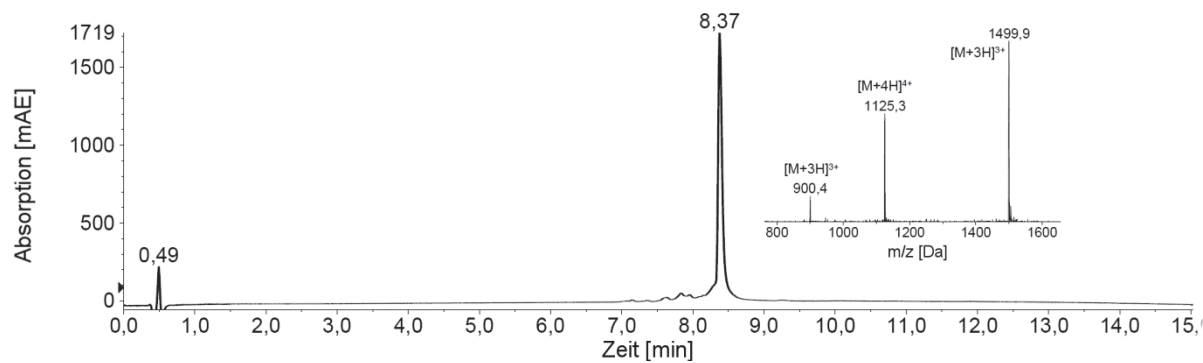
$M_{\text{calc}} = 4230,8 \text{ g/mol}$



b12epi-M $M_{\text{calc}} = 4528,3 \text{ g/mol}$ **b12epi-M(scr)** $M_{\text{calc}} = 4528,3 \text{ g/mol}$ **b12epi-M(lac)-Cys** $M_{\text{calc}} = 4596,2 \text{ g/mol}$ 

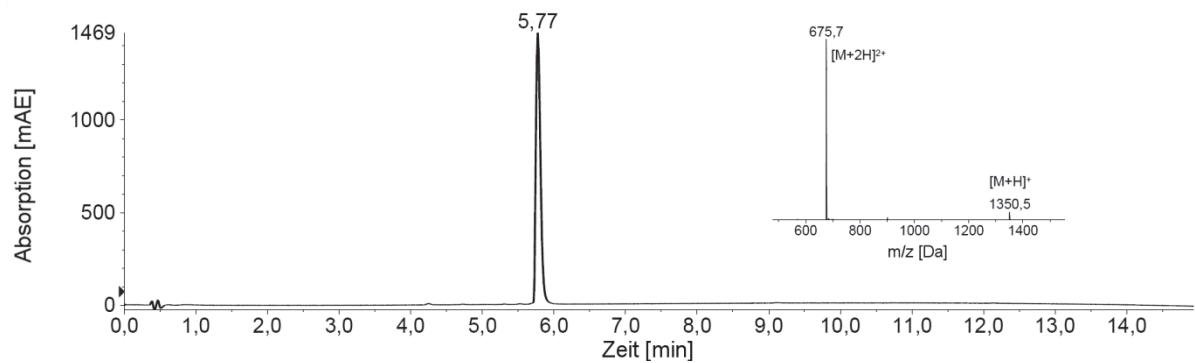
b12epi-M(lin)

$M_{\text{calc}} = 4498,1 \text{ g/mol}$



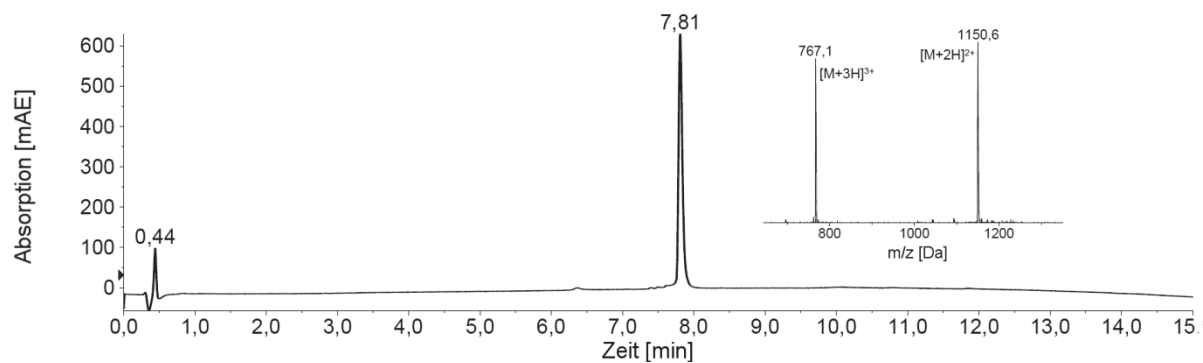
CD4bl

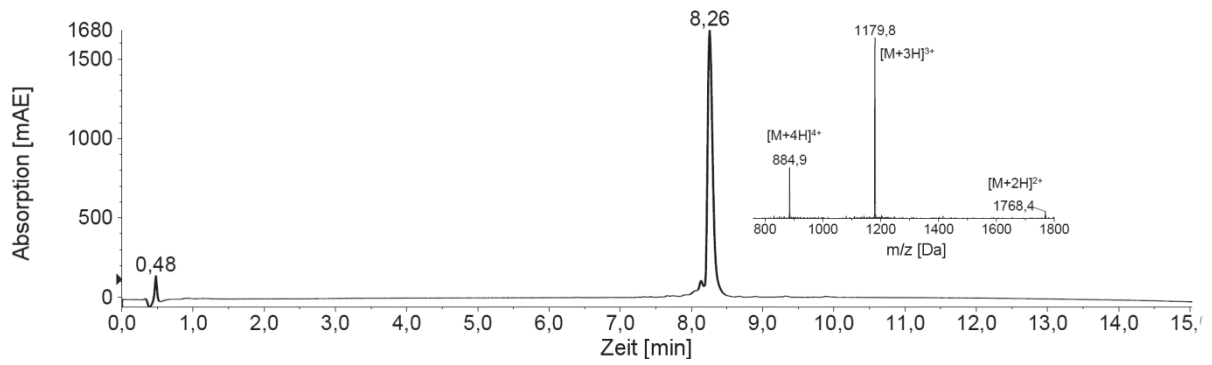
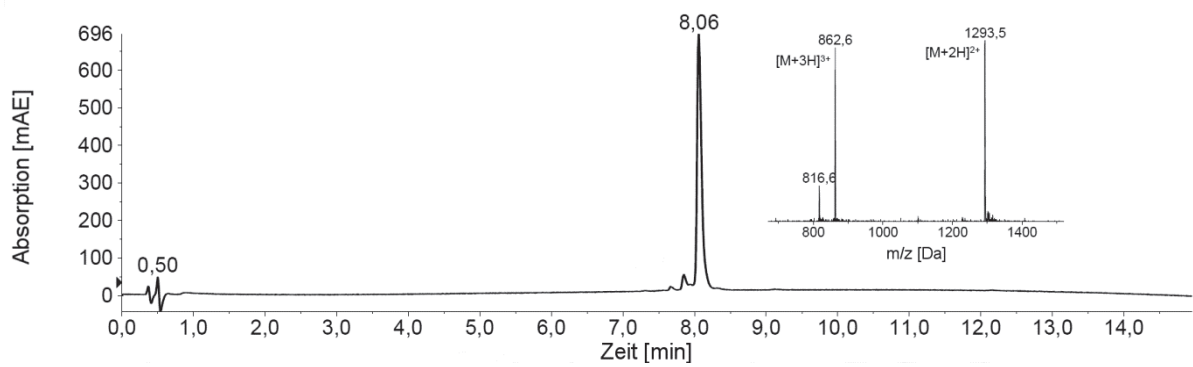
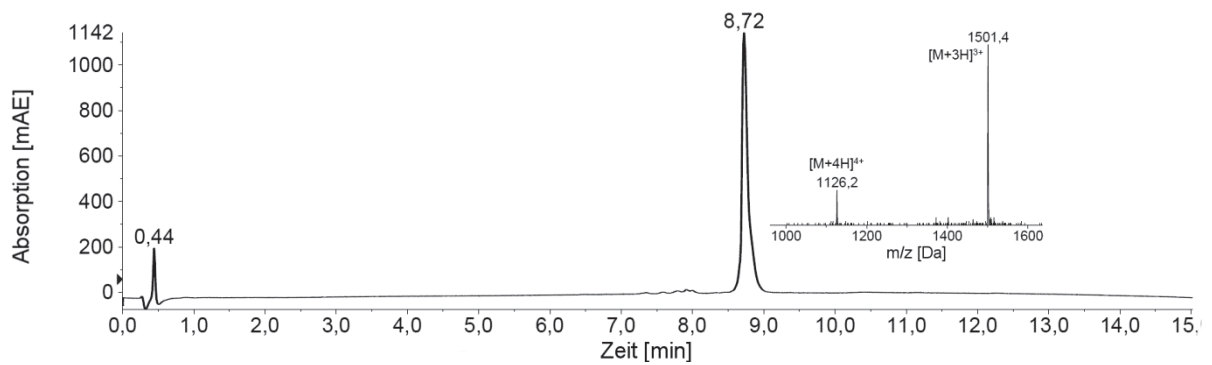
$M_{\text{calc}} = 1349,5 \text{ g/mol}$



V4-loop Stamm

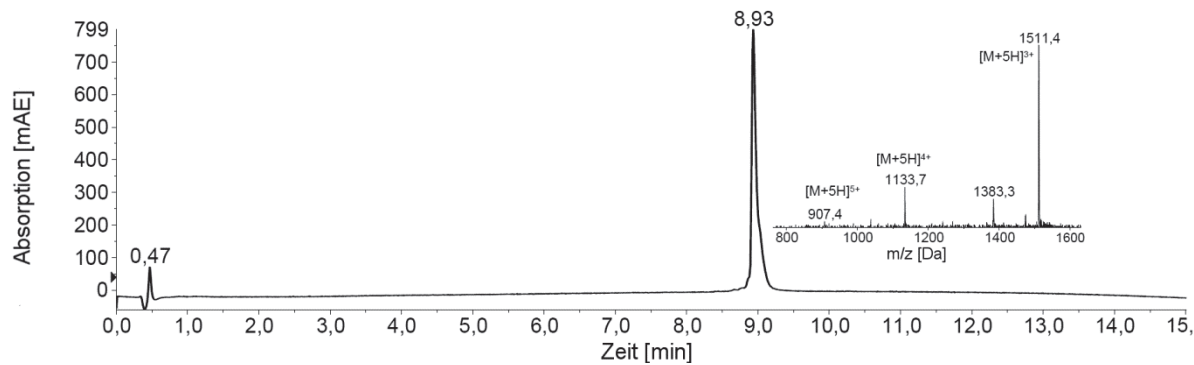
$M_{\text{calc}} = 2299,9 \text{ g/mol}$



b12epi-M(Δ CD4bl) $M_{\text{calc}} = 3535,2 \text{ g/mol}$ **b12epi-M(Δ V4loop)** $M_{\text{calc}} = 2584,9 \text{ g/mol}$ **b12epi-M(P→A)** $M_{\text{calc}} = 4502,2 \text{ g/mol}$ 

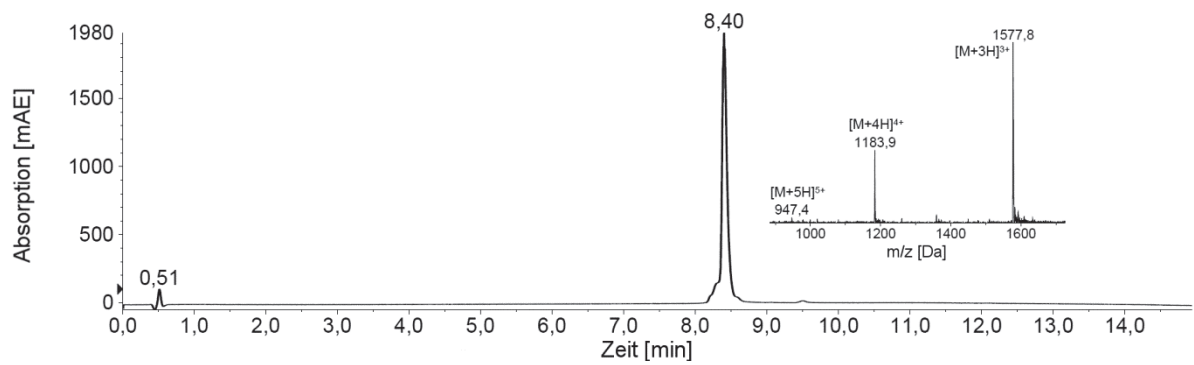
b12epi-M(ALM)

$M_{\text{calc}} = 4532,3 \text{ g/mol}$



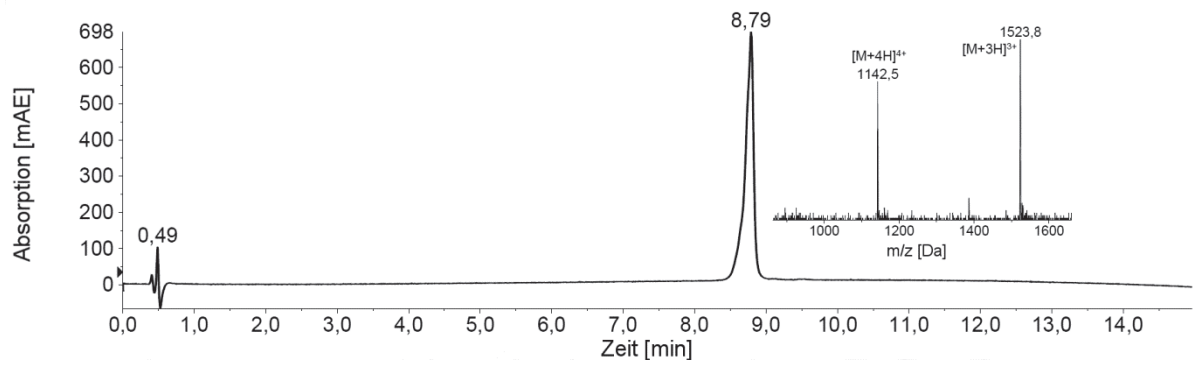
b12epi-M(NAcGlc)

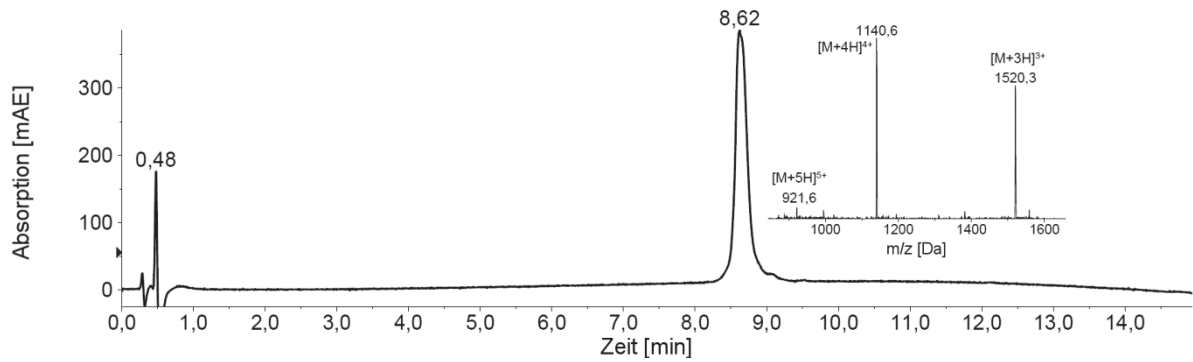
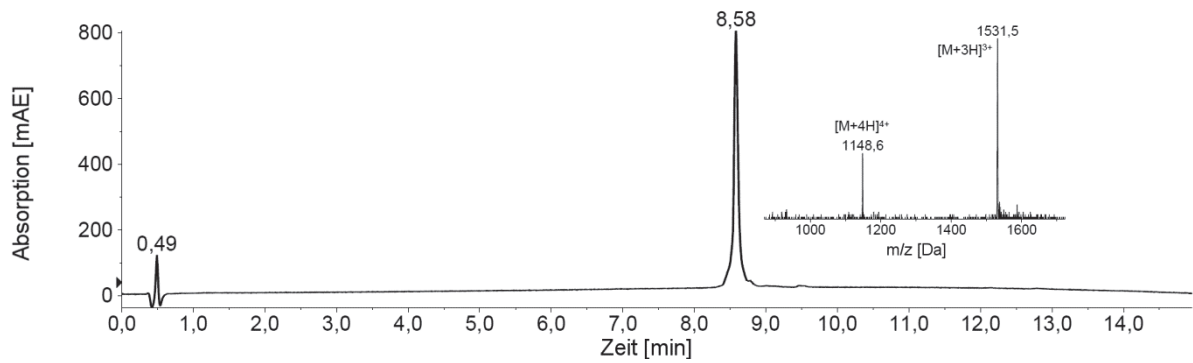
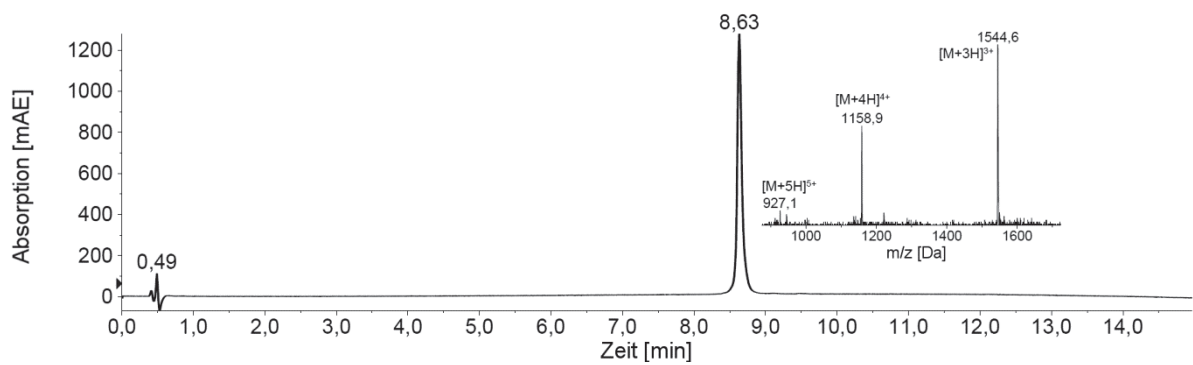
$M_{\text{calc}} = 4732,5 \text{ g/mol}$

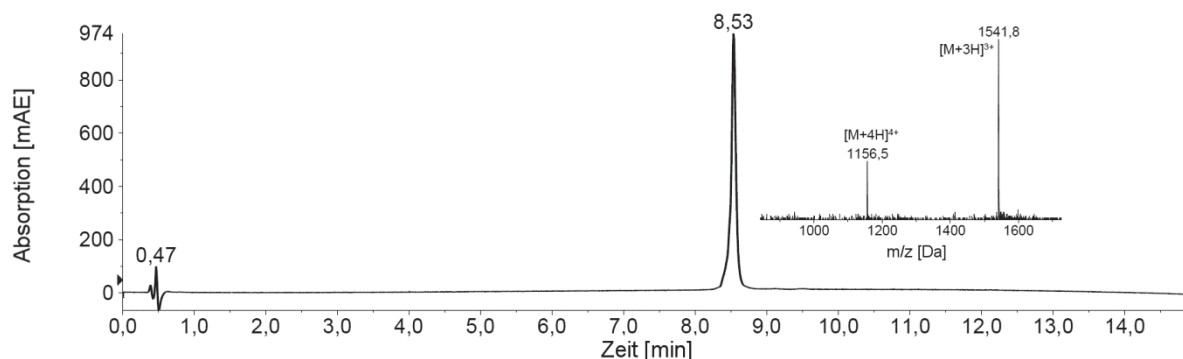
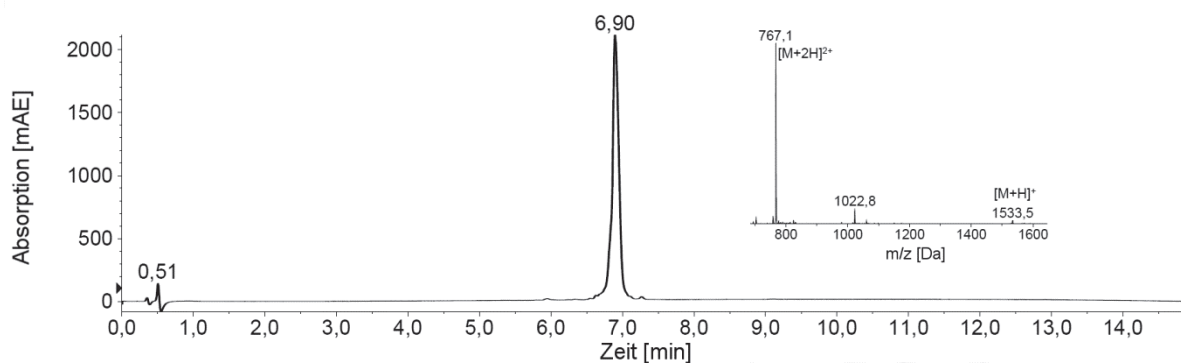


b12epi-M(XPX)

$M_{\text{calc}} = 4568,4 \text{ g/mol}$



b12epi-M(XSX) $M_{\text{calc}} = 4558,3 \text{ g/mol}$ **b12epi-M(OGO)** $M_{\text{calc}} = 4592,3 \text{ g/mol}$ **b12epi-M(OPO)** $M_{\text{calc}} = 4632,4 \text{ g/mol}$ 

b12epi-M(OSO) $M_{\text{calc}} = 4622,3 \text{ g/mol}$ **ef-c** $M_{\text{calc}} = 4568,4 \text{ g/mol}$ **9.3 Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1 Organisation des HIV-1 Genoms¹² 1
- Abb. 2 schematischer Aufbau eines HI-Virions-1 (Abbildung NIAID NIH) 2
- Abb. 3 Schematische Darstellung des HIV-1-Replikationszyklus (Abbildung NIAID NIH) 3
- Abb. 4 Struktur eines rekombinanten gp120-Proteins (PDB: 1GC1) modifiziert aus⁴⁹ [a] C_α-
 Spur des gp120-Proteins: Die Virus-Membran wäre oben, die Wirtszellmembran unten und
 der CD4-C-Terminus würde aus der Seite herausragen. Die innere Domäne ist rot dargestellt
 und die äußere Domäne gelb, das bridging-sheet orange. b, c und d kennzeichnen die
 Blickwinkel auf das gp120-Pprotein in den Oberflächenansichten. [b, c, d]
 Oberflächenstrukturen des gp120-Proteins aus verschiedenen Blickwinkeln: links: Variabilität
 der einzelnen Reste des gp120-Proteins: rot = konserviert, grün = variabel. Rechts:
 Gemodelte hoch-Mannose-Glykane (dunkelblau) und komplexe Glykane (hellblau) 5
- Abb. 5 Struktureller Sequenzabgleich des rekombinanten gp120-Proteins⁴⁶ mit HIV-1
 Clade, B, C und O sowie dem verwandten HIV-2 bzw. SIV. Sekundärstrukturelemente sind
 als Pfeile oder Zylinder gekennzeichnet und wurden benannt. Die Anzahl der Striche unter
 jedem Rest zeigt die Variabilität: 1 Strich - konserviert unter allen Immundefizienz-Viren der
 Primaten; 2 Striche - konserviert unter HIV-1 Isolat, 3 Striche - moderate Variation unter
 HIV-1 Isolat; 4 Striche - signifikante Variabilität unter HIV-1 Viren. Glykosylierungen sind
 mit m für hoch-Mannose-Glykane und c für komplexe Glykane markiert. 6

Abb. 6	gp120-Modell und Charakterisierung der Protein-Oberflächen ⁴⁹ [a] Oberflächendarstellung des gp120-Herzstücks (ohne V-loops und mit verkürzten N- und C-Termini) mit gemodelten Glykanen, unter HIV-1 konservierte Reste sind rot dargestellt, variable Reste grün; [b] Definition von „ <i>Silent Face</i> “, „ <i>Non-Neutralizing Face</i> “ und „ <i>Neutralizing Face</i> “	7
Abb. 7	Angreifbare Schwachstelle mit zentralem Asn 332 Glykan ⁷⁹ [a] Bindung der Antikörper PGT135, 2G12 und PGT128 an das Asn 332 Glykan. [b] Schematische Darstellung der Epitope und der angreifbaren Schwachstelle, interatomare Kontakte sind farbig markiert, die Kreise stehen für Glykane.....	10
Abb. 8	Strukturelle Definition eines konformationell invariablen, antikörperzugänglichen Bereiches der CD4 Bindungsstelle ⁵⁹	11
Abb. 9	Struktur eines gp120-Proteins im Komplex mit b12 (PDB 2NY7): [a] Oberflächendarstellung des gp120-Proteins, CD4-Kontaktfläche (rosa), b12-Kontaktfläche (gelb) und überlappende Kontaktfläche (ocker); [b] Darstellung wie a, gp120 365-373 (rot), gp120 424-433 (orange), gp120 454-460 (grün), V4-loop Stamm (blau); [c] Cartoon-Darstellung mit Perspektive wie a und b und Detailansicht [d] mit Farbgebung wie in b und Darstellung der Hauptinteraktionsreste als Stabmodell, Die C _α -Spur des b12 ist cyan dargestellt und die dargestellten Reste machen über zwei Drittel der Interaktionsfläche mit dem gp120-Protein aus.	12
Abb. 10	Schema der Festphasenpeptidsynthese	14
Abb. 11	Allgemeine Struktur von [a] Pseudoprolin-Dipeptid-Bausteinen und [b] Isoacyl-Dipeptid-Bausteinen mit Serin bzw. Threonin.....	15
Abb. 12	Therapeutische Bereiche für Peptide in Klinischen Studien ¹²⁴	16
Abb. 13	Wirkungsprinzip von peptidischen Mimetika: Die Interaktion von zwei Proteinen (blau und grün) wird durch ein peptidisches Mimetikum (rot) verhindert (modifiziert nach ¹⁴⁰) 18	
Abb. 14	CD4bs-M Molekül: Die Farbgebung ist identisch mit Abb. 9. Präsentierte Fragmente: CD4bl (Reste 365-373) in rot, β20-β21 <i>hairpin</i> (Reste 424-433) in orange und β23-Fragment (Reste 454-460) in grün	19
Abb. 15	Bindung von Immunsereen und Präimmunsereum der Maus an CD4bs-M und gp120: Beschichtungskonzentrationen (CD4bs-M, gp120): 16,7 nM, Verdünnungsfaktor Seren: 1:200, Detektion: α-Maus.....	57
Abb. 16	Bindung von ausgewählten Hybridomüberständen an CD4bs-M, dessen Varianten und gp120: Beschichtung (CD4bs-M, CD4bs-M(4xAla), CD4bl(Ac), β23, β 20-β21, gp120): 16,7 nM, Detektion: anti-Maus-HRP.....	58
Abb. 17	SEAP-Infektionsassay der vereinten Hybridomüberstände in 1:4 Verdünnungen 59	
Abb. 18	SEAP-Infektionsassay [a] der einzelnen Hybridomüberstände des 1H4-Pools in 1:4-Verdünnungen und [b] des Antikörpers 1H4	60
Abb. 19	Struktur eines gp120 Proteins (grau) im Komplexkristall mit b12 (PDB 2NY7). Farbig hervorgehoben sind der CD4-binding loop (rot), der V4-loop Stamm (blau), der β20-β21 <i>hairpin</i> (gelb) und das β23-Fragment (grün). Außerdem ist die Seitenkette des Trp100 der schweren Kette des b12 in blaugrün dargestellt.....	62
Abb. 20	Einfluss von b12epi-M(JRFL) auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120.....	63
Abb. 21	Einfluss von b12epi-M(JRFL) und dem verkürzten b12epi-M auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120 .	64
Abb. 22	Einfluss von b12epi-M auf die CD4 – gp120 Interaktion: Beschichtung (CD4) 1 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120.....	65

Abb. 23	Einfluss von b12epi-M und CD4bs-M auf die Interaktion von b12 [a] bzw. CD4 [b] mit gp120: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL bzw. (CD4) 1 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120	66
Abb. 24	Kristallstruktur eines gp120-Proteins im Komplex mit b12 (PDB 2NY7) [a] bzw. CD4 und 17b (PDB 2NY5) [b]. Das Rückgrat des gp120 ist als Ribbon-Diagramm dargestellt (grau). Farblich hervorgehoben sind der CD4-binding loop (rot), der V4-loop Stamm (blau), der β20-β21 hairpin (gelb) und das β23-Fragment (grün). Außerdem ist die Seitenkette des Trp100 der schweren Kette des b12 [a] und Phe43 des CD4 [b] in blaugrün dargestellt. Die zusätzlich eingebrachten Disulfidbrücken sind in magenta dargestellt und die Reste, welche die α1-Helix ausbilden in hellem pink.	67
Abb. 25	Einfluss der verkürzten b12epi-M-Derivate auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120	68
Abb. 26	Einfluss von der linearen und scrambled-Variante auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120	70
Abb. 27	Einfluss der Punktvariationen von b12epi-M auf die Inhibition der b12 – gp120 Interaktion [a] und die CD4-gp120 Interaktion [b]: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL [a] bzw. (CD4) 1 µg/mL [b], Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120	71
Abb. 28	Bindung von b12epi-M an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Detektion α-Biotin	72
Abb. 29	Bindung von b12epi-M und den Punktvarianten an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion α-Biotin.....	73
Abb. 30	Verhalten der Kaninchenserum: (a) Bindung von Immun- und Präimmunsrum an b12epi-M, b12epi-M-Cys(lac) und gp120; Beschichtung: 16,7 nM; Detektion: α-Kaninchen	74
Abb. 31	Struktur des Herzstückes des gp120 HXBc2 Proteins (grau) im Komplexkristall mit b12 (PDB 2NY7). Die Farbgebung ist identisch zu Abb. 19. und der N-Acetylglucosamin-Rest ist in magenta dargestellt.....	75
Abb. 32	Bindung von b12epi-M und dem aminozuckerhaltigen b12epi-M(NAcGlc) an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion α-Biotin	76
Abb. 33	Einfluss von b12epi-M und b12epi-M(NAcGlc) auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120	76
Abb. 34	Bindung von b12epi-M und von den V4-loop-Varianten an b12 und CD4: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (CD4) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion α-Biotin .	78
Abb. 35	Einfluss von b12epi-M und den V4-loop-Varianten auf die b12 – gp120 Interaktion: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, Ligand (gp120) 0,5 µg/mL, Detektion α-gp120 .	78
Abb. 36	Bindung von b12epi-M an gp120: Beschichtung (gp120) 1 µg/mL; Detektion: α-Biotin	80
Abb. 37	Bindung von b12epi-M und von b12epi-M(OGO) an b12 und gp120: Beschichtung (b12) 0,2 µg/mL, (gp120) 1 µg/mL; Ligand (Peptide) 4 µM; Detektion: anti-Biotin-HRP. Die Bindung der beiden Peptide jeweils an b12 wurde auf 100 % gesetzt und die Bindung an gp120 relativ dazu dargestellt.	80
Abb. 38	Emissionsspektren von ThT in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 in Anwesenheit von 25 µM b12epi-M bzw. ef-c und ohne Peptidzusatz	82
Abb. 39	ThT-Bindungsassay in Anwesenheit von b12epi-M bzw. einiger Varianten (25µM): 2,5 mM Stammlösungen in HPW:MeCN 50:50 + 0,1% TFA bzw. DMSO 100-fach mit Thioflavinlösung verdünnt	82
Abb. 40	Zusammenhang zwischen der relativen, auf b12epi-M bezogenen Bindungsstärke der b12epi-M-Varianten an b12 und deren Fluoreszenzsignal im ThT-Bindungsassay: doppelte Darstellung [a] und doppelte logarithmische Darstellung [b]	84
Abb. 41	Infektionsassay mit b12epi-M und ef-c: (a) SEAP-Infektionsassay und (b) TZM-bl-Infektionsassay	85

Abb. 42	ζ -Potential von ef-c und b12epi-M. Stammlösemittel DMSO und wässriges KCl wurden zur Kontrolle mitgeführt.....	85
Abb. 43	TEM-Aufnahmen von b12epi-M und ef-c im wässrigen Milieu: [a] Negativkontrolle mit DMSO, welches als Lösemittel für die Peptidstammlösungen verwendet wurde, [b] ef-c nach wässriger Verdünnung, [c] b12epi-M nach wässriger Verdünnung auf hydrophilem und hydrophobem Grid. Der Maßstabsbalken oben rechts in jeder Aufnahme beträgt eine Länge von 300 nm	87
Abb. 44	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von b12epi-M und ef-c nach der Färbung mit Proteostat in Gegenwart von MLV-gag-YFP VLPs: [a] Negativkontrollen der VLPs alleine und mit Zusatz von DMSO, welches als Lösemittel für die Peptidstammlösungen verwendet wurde, [b] ef-c 50 μ M und [c] b12epi-M 50 μ M. Die Fluoreszenz des Proteostat-Farbstoffes wurde im roten Kanal gemessen, die Fluoreszenz des YFP im gelbgrünen, gezeigt sind die Überlagerungen beider Kanäle.....	88

9.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Gruppierung und Eigenschaften HIV-1 neutralisierender Antikörper (modifiziert aus ⁵⁸⁾ 8	
Tab. 2	Syntheseprotokoll: automatisierter Syntheszyklus am Syro 1 Syntheseroboter ...	32
Tab. 3	Syntheseprotokoll: manueller Syntheszyklus	33
Tab. 4	Syntheseprotokoll zur Kupplung der zweiten Aminosäure nach dem Isoacyldipeptid	34
Tab. 5	Syntheseprotokoll der manuellen n-terminalen Acetylierung	34
Tab. 6	Syntheseprotokoll der manuellen n-terminalen Biotinylierung	35
Tab. 7	Syntheseprotokoll zur Seitenkettenentschützung und Knüpfung einer Lactambrücke	35
Tab. 8	Syntheseprotokoll zur Acetylschutzgruppenabspaltung des N-Acetylglucosamin und der ivDde-Schutzgruppenabspaltung	36
Tab. 9	präparatives Abspaltungsprotokoll	37
Tab. 10	zeitlicher Ablauf eines präparativen HPLC-Laufes	38
Tab. 11	benutzte Gradienten bei der HPLC/MS-Analytik und deren Verwendungszweck	39
Tab. 12	Detektionssysteme, die für ELISAs verwendet wurden	53

9.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Jutta Eichler, die mir diese Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglichte, mich stets unterstützend betreute und durch anregende Gespräche und Diskussionen neue Blickwinkel und Sichtweisen eröffnete. Ich danke ihr für den freundlichen persönlichen Umgang und die kollegiale Stimmung in der Arbeitsgruppe, welche regelmäßig durch gemeinsame Aktivitäten der Arbeitsgruppe gefördert wurde.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Frank Bordusa, der mir als Betreuer die Möglichkeit gab, meine Arbeit als Dissertation an der Martin-Luther-Universität einzureichen.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen bedanken, die direkt an dieser Arbeit beteiligt waren. Dazu gehören Frau Prof. Dr. Barbara Schmidt und ihre Arbeitsgruppe, in welcher die Infektionsversuche im S3-Labor durch meine Kollegin und Freundin Christina Haußner durchgeführt werden konnten. Weiterhin Prof. Dr. Thomas Winkler, der Immunisierungsversuche in Mäusen durchführte und mir die Möglichkeit gab, Hybridomzellen zu kultivieren. Schließlich danke ich Prof. Dr. Jan Münch und Edina Lump, welche die elektronen- bzw. fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und Infektionsassays durchführten. Für die vorübergehende finanzielle Förderung danke ich dem GRK 1071.

Außerdem danke ich meiner ganzen Arbeitsgruppe, welche mir die Arbeit in einem angenehmen Umfeld ermöglichte und mir durch fachliche Diskussionen und Tipps immer Unterstützung zukommen ließen, wodurch auch sie indirekt an diese Arbeit beteiligt waren.

Besonders herzlich danke ich meinen Eltern, welche mich auf meinem gesamten Weg immer unterstützt und gefördert haben und geduldig und verständnisvoll waren. Größter Dank gilt meinen Freundinnen Julia bzw. Christina, die mir während der Promotion in jeder Lebenssituation zur Seite standen.

9.6 Referenzen

1. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J.; Rey, F.; Nugeyre, M.; 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* **220**, 868–871 (1983).
2. Gallo, R.; Salahuddin, S.; Popovic, M.; Shearer, G.; Kaplan, M.; Haynes, B.; Palker, T.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B. & et, a.: Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS, *Science* **224**, 500–503 (1984).
3. Popovic, M.; Sarngadharan, M.; Read, E. & Gallo, R.: Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS, *Science* **224**, 497–500 (1984).
4. Sarngadharan, M.; Popovic, M.; Bruch, L.; Schupbach, J. & Gallo, R.: Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS, *Science* **224**, 506–508 (1984).
5. Schupbach, J.; Popovic, M.; Gilden, R.; Gonda, M.; Sarngadharan, M. & Gallo, R.: Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS, *Science* **224**, 503–505 (1984).
6. Safai, B.; Sarngadharan, M. G.; Groopman, J. E.; Arnett, K.; Popovic, M.; Sliski, A.; Schüpbach, J. & Gallo, R. C.: Seroepidemiological studies of human T-lymphotropic retrovirus type III in acquired immunodeficiency syndrome, *Lancet* **1**, 1438–1440 (1984).
7. Baggaley, R. F.; Boily, M.-C.; White, R. G. & Alary, M.: Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis, *AIDS* **20**, 805–812 (2006).
8. UNAIDS: GLOBAL REPORT UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Verfügbar unter http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf (2013).
9. Egger, M.; May, M.; Chene, G.; Phillips, A. N.; Ledergerber, B.; Dabis, F.; Costagliola, D.; D'Arminio Monforte, A.; Wolf, F. de; Reiss, P.; Lundgren, J. D.; Justice, A. C.; Staszewski, S.; Leport, C.; Hogg, R. S.; Sabin, C. A.; Gill, M. J.; Salzberger, B. & Sterne, Jonathan A C: Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies, *Lancet* **360**, 119–129 (2002).
10. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies, *Lancet* **372**, 293–299 (2008).
11. Mascola, J. R. & Montefiori, D. C.: The role of antibodies in HIV vaccines, *Annu Rev Immunol* **28**, 413–444 (2010).
12. Frankel, A. D. & Young, J. A.: HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1–25 (1998).
13. Lu, M.; Blacklow, S. C. & Kim, P. S.: A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein, *Nat Struct Mol Biol* **2**, 1075–1082 (1995).
14. Julien, J.-P.; Cupo, A.; Sok, D.; Stanfield, R. L.; Lyumkis, D.; Deller, M. C.; Klasse, P.-J.; Burton, D. R.; Sanders, R. W.; Moore, J. P.; Ward, A. B. & Wilson, I. A.: Crystal Structure of a Soluble Cleaved HIV-1 Envelope Trimer, *Science* (2013).

15. Klatzmann, D.; Champagne, E.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Guetard, D.; Hercend, T.; Gluckman, J. C. & Montagnier, L.: T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV, *Nature* **312**, 767–768 (1984).
16. Feng, Y.; Broder, C. C.; Kennedy, P. E. & Berger, E. A.: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, *Science* **272**, 872–877 (1996).
17. Bleul, C. C.; Farzan, M.; Choe, H.; Parolin, C.; Clark-Lewis, I.; Sodroski, J. & Springer, T. A.: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry, *Nature* **382**, 829–833 (1996).
18. Oberlin, E.; Amara, A.; Bachelier, F.; Bessia, C.; Virelizier, J. L.; Arenzana-Seisdedos, F.; Schwartz, O.; Heard, J. M.; Clark-Lewis, I.; Legler, D. F.; Loetscher, M.; Baggiolini, M. & Moser, B.: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1, *Nature* **382**, 833–835 (1996).
19. Deng, H.; Liu, R.; Ellmeier, W.; Choe, S.; Unutmaz, D.; Burkhart, M.; Di Marzio, P.; Marmon, S.; Sutton, R. E.; Hill, C. M.; Davis, C. B.; Peiper, S. C.; Schall, T. J.; Littman, D. R. & Landau, N. R.: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1, *Nature* **381**, 661–666 (1996).
20. Dragic, T.; Litwin, V.; Allaway, G. P.; Martin, S. R.; Huang, Y.; Nagashima, K. A.; Cayanan, C.; Maddon, P. J.; Koup, R. A.; Moore, J. P. & Paxton, W. A.: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5, *Nature* **381**, 667–673 (1996).
21. Alkhatib, G.; Combadiere, C.; Broder, C. C.; Feng, Y.; Kennedy, P. E.; Murphy, P. M. & Berger, E. A.: CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1, *Science* **272**, 1955–1958 (1996).
22. Choe, H.; Farzan, M.; Sun, Y.; Sullivan, N.; Rollins, B.; Ponath, P. D.; Wu, L.; Mackay, C. R.; LaRosa, G.; Newman, W.; Gerard, N.; Gerard, C. & Sodroski, J.: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates, *Cell* **85**, 1135–1148 (1996).
23. Doranz, B. J.; Rucker, J.; Yi, Y.; Smyth, R. J.; Samson, M.; Peiper, S. C.; Parmentier, M.; Collman, R. G. & Doms, R. W.: A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors, *Cell* **85**, 1149–1158 (1996).
24. Sattentau, Q. J. & Moore, J. P.: Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding, *J Exp Med* **174**, 407–415 (1991).
25. Weissenhorn, W.; Dessen, A.; Harrison, S. C.; Skehel, J. J. & Wiley, D. C.: Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41, *Nature* **387**, 426–430 (1997).
26. Chan, D. C.; Fass, D.; Berger, J. M. & Kim, P. S.: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein, *Cell* **89**, 263–273 (1997).
27. Melikyan, G. B.; Markosyan, R. M.; Hemmati, H.; Delmedico, M. K.; Lambert, D. M. & Cohen, F. S.: Evidence That the Transition of HIV-1 Gp41 into a Six-Helix Bundle, Not the Bundle Configuration, Induces Membrane Fusion, *The Journal of Cell Biology* **151**, 413–424 (2000).
28. Mansky, L. M. & Temin, H. M.: Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase, *J Virol* **69**, 5087–5094 (1995).

29. Deutsche AIDS-Gesellschaft e.V.: Deutsch \ Österreichische Therapieleitlinien HIV Version 4 vom 22.2.2012 rev nach AWMF) - 055-001I_S2k_Antiretrovirale_Therapie_der_HIV-Infektionen_2012-10.pdf. Verfügbar unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/055-001I_S2k_Antiretrovirale_Therapie_der_HIV-Infektionen_2012-10.pdf (2012).
30. Burton, D. R.; Barbas, C. F.; Persson, M. A.; Koenig, S.; Chanock, R. M. & Lerner, R. A.: A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 10134–10137 (1991).
31. Burton, D. R.; Pyati, J.; Koduri, R.; Sharp, S. J.; Thornton, G. B.; Parren, P. W.; Sawyer, L. S.; Hendry, R. M.; Dunlop, N. & Nara, P. L.: Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody, *Science* **266**, 1024–1027 (1994).
32. Trkola, A.; Purtscher, M.; Muster, T.; Ballaun, C.; Buchacher, A.; Sullivan, N.; Srinivasan, K.; Sodroski, J.; Moore, J. P. & Katinger, H.: Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* **70**, 1100–1108 (1996).
33. Muster, T.; Steindl, F.; Purtscher, M.; Trkola, A.; Klima, A.; Himmler, G.; Rüker, F. & Katinger, H.: A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1, *J. Virol.* **67**, 6642–6647 (1993).
34. Robey, W. G.; Arthur, L. O.; Matthews, T. J.; Langlois, A.; Copeland, T. D.; Lerche, N. W.; Oroszlan, S.; Bolognesi, D. P.; Gilden, R. V. & Fischinger, P. J.: Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120-kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody, *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 7023–7027 (1986).
35. Berman, P. W.; Groopman, J. E.; Gregory, T.; Clapham, P. R.; Weiss, R. A.; Ferriani, R.; Riddle, L.; Shimasaki, C.; Lucas, C. & Lasky, L. A.: Human immunodeficiency virus type 1 challenge of chimpanzees immunized with recombinant envelope glycoprotein gp120, *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5200–5204 (1988).
36. Ho, D. D.; Kaplan, J. C.; Rackauskas, I. E. & Gurney, M. E.: Second conserved domain of gp120 is important for HIV infectivity and antibody neutralization, *Science* **239**, 1021–1023 (1988).
37. Nara, P. L.; Robey, W. G.; Pyle, S. W.; Hatch, W. C.; Dunlop, N. M.; Bess, J W Jr; Kelliher, J. C.; Arthur, L. O. & Fischinger, P. J.: Purified envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 variants induce individual, type-specific neutralizing antibodies, *J Virol* **62**, 2622–2628 (1988).
38. Earl, P. L.; Robert-Guroff, M.; Matthews, T. J.; Krohn, K.; London, W. T. & Moss, B.: Isolate- and group-specific immune responses to the envelope protein of human immunodeficiency virus induced by a live recombinant vaccinia virus in macaques, *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**, 23–32 (1989).
39. Haigwood, N. L.; Shuster, J. R.; Moore, G. K.; Lee, H.; Skiles, P. V.; Higgins, K. W.; Barr, P. J.; George-Nascimento, C. & Steimer, K. S.: Importance of hypervariable regions of HIV-1 gp120 in the generation of virus neutralizing antibodies, *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 855–869 (1990).
40. Berman, P. W.; Gregory, T. J.; Riddle, L.; Nakamura, G. R.; Champe, M. A.; Porter, J. P.; Wurm, F. M.; Hershberg, R. D.; Cobb, E. K. & Eichberg, J. W.: Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160, *Nature* **345**, 622–625 (1990).

41. Wrin, T. & Nunberg, J. H.: HIV-1MN recombinant gp120 vaccine serum, which fails to neutralize primary isolates of HIV-1, does not antagonize neutralization by antibodies from infected individuals, *AIDS* **8**, 1622–1623 (1994).
42. Mascola, J. R.; Snyder, S. W.; Weislow, O. S.; Belay, S. M.; Belshe, R. B.; Schwartz, D. H.; Clements, M. L.; Dolin, R.; Graham, B. S.; Gorse, G. J.; Keefer, M. C.; McElrath, M. J.; Walker, M. C.; Wagner, K. F.; McNeil, J. G.; McCutchan, F. E. & Burke, D. S.: Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group, *J Infect Dis* **173**, 340–348 (1996).
43. Barnett, S. W.; Rajasekar, S.; Legg, H.; Doe, B.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Walker, C. M. & Steimer, K. S.: Vaccination with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit, *Vaccine* **15**, 869–873 (1997).
44. Belshe, R. B.; Gorse, G. J.; Mulligan, M. J.; Evans, T. G.; Keefer, M. C.; Excler, J. L.; Duliege, A. M.; Tartaglia, J.; Cox, W. I.; McNamara, J.; Hwang, K. L.; Bradney, A.; Montefiori, D. & Weinhold, K. J.: Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group, *AIDS* **12**, 2407–2415 (1998).
45. Connor, R. I.; Korber, B. T.; Graham, B. S.; Hahn, B. H.; Ho, D. D.; Walker, B. D.; Neumann, A. U.; Vermund, S. H.; Mestecky, J.; Jackson, S.; Fenamore, E.; Cao, Y.; Gao, F.; Kalams, S.; Kunstman, K. J.; McDonald, D.; McWilliams, N.; Trkola, A.; Moore, J. P. & Wolinsky, S. M.: Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines, *J Virol* **72**, 1552–1576 (1998).
46. Hendrickson, W. A.; Kwong, P. D.; Wyatt, R.; Robinson, J.; Sweet, R. W. & Sodroski, J.: Structure of an HIVgp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, *Nature* **393**, 648–659 (1998).
47. Sanders, R. W.; Derking, R.; Cupo, A.; Julien, J.-P.; Yasmeen, A.; Val, N. de; Kim, H. J.; Blattner, C.; de la Peña, Alba Torrents; Korzun, J.; Golabek, M.; de Los Reyes, Kevin; Ketas, T. J.; van Gils, Marit J.; King, C. R.; Wilson, I. A.; Ward, A. B.; Klasse, P. J. & Moore, J. P.: A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies, *PLoS Pathog.* **9**, e1003618 (2013).
48. Cimbrow, R.; Gallant, T. R.; Dolan, M. A.; Guzzo, C.; Zhang, P.; Lin, Y.; Miao, H.; van Ryk, D.; Arthos, J.; Gorshkova, I.; Brown, P. H.; Hurt, D. E. & Lusso, P.: Tyrosine sulfation in the second variable loop (V2) of HIV-1 gp120 stabilizes V2-V3 interaction and modulates neutralization sensitivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2014).
49. Sodroski, J. G.; Wyatt, R.; Kwong, P. D.; Desjardins, E.; Sweet, R. W.; Robinson, J. & Hendrickson, W. A.: The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein, *Nature* **393**, 705–711 (1998).
50. Helseth, E.; Olshevsky, U.; Furman, C. & Sodroski, J.: Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein, *J Virol* **65**, 2119–2123 (1991).
51. Yang, X.; Mahony, E.; Holm, G. H.; Kassa, A. & Sodroski, J.: Role of the gp120 inner domain beta-sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits, *Virology* **313**, 117–125 (2003).

52. Myszka, D. G.; Sweet, R. W.; Hensley, P.; Brigham-Burke, M.; Kwong, P. D.; Hendrickson, W. A.; Wyatt, R.; Sodroski, J. & Doyle, M. L.: Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 9026–9031 (2000).
53. Pancera, M.; Majeed, S.; Ban, Y.-E. A.; Chen, L.; Huang, C.-c.; Kong, L.; Kwon, Y. D.; Stuckey, J.; Zhou, T.; Robinson, J. E.; Schief, W. R.; Sodroski, J.; Wyatt, R. & Kwong, P. D.: Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 1166–1171 (2010).
54. Kwong, P. D. & Mascola, J. R.: Human Antibodies that Neutralize HIV-1: Identification, Structures, and B Cell Ontogenies, *Immunity* **37**, 412–425 (2012).
55. Gray, E. S.; Madiga, M. C.; Hermanus, T.; Moore, P. L.; Wibmer, C. K.; Tumba, N. L.; Werner, L.; Mlisana, K.; Sibeko, S.; Williamson, C.; Abdool Karim, Salim S & Morris, L.: The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection, *J Virol* **85**, 4828–4840 (2011).
56. Mikell, I.; Sather, D. N.; Kalams, S. A.; Altfeld, M.; Alter, G. & Stamatatos, L.: Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1, *PLoS Pathog* **7**, e1001251 (2011).
57. Moore, P. L.; Gray, E. S.; Sheward, D.; Madiga, M.; Ranchobe, N.; Lai, Z.; Honnen, W. J.; Nonyane, M.; Tumba, N.; Hermanus, T.; Sibeko, S.; Mlisana, K.; Abdool Karim, Salim S; Williamson, C.; Pinter, A. & Morris, L.: Potent and broad neutralization of HIV-1 subtype C by plasma antibodies targeting a quaternary epitope including residues in the V2 loop, *J Virol* **85**, 3128–3141 (2011).
58. Kwong, P. D.; Mascola, J. R. & Nabel, G. J.: Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning, *Nat Rev Immunol* **13**, 693–701 (2013).
59. Zhou, T.; Xu, L.; Dey, B.; Hessel, A. J.; van Ryk, D.; Xiang, S.-H.; Yang, X.; Zhang, M.-Y.; Zwick, M. B.; Arthos, J.; Burton, D. R.; Dimitrov, D. S.; Sodroski, J.; Wyatt, R.; Nabel, G. J. & Kwong, P. D.: Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120, *Nature* **445**, 732–737 (2007).
60. Corti, D.; Langedijk, J. P. M.; Hinz, A.; Seaman, M. S.; Vanzetta, F.; Fernandez-Rodriguez, B. M.; Silacci, C.; Pinna, D.; Jarrossay, D.; Balla-Jhaghoorsingh, S.; Willems, B.; Zekveld, M. J.; Dreja, H.; O'Sullivan, E.; Pade, C.; Orkin, C.; Jeffs, S. A.; Montefiori, D. C.; Davis, D.; Weissenhorn, W.; McKnight, Å.; Heeney, J. L.; Sallusto, F.; Sattentau, Q. J.; Weiss, R. A.; Lanzavecchia, A. & Unutmaz, D.: Analysis of Memory B Cell Responses and Isolation of Novel Monoclonal Antibodies with Neutralizing Breadth from HIV-1-Infected Individuals, *PLoS ONE* **5**, e8805 (2010).
61. Wu, X.; Yang, Z.-Y.; Li, Y.; Hogerkorp, C.-M.; Schief, W. R.; Seaman, M. S.; Zhou, T.; Schmidt, S. D.; Wu, L.; Xu, L.; Longo, N. S.; McKee, K.; O'Dell, S.; Louder, M. K.; Wycuff, D. L.; Feng, Y.; Nason, M.; Doria-Rose, N.; Connors, M.; Kwong, P. D.; Roederer, M.; Wyatt, R. T.; Nabel, G. J. & Mascola, J. R.: Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1, *Science* **329**, 856–861 (2010).
62. Zhou, T.; Georgiev, I.; Wu, X.; Yang, Z.-Y.; Dai, K.; Finzi, A.; Do Kwon, Y.; Scheid, J. F.; Shi, W.; Xu, L.; Yang, Y.; Zhu, J.; Nussenzweig, M. C.; Sodroski, J.; Shapiro, L.; Nabel, G. J.; Mascola, J. R. & Kwong, P. D.: Structural Basis for Broad and Potent Neutralization of HIV-1 by Antibody VRC01, *Science* **329**, 811–817 (2010).

63. Scheid, J. F.; Mouquet, H.; Ueberheide, B.; Diskin, R.; Klein, F.; Oliveira, Thiago Y K; Pietzsch, J.; Fenyo, D.; Abadir, A.; Velinzon, K.; Hurley, A.; Myung, S.; Boulad, F.; Poignard, P.; Burton, D. R.; Pereyra, F.; Ho, D. D.; Walker, B. D.; Seaman, M. S.; Bjorkman, P. J.; Chait, B. T. & Nussenzweig, M. C.: Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding, *Science* **333**, 1633–1637 (2011).
64. Wu, X.; Zhou, T.; Zhu, J.; Zhang, B.; Georgiev, I.; Wang, C.; Chen, X.; Longo, N. S.; Louder, M.; McKee, K.; O'Dell, S.; Perfetto, S.; Schmidt, S. D.; Shi, W.; Wu, L.; Yang, Y.; Yang, Z.-Y.; Yang, Z.; Zhang, Z.; Bonsignori, M.; Crump, J. A.; Kapiga, S. H.; Sam, N. E.; Haynes, B. F.; Simek, M.; Burton, D. R.; Koff, W. C.; Doria-Rose, N. A.; Connors, M.; Mullikin, J. C.; Nabel, G. J.; Roederer, M.; Shapiro, L.; Kwong, P. D. & Mascola, J. R.: Focused Evolution of HIV-1 Neutralizing Antibodies Revealed by Structures and Deep Sequencing, *Science* **333**, 1593–1602 (2011).
65. Zhou, T.; Zhu, J.; Wu, X.; Moquin, S.; Zhang, B.; Acharya, P.; Georgiev, I. S.; Altae-Tran, H. R.; Chuang, G.-Y.; Joyce, M. G.; Do Kwon, Y.; Longo, N. S.; Louder, M. K.; Luongo, T.; McKee, K.; Schramm, C. A.; Skinner, J.; Yang, Y.; Yang, Z.; Zhang, Z.; Zheng, A.; Bonsignori, M.; Haynes, B. F.; Scheid, J. F.; Nussenzweig, M. C.; Simek, M.; Burton, D. R.; Koff, W. C.; Mullikin, J. C.; Connors, M.; Shapiro, L.; Nabel, G. J.; Mascola, J. R. & Kwong, P. D.: Multidonor analysis reveals structural elements, genetic determinants, and maturation pathway for HIV-1 neutralization by VRC01-class antibodies, *Immunity* **39**, 245–258 (2013).
66. Liao, H.-X.; Lynch, R.; Zhou, T.; Gao, F.; Alam, S. M.; Boyd, S. D.; Fire, A. Z.; Roskin, K. M.; Schramm, C. A.; Zhang, Z.; Zhu, J.; Shapiro, L.; Becker, J.; Benjamin, B.; Blakesley, R.; Bouffard, G.; Brooks, S.; Coleman, H.; Dekhtyar, M.; Gregory, M.; Guan, X.; Gupta, J.; Han, J.; Hargrove, A.; Ho, S.-I.; Johnson, T.; Legaspi, R.; Lovett, S.; Maduro, Q.; Masiello, C.; Maskeri, B.; McDowell, J.; Montemayor, C.; Mullikin, J.; Park, M.; Riebow, N.; Schandler, K.; Schmidt, B.; Sison, C.; Stantripop, M.; Thomas, J.; Thomas, P.; Vemulapalli, M.; Young, A.; Mullikin, J. C.; Gnanakaran, S.; Hraber, P.; Wiehe, K.; Kelsoe, G.; Yang, G.; Xia, S.-M.; Montefiori, D. C.; Parks, R.; Lloyd, K. E.; Searce, R. M.; Soderberg, K. A.; Cohen, M.; Kamanga, G.; Louder, M. K.; Tran, L. M.; Chen, Y.; Cai, F.; Chen, S.; Moquin, S.; Du, X.; Joyce, M. G.; Srivatsan, S.; Zhang, B.; Zheng, A.; Shaw, G. M.; Hahn, B. H.; Kepler, T. B.; Korber, B. T. M.; Kwong, P. D.; Mascola, J. R. & Haynes, B. F.: Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus, *Nature* **496**, 469–476 (2013).
67. Walker, L. M.; Phogat, S. K.; Chan-Hui, P.-Y.; Wagner, D.; Phung, P.; Goss, J. L.; Wrin, T.; Simek, M. D.; Fling, S.; Mitcham, J. L.; Lehrman, J. K.; Priddy, F. H.; Olsen, O. A.; Frey, S. M.; Hammond, P. W.; Kaminsky, S.; Zamb, T.; Moyle, M.; Koff, W. C.; Poignard, P. & Burton, D. R.: Broad and Potent Neutralizing Antibodies from an African Donor Reveal a New HIV-1 Vaccine Target, *Science* **326**, 285–289 (2009).
68. Pejchal, R.; Walker, L. M.; Stanfield, R. L.; Phogat, S. K.; Koff, W. C.; Poignard, P.; Burton, D. R. & Wilson, I. A.: Structure and function of broadly reactive antibody PG16 reveal an H3 subdomain that mediates potent neutralization of HIV-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11483–11488 (2010).
69. McLellan, J. S.; Pancera, M.; Carrico, C.; Gorman, J.; Julien, J.-P.; Khayat, R.; Louder, R.; Pejchal, R.; Sastry, M.; Dai, K.; O'Dell, S.; Patel, N.; Shahzad-ul-Hussan, S.; Yang, Y.; Zhang, B.; Zhou, T.; Zhu, J.; Boyington, J. C.; Chuang, G.-Y.; Diwanji, D.; Georgiev, I.; Do Kwon, Y.; Lee, D.; Louder, M. K.; Moquin, S.; Schmidt, S. D.; Yang, Z.-Y.; Bonsignori, M.; Crump, J. A.; Kapiga, S. H.; Sam, N. E.; Haynes, B. F.; Burton, D. R.; Koff, W. C.; Walker, L. M.; Phogat, S.; Wyatt, R.; Orwenyo, J.; Wang, L.-X.; Arthos, J.; Bewley, C. A.;

- Mascola, J. R.; Nabel, G. J.; Schief, W. R.; Ward, A. B.; Wilson, I. A. & Kwong, P. D.: Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9, *Nature* **480**, 336–343 (2011).
70. Pancera, M.; Shahzad-ul-Hussan, S.; Doria-Rose, N. A.; McLellan, J. S.; Bailer, R. T.; Dai, K.; Loesgen, S.; Louder, M. K.; Staupe, R. P.; Yang, Y.; Zhang, B.; Parks, R.; Eudailey, J.; Lloyd, K. E.; Blinn, J.; Alam, S. M.; Haynes, B. F.; Amin, M. N.; Wang, L.-X.; Burton, D. R.; Koff, W. C.; Nabel, G. J.; Mascola, J. R.; Bewley, C. A. & Kwong, P. D.: Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1-neutralizing V1-V2-directed antibody PG16, *Nat Struct Mol Biol* **20**, 804–813 (2013).
71. Julien, J.-P.; Lee, J. H.; Cupo, A.; Murin, C. D.; Derking, R.; Hoffenberg, S.; Caulfield, M. J.; King, C. R.; Marozsan, A. J.; Klasse, P. J.; Sanders, R. W.; Moore, J. P.; Wilson, I. A. & Ward, A. B.: Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4351–4356 (2013).
72. Pancera, M.; McLellan, J. S.; Wu, X.; Zhu, J.; Changela, A.; Schmidt, S. D.; Yang, Y.; Zhou, T.; Phogat, S.; Mascola, J. R. & Kwong, P. D.: Crystal structure of PG16 and chimeric dissection with somatically related PG9: structure-function analysis of two quaternary-specific antibodies that effectively neutralize HIV-1, *J Virol* **84**, 8098–8110 (2010).
73. Walker, L. M.; Huber, M.; Doores, K. J.; Falkowska, E.; Pejchal, R.; Julien, J.-P.; Wang, S.-K.; Ramos, A.; Chan-Hui, P.-Y.; Moyle, M.; Mitcham, J. L.; Hammond, P. W.; Olsen, O. A.; Phung, P.; Fling, S.; Wong, C.-H.; Phogat, S.; Wrinn, T.; Simek, M. D.; Principal Investigators, P. G.; Koff, W. C.; Wilson, I. A.; Burton, D. R. & Poignard, P.: Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies, *Nature* **477**, 466–470 (2011).
74. Trkola, A.; Pomales, A. B.; Yuan, H.; Korber, B.; Maddon, P. J.; Allaway, G. P.; Katinger, H.; Barbas, C F 3rd; Burton, D. R. & Ho, D. D.: Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG, *J Virol* **69**, 6609–6617 (1995).
75. Calarese, D. A.; Scanlan, C. N.; Zwick, M. B.; Deechongkit, S.; Mimura, Y.; Kunert, R.; Zhu, P.; Wormald, M. R.; Stanfield, R. L.; Roux, K. H.; Kelly, J. W.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Katinger, H.; Burton, D. R. & Wilson, I. A.: Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition, *Science* **300**, 2065–2071 (2003).
76. Mouquet, H.; Warncke, M.; Scheid, J. F.; Seaman, M. S. & Nussenzweig, M. C.: Enhanced HIV-1 neutralization by antibody heterooligomerization, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 875–880 (2012).
77. Julien, J.-P.; Sok, D.; Khayat, R.; Lee, J. H.; Doores, K. J.; Walker, L. M.; Ramos, A.; Diwanji, D. C.; Pejchal, R.; Cupo, A.; Katpally, U.; Depetris, R. S.; Stanfield, R. L.; McBride, R.; Marozsan, A. J.; Paulson, J. C.; Sanders, R. W.; Moore, J. P.; Burton, D. R.; Poignard, P.; Ward, A. B. & Wilson, I. A.: Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans, *PLoS Pathog* **9**, e1003342 (2013).
78. Pejchal, R.; Doores, K. J.; Walker, L. M.; Khayat, R.; Huang, P.-S.; Wang, S.-K.; Stanfield, R. L.; Julien, J.-P.; Ramos, A.; Crispin, M.; Depetris, R.; Katpally, U.; Marozsan, A.; Cupo, A.; Malveste, S.; Liu, Y.; McBride, R.; Ito, Y.; Sanders, R. W.; Ogohara, C.; Paulson, J. C.; Feizi, T.; Scanlan, C. N.; Wong, C.-H.; Moore, J. P.; Olson, W. C.; Ward, A. B.; Poignard, P.; Schief, W. R.; Burton, D. R. & Wilson, I. A.: A potent and broad

- neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield, *Science* **334**, 1097–1103 (2011).
79. Kong, L.; Lee, J. H.; Doores, K. J.; Murin, C. D.; Julien, J.-P.; McBride, R.; Liu, Y.; Marozsan, A.; Cupo, A.; Klasse, P.-J.; Hoffenberg, S.; Caulfield, M.; King, C. R.; Hua, Y.; Le, K. M.; Khayat, R.; Deller, M. C.; Clayton, T.; Tien, H.; Feizi, T.; Sanders, R. W.; Paulson, J. C.; Moore, J. P.; Stanfield, R. L.; Burton, D. R.; Ward, A. B. & Wilson, I. A.: Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120, *Nat Struct Mol Biol* **20**, 796–803 (2013).
80. Ofek, G.; Tang, M.; Sambor, A.; Katinger, H.; Mascola, J. R.; Wyatt, R. & Kwong, P. D.: Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope, *J Virol* **78**, 10724–10737 (2004).
81. Ofek, G.; McKee, K.; Yang, Y.; Yang, Z.-Y.; Skinner, J.; Guenaga, F. J.; Wyatt, R.; Zwick, M. B.; Nabel, G. J.; Mascola, J. R. & Kwong, P. D.: Relationship between antibody 2F5 neutralization of HIV-1 and hydrophobicity of its heavy chain third complementarity-determining region, *J Virol* **84**, 2955–2962 (2010).
82. Buchacher, A.; Predl, R.; Strutzenberger, K.; Steinfellner, W.; Trkola, A.; Purtscher, M.; Gruber, G.; Tauer, C.; Steindl, F. & Jungbauer, A.: Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 359–369 (1994).
83. Cardoso, Rosa M F; Zwick, M. B.; Stanfield, R. L.; Kunert, R.; Binley, J. M.; Katinger, H.; Burton, D. R. & Wilson, I. A.: Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41, *Immunity* **22**, 163–173 (2005).
84. Huang, J.; Ofek, G.; Laub, L.; Louder, M. K.; Doria-Rose, N. A.; Longo, N. S.; Imamichi, H.; Bailer, R. T.; Chakrabarti, B.; Sharma, S. K.; Alam, S. M.; Wang, T.; Yang, Y.; Zhang, B.; Migueles, S. A.; Wyatt, R.; Haynes, B. F.; Kwong, P. D.; Mascola, J. R. & Connors, M.: Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody, *Nature* **491**, 406–412 (2012).
85. Zwick, M. B.; Labrijn, A. F.; Wang, M.; Spenlehauer, C.; Saphire, E. O.; Binley, J. M.; Moore, J. P.; Stiegler, G.; Katinger, H.; Burton, D. R. & Parren, P. W.: Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41, *J Virol* **75**, 10892–10905 (2001).
86. Sun, Z.-Y. J.; Oh, K. J.; Kim, M.; Yu, J.; Brusic, V.; Song, L.; Qiao, Z.; Wang, J.-h.; Wagner, G. & Reinherz, E. L.: HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane, *Immunity* **28**, 52–63 (2008).
87. Haynes, B. F.; Fleming, J.; St Clair, E William; Katinger, H.; Stiegler, G.; Kunert, R.; Robinson, J.; Searce, R. M.; Plonk, K.; Staats, H. F.; Ortel, T. L.; Liao, H.-X. & Alam, S. M.: Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies, *Science* **308**, 1906–1908 (2005).
88. Alam, S. M.; McAdams, M.; Boren, D.; Rak, M.; Searce, R. M.; Gao, F.; Camacho, Z. T.; Gewirth, D.; Kelsoe, G.; Chen, P. & Haynes, B. F.: The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes, *J Immunol* **178**, 4424–4435 (2007).

89. Matyas, G. R.; Wieczorek, L.; Beck, Z.; Ochsenbauer-Jambor, C.; Kappes, J. C.; Michael, N. L.; Polonis, V. R. & Alving, C. R.: Neutralizing antibodies induced by liposomal HIV-1 glycoprotein 41 peptide simultaneously bind to both the 2F5 or 4E10 epitope and lipid epitopes, *AIDS* **23**, 2069–2077 (2009).
90. Nemazee, D. A. & Burki, K.: Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes, *Nature* **337**, 562–566 (1989).
91. Venditto, V. J.; Watson, D. S.; Motion, M.; Montefiori, D. & Szoka, F. C.: Rational design of membrane proximal external region lipopeptides containing chemical modifications for HIV-1 vaccination, *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 39–45 (2013).
92. Georgiev, I. S.; Rudicell, R. S.; Saunders, K. O.; Shi, W.; Kirys, T.; McKee, K.; O'Dell, S.; Chuang, G.-Y.; Yang, Z.-Y.; Ofek, G.; Connors, M.; Mascola, J. R.; Nabel, G. J. & Kwong, P. D.: Antibodies VRC01 and 10E8 Neutralize HIV-1 with High Breadth and Potency Even with Ig-Framework Regions Substantially Reverted to Germline, *The Journal of Immunology* (2014).
93. Serrano, S.; Araujo, A.; Apellaniz, B.; Bryson, S.; Carravilla, P.; De la Arada, Igor; Huarte, N.; Rujas, E.; Pai, E. F.; Arrondo, Jose L R; Domene, C.; Jimenez, M. A. & Nieva, J. L.: Structure and Immunogenicity of a Peptide Vaccine Including the Complete HIV-1 gp41 2F5 Epitope. Implications for Antibody Recognition Mechanism and Immunogen Design, *J Biol Chem* (2014).
94. Tiller, T.; Meffre, E.; Yurasov, S.; Tsuiji, M.; Nussenzweig, M. C. & Wardemann, H.: Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning, *J Immunol Methods* **329**, 112–124 (2008).
95. Doores, K. J.; Fulton, Z.; Huber, M.; Wilson, I. A. & Burton, D. R.: Antibody 2G12 recognizes di-mannose equivalently in domain- and nondomain-exchanged forms but only binds the HIV-1 glycan shield if domain exchanged, *J Virol* **84**, 10690–10699 (2010).
96. Falkowska, E.; Ramos, A.; Feng, Y.; Zhou, T.; Moquin, S.; Walker, L. M.; Wu, X.; Seaman, M. S.; Wrin, T.; Kwong, P. D.; Wyatt, R. T.; Mascola, J. R.; Poignard, P. & Burton, D. R.: PGV04, an HIV-1 gp120 CD4 Binding Site Antibody, Is Broad and Potent in Neutralization but Does Not Induce Conformational Changes Characteristic of CD4, *Journal of Virology* **86**, 4394–4403 (2012).
97. Diskin, R.; Scheid, J. F.; Marcovecchio, P. M.; West, A. P.; Klein, F.; Gao, H.; Gnanapragasam, P. N. P.; Abadir, A.; Seaman, M. S.; Nussenzweig, M. C. & Bjorkman, P. J.: Increasing the Potency and Breadth of an HIV Antibody by Using Structure-Based Rational Design, *Science* **334**, 1289–1293 (2011).
98. Chen, L.; Do Kwon, Y.; Zhou, T.; Wu, X.; O'Dell, S.; Cavacini, L.; Hessel, A. J.; Pancera, M.; Tang, M.; Xu, L.; Yang, Z.-Y.; Zhang, M.-Y.; Arthos, J.; Burton, D. R.; Dimitrov, D. S.; Nabel, G. J.; Posner, M. R.; Sodroski, J.; Wyatt, R.; Mascola, J. R. & Kwong, P. D.: Structural Basis of Immune Evasion at the Site of CD4 Attachment on HIV-1 gp120, *Science* **326**, 1123–1127 (2009).
99. Barbas, C. F.; Collet, T. A.; Amberg, W.; Roben, P.; Binley, J. M.; Hoekstra, D.; Cababa, D.; Jones, T. M.; Williamson, R. A.; Pilkington, G. R.; Haigwood, N. L.; Cabezas, E.; Satterthwait, A. C.; Sanz, I. & Burton, D. R.: Molecular Profile of an Antibody Response to HIV-1 as Probed by Combinatorial Libraries, *Journal of Molecular Biology* **230**, 812–823 (1993).
100. Moore, J. P. & Sodroski, J.: Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein. *Journal of Virology*, 1863–1873 (1996).

101. Hackenberger, C.: Proteinstrukturen aus dem Chemie-Baukasten. Definierte Peptidarchitekturen, *Chem. Unserer Zeit* **40**, 174–183 (2006).
102. Schulz, G. E. & Schirmer, R. H. *Principles of protein structure* (Springer-Verlag, New York, 1979).
103. Craik, D. J.; Fairlie, D. P.; Liras, S. & Price, D.: The future of peptide-based drugs, *Chem Biol Drug Des* **81**, 136–147 (2013).
104. Merrifield, R. B.: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
105. Guzman, F.; Barberis, S. & Illanes, A.: Peptide synthesis: chemical or enzymatic, *Electron. J. Biotechnol.* **10**, 0 (2007).
106. Fields, G. B. & Noble, R. L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int J Pept Protein Res* **35**, 161–214 (1990).
107. Carpino, L. A. & Han, G. Y.: 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.* **37**, 3404–3409 (1972).
108. Deber, C. M.; Luterk, M. K.; Heimer, E. P. & Felix, A. M.: Conformational origin of a difficult coupling in a human growth hormone releasing factor analog, *Pept Res* **2**, 184–188 (1989).
109. Ludwick, A. G.; Jelinski, L. W.; Live, D.; Kintanar, A. & Dumais, J. J.: Association of peptide chains during Merrifield solid-phase peptide synthesis. A deuterium NMR study, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6493–6496 (1986).
110. Narita, M.; Honda, S.; Umeyama, H. & Ogura, T.: Infrared spectroscopic conformational analysis of polystyrene resin-bound human proinsulin C-peptide fragments. .BETA.-Sheet aggregation of peptide chains during solid-phase peptide synthesis, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **61**, 1201–1206 (1988).
111. Narita, M.; Isokawa, S.; Tomotake, Y. & Nagasawa, S.: Synthesis and the Solid-State Conformations of Cross-Linked Resin-Bound Oligo(leucine)s.1,2 Internal Aggregations through the Intermolecular Hydrogen Bonding of the Oligopeptides on the Polymer Networks, *Polym J* **15**, 25–32 (1983).
112. Larsen, B. D.; Christensen, D. H.; Holm, A.; Zillmer, R. & Nielsen, O. F.: The Merrifield peptide synthesis studied by near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6247–6253 (1993).
113. Tam, J. P. & Lu, Y.-A.: Coupling Difficulty Associated with Interchain Clustering and Phase Transition in Solid Phase Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12058–12063 (1995).
114. Sarin, V. K.; Kent, Stephen B. H. & Merrifield, R. B.: Properties of swollen polymer networks. Solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5463–5470 (1980).
115. Hyde, C.; Johnson, T.; Owen, D.; Quibell, M. & Sheppard, R. C.: Some 'difficult sequences' made easy. A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis, *Int J Pept Protein Res* **43**, 431–440 (1994).
116. Johnson, T.; Quibell, M. & Sheppard, R. C.: N,O-bisFmoc derivatives of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-amino acids: useful intermediates in peptide synthesis, *J Pept Sci* **1**, 11–25 (1995).

117. Haack, T. & Mutter, M.: Serine derived oxazolidines as secondary structure disrupting, solubilizing building blocks in peptide synthesis, *Tetrahedron Letters* **33**, 1589–1592 (1992).
118. Wöhr, T.; Wahl, F.; Nefzi, A.; Rohwedder, B.; Sato, T.; Sun, X. & Mutter, M.: Pseudo-Prolines as a Solubilizing, Structure-Disrupting Protection Technique in Peptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9218–9227 (1996).
119. Mutter, M.; Chandravarkar, A.; Boyat, C.; Lopez, J.; Dos Santos, S.; Mandal, B.; Mimna, R.; Murat, K.; Patiny, L.; Saucedo, L. & Tuchscherer, G.: Switch peptides in statu nascendi: induction of conformational transitions relevant to degenerative diseases, *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 4172–4178 (2004).
120. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T. & Kiso, Y.: Novel and efficient synthesis of difficult sequence-containing peptides through O-N intramolecular acyl migration reaction of O-acyl isopeptides, *Chem. Commun. (Camb.)*, 124–125 (2004).
121. Carpino, L. A.; Krause, E.; Sferdean, C. D.; Schümann, M.; Fabian, H.; Bienert, M. & Beyermann, M.: Synthesis of 'difficult' peptide sequences: application of a depsipeptide technique to the Jung–Redemann 10- and 26-mers and the amyloid peptide A β (1–42), *Tetrahedron Letters* **45**, 7519–7523 (2004).
122. Thayer, A. M.: Improving Peptides, *Chem. Eng. News Archive* **89**, 13–20 (2011).
123. IMS Health zitiert nach de.statista.com: Umsatz des weltweiten Pharmamarktes in den Jahren 2003 bis 2012 (in Milliarden US-Dollar). Verfügbar unter <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/72992/umfrage/umsatz-auf-dem-weltweiten-pharamamarkt-seit-2004/> (2013).
124. Kaspar, A. A. & Reichert, J. M.: Future directions for peptide therapeutics development, *Drug Discov Today* **18**, 807–817 (2013).
125. Hummel, G.; Reineke, U. & Reimer, U.: Translating peptides into small molecules, *Mol Biosyst* **2**, 499–508 (2006).
126. Loffet, A.: Peptides as drugs: is there a market?, *J Pept Sci* **8**, 1–7 (2002).
127. McGregor, D. P.: Discovering and improving novel peptide therapeutics, *Curr Opin Pharmacol* **8**, 616–619 (2008).
128. Ladner, R. C.; Sato, A. K.; Gorzelany, J. & Souza, M. de: Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies, *Drug Discov Today* **9**, 525–529 (2004).
129. Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J. & Khrestchatisky, M.: Synthetic therapeutic peptides: science and market, *Drug Discov Today* **15**, 40–56 (2010).
130. Wild, C.; Oas, T.; McDanal, C.; Bolognesi, D. & Matthews, T.: A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10537–10541 (1992).
131. Wild, C.; Dubay, J. W.; Greenwell, T.; Baird, T. JR; Oas, T. G.; McDanal, C.; Hunter, E. & Matthews, T.: Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12676–12680 (1994).
132. Wild, C.; Greenwell, T. & Matthews, T.: A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion, *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 1051–1053 (1993).

133. Wild, C. T.; Shugars, D. C.; Greenwell, T. K.; McDanal, C. B. & Matthews, T. J.: Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9770–9774 (1994).
134. Kliger, Y.; Gallo, S. A.; Peisajovich, S. G.; Munoz-Barroso, I.; Avkin, S.; Blumenthal, R. & Shai, Y.: Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage, *J Biol Chem* **276**, 1391–1397 (2001).
135. Liu, S.; Lu, H.; Niu, J.; Xu, Y.; Wu, S. & Jiang, S.: Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120, *J Biol Chem* **280**, 11259–11273 (2005).
136. Liu, J.; Bartsaghi, A.; Borgnia, M. J.; Sapiro, G. & Subramaniam, S.: Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers, *Nature* **455**, 109–113 (2008).
137. Yuan, W.; Craig, S.; Si, Z.; Farzan, M. & Sodroski, J.: CD4-induced T-20 binding to human immunodeficiency virus type 1 gp120 blocks interaction with the CXCR4 coreceptor, *J Virol* **78**, 5448–5457 (2004).
138. Alam, S. M.; Paleos, C. A.; Liao, H.-X.; Searce, R.; Robinson, J. & Haynes, B. F.: An inducible HIV type 1 gp41 HR-2 peptide-binding site on HIV type 1 envelope gp120, *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**, 836–845 (2004).
139. Greenberg, M. L. & Cammack, N.: Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor, *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 333–340 (2004).
140. Eichler, J.: Peptides as protein binding site mimetics, *Current Opinion in Chemical Biology* **12**, 707–713 (2008).
141. Franke, R.; Hirsch, T.; Overwin, H. & Eichler, J.: Synthetische Mimetika der CD4-Bindungsstelle von HIV-1 gp120 für das Immunogen-Design, *Angew. Chem.* **119**, 1275–1277 (2007).
142. Huang, C.-c.; Venturi, M.; Majeed, S.; Moore, M. J.; Phogat, S.; Zhang, M.-Y.; Dimitrov, D. S.; Hendrickson, W. A.; Robinson, J.; Sodroski, J.; Wyatt, R.; Choe, H.; Farzan, M. & Kwong, P. D.: Structural basis of tyrosine sulfation and VH-gene usage in antibodies that recognize the HIV type 1 coreceptor-binding site on gp120, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 2706–2711 (2004).
143. Rock, K.; Gamble, S. & Rothstein, L.: Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules, *Science* **249**, 918–921 (1990).
144. Kovacsics-Bankowski, M. & Rock, K. L.: A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules, *Science* **267**, 243–246 (1995).
145. Pulendran, B. & Ahmed, R.: Immunological mechanisms of vaccination, *Nat Immunol* **12**, 509–517 (2011).
146. Demento, S. L.; Siefert, A. L.; Bandyopadhyay, A.; Sharp, F. A. & Fahmy, T. M.: Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines, *Trends Biotechnol* **29**, 294–306 (2011).
147. Bijker, M. S.; Melief, C. J. M.; Offringa, R. & van der Burg, Sjoerd H: Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future, *Expert Review of Vaccines* **6**, 591–603 (2007).
148. Klein, J. & Sato, A.: The HLA system. First of two parts, *N Engl J Med* **343**, 702–709 (2000).

149. Klein, J. & Sato, A.: The HLA system. Second of two parts, *N Engl J Med* **343**, 782–786 (2000).
150. Ben-Yedidia, T. & Arnon, R.: Epitope-based vaccine against influenza, *Expert Rev Vaccines* **6**, 939–948 (2007).
151. van der Burg, Sjoerd H; Bijker, M. S.; Welters, Marij J P; Offringa, R. & Melief, Cornelis J M: Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy, *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 916–930 (2006).
152. Purcell, A. W.; McCluskey, J. & Rossjohn, J.: More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design, *Nat Rev Drug Discov* **6**, 404–414 (2007).
153. Means, R. E.; Greenough, T. & Derosiers, R. C.: Neutralization sensitivity of cell culture-passaged simian immunodeficiency virus, *Journal of Virology* **71**, 7895–7902 (1997).
154. Köhler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **256**, 495–497 (1975).
155. Margulies, D. H.: Monoclonal antibodies: producing magic bullets by somatic cell hybridization, *J Immunol* **174**, 2451–2452 (2005).
156. Breden, F.; Lepik, C.; Longo, N. S.; Montero, M.; Lipsky, P. E.; Scott, J. K. & Cardona, P.-J.: Comparison of Antibody Repertoires Produced by HIV-1 Infection, Other Chronic and Acute Infections, and Systemic Autoimmune Disease, *PLoS ONE* **6**, e16857 (2011).
157. Kelker, H. C.; Itri, V. R.; Valentine, F. T. & Ndhlovu, L. C.: A Strategy for Eliciting Antibodies against Cryptic, Conserved, Conformationally Dependent Epitopes of HIV Envelope Glycoprotein, *PLoS ONE* **5**, e8555 (2010).
158. Olshevsky, U.; Helseth, E.; Furman, C.; Li, J.; Haseltine, W. & Sodroski, J.: Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding, *J. Virol.* **64**, 5701–5707 (1990).
159. abYsis: Datenbank. Verfügbar unter <http://www.bioinf.org.uk/abysis/searches/distributions/distributions.html> (2014).
160. Zwick, M. B.; Parren, P. W. H. I.; Saphire, E. O.; Church, S.; Wang, M.; Scott, J. K.; Dawson, P. E.; Wilson, I. A. & Burton, D. R.: Molecular Features of the Broadly Neutralizing Immunoglobulin G1 b12 Required for Recognition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120, *Journal of Virology* **77**, 5863–5876 (2003).
161. Wu, X.; Zhou, T.; O'Dell, S.; Wyatt, R. T.; Kwong, P. D. & Mascola, J. R.: Mechanism of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance to Monoclonal Antibody b12 That Effectively Targets the Site of CD4 Attachment, *Journal of Virology* **83**, 10892–10907 (2009).
162. Saphire, E. O.: Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design, *Science* **293**, 1155–1159 (2001).
163. Bublil, E. M.; Freund, N. T.; Mayrose, I.; Penn, O.; Roitburd-Berman, A.; Rubinstein, N. D.; Pupko, T. & Gershoni, J. M.: Stepwise prediction of conformational discontinuous B-cell epitopes using the Mapitope algorithm, *Proteins* **68**, 294–304 (2007).
164. Bublil, E. M.: Computational prediction of the cross-reactive neutralizing epitope corresponding to the monoclonal antibody b12 specific for HIV-1 gp120, *The FASEB Journal* **20**, 1762–1774 (2006).

165. Emileh, A. & Abrams, C. F.: A mechanism by which binding of the broadly neutralizing antibody b12 unfolds the inner domain $\alpha 1$ helix in an engineered HIV-1 gp120, *Proteins* **79**, 537–546 (2011).
166. Davies, J. S.: The cyclization of peptides and depsipeptides, *J. Peptide Sci.* **9**, 471–501 (2003).
167. Sullivan, N.; Sun, Y.; Li, J.; Hofmann, W. & Sodroski, J.: Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates, *J. Virol.* **69**, 4413–4422 (1995).
168. Pantophlet, R.; Ollmann Saphire, E.; Poignard, P.; Parren, P. W. H. I.; Wilson, I. A. & Burton, D. R.: Fine Mapping of the Interaction of Neutralizing and Nonneutralizing Monoclonal Antibodies with the CD4 Binding Site of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120, *Journal of Virology* **77**, 642–658 (2003).
169. Richardson, J. S.: The anatomy and taxonomy of protein structure, *Adv. Protein Chem.* **34**, 167–339 (1981).
170. Stewart, D. E.; Sarkar, A. & Wampler, J. E.: Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures, *Journal of Molecular Biology* **214**, 253–260 (1990).
171. Yolamanova, M.; Meier, C.; Shaytan, A. K.; Vas, V.; Bertoncini, C. W.; Arnold, F.; Zirafi, O.; Usmani, S. M.; Müller, J. A.; Sauter, D.; Goffinet, C.; Palesch, D.; Walther, P.; Roan, N. R.; Geiger, H.; Lunov, O.; Simmet, T.; Bohne, J.; Schrezenmeier, H.; Schwarz, K.; Ständker, L.; Forssmann, W.-G.; Salvatella, X.; Khalatur, P. G.; Khokhlov, A. R.; Knowles, Thomas P. J.; Weil, T.; Kirchhoff, F. & Münch, J.: Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses, *Nature Nanotech* **8**, 130–136 (2013).
172. Davis, H. E.; Morgan, J. R. & Yarmush, M. L.: Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes, *Biophys Chem* **97**, 159–172 (2002).
173. Toyoshima, K. & Vogt, P. K.: Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions, *Virology* **38**, 414–426 (1969).
174. Davis, H. E.; Rosinski, M.; Morgan, J. R. & Yarmush, M. L.: Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation, *Biophys J* **86**, 1234–1242 (2004).
175. Cornetta, K. & Anderson, W. F.: Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy, *J Virol Methods* **23**, 187–194 (1989).
176. Fenard, D.; Ingraio, D.; Seye, A.; Buisset, J.; Genries, S.; Martin, S.; Kichler, A. & Galy, A.: Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells, *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e90 (2013).
177. Münch, J.; Rücker, E.; Ständker, L.; Adermann, K.; Goffinet, C.; Schindler, M.; Wildum, S.; Chinnadurai, R.; Rajan, D.; Specht, A.; Giménez-Gallego, G.; Sánchez, P. C.; Fowler, D. M.; Koulov, A.; Kelly, J. W.; Mothes, W.; Grivel, J.-C.; Margolis, L.; Keppler, O. T.; Forssmann, W.-G. & Kirchhoff, F.: Semen-Derived Amyloid Fibrils Drastically Enhance HIV Infection, *Cell* **131**, 1059–1071 (2007).
178. Arnold, F.; Schnell, J.; Zirafi, O.; Sturzel, C.; Meier, C.; Weil, T.; Standker, L.; Forssmann, W.-G.; Roan, N. R.; Greene, W. C.; Kirchhoff, F. & Münch, J.: Naturally occurring fragments from two distinct regions of the prostatic acid phosphatase form amyloidogenic enhancers of HIV infection, *J Virol* **86**, 1244–1249 (2012).

179. Roan, N. R.; Müller, J. A.; Liu, H.; Chu, S.; Arnold, F.; Stürzel, C. M.; Walther, P.; Dong, M.; Witkowska, H. E.; Kirchhoff, F.; Münch, J. & Greene, W. C.: Peptides Released by Physiological Cleavage of Semen Coagulum Proteins Form Amyloids that Enhance HIV Infection, *Cell Host & Microbe* **10**, 541–550 (2011).
180. Zhang, L.; Jiang, C.; Zhang, H.; Gong, X.; Yang, L.; Miao, L.; Shi, Y.; Zhang, Y.; Kong, W.; Zhang, C. & Shan, Y.: A novel modified peptide derived from membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 envelope significantly enhances retrovirus infection, *J. Pept. Sci.* n/a (2013).
181. Leydet, A.; Moullet, C.; Roque, J. P.; Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Neyts, J.; Schols, D. & Clercq, E. de: Polyanion inhibitors of HIV and other viruses. 7. Polyanionic compounds and polyzwitterionic compounds derived from cyclodextrins as inhibitors of HIV transmission, *J Med Chem* **41**, 4927–4932 (1998).
182. Leydet, A.; Barragan, V.; Boyer, B.; Montero, J. L.; Roque, J. P.; Witvrouw, M.; Este, J.; Snoeck, R.; Andrei, G. & Clercq, E. de: Polyanion inhibitors of human immunodeficiency virus and other viruses. 5. Telomerized anionic surfactants derived from amino acids, *J Med Chem* **40**, 342–349 (1997).
183. Leydet, A.; Jeantet-Segonds, C.; Bouchitte, C.; Moullet, C.; Boyer, B.; Roque, J. P.; Witvrouw, M.; Este, J.; Snoeck, R.; Andrei, G. & Clercq, E. de: Polyanion inhibitors of human immunodeficiency virus and other viruses. 6. Micelle-like anti-HIV polyanionic compounds based on a carbohydrate core, *J Med Chem* **40**, 350–356 (1997).
184. Leydet, A.; El Hachemi, H.; Boyer, B.; Lamaty, G.; Roque, J. P.; Schols, D.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Ikeda, S.; Neyts, J.; Reymen, D.; Este, J.; Witvrouw, M. & Clercq, E. de: Polyanion inhibitors of human immunodeficiency virus and other viruses. Part 2. Polymerized anionic surfactants derived from amino acids and dipeptides, *J Med Chem* **39**, 1626–1634 (1996).
185. Leydet, A.; Barthelemy, P.; Boyer, B.; Lamaty, G.; Roque, J. P.; Bousseau, A.; Evers, M.; Henin, Y.; Snoeck, R. & Andrei, G.: Polyanion inhibitors of human immunodeficiency virus and other viruses. 1. Polymerized anionic surfactants, *J Med Chem* **38**, 2433–2440 (1995).
186. Easterhoff, D.; DiMaio, John T M; Doran, T. M.; Dewhurst, S. & Nilsson, B. L.: Enhancement of HIV-1 infectivity by simple, self-assembling modular peptides, *Biophys J* **100**, 1325–1334 (2011).
187. Meier, C.; Weil, T.; Kirchhoff, F. & Münch, J.: Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* (2014).

9.7 Angaben zu Person und Werdegang

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Mössl, Marek
Akademischer Grad:	Dipl.-Ing. (FH)
Geburtstag:	31.01.1982
Geburtsort:	Heidelberg
Geschlecht:	männlich
Wohnsitz:	Schellingstr. 73c, 91052 Erlangen
Korrespondenzanschrift:	Am Bildstock 10, 69181 Leimen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Werdegang:

Okt. 2008 – Dez.2013	Doktorand im Department Chemie und Pharmazie (AK Prof. Dr. Jutta Eichler) Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg - Mitglied des <i>Emil Fischer Graduate Programme of Pharmaceutical Sciences and Molecular Medicine</i> - Mitglied des Graduiertenkolleg 1071: <i>Viruses of the Immune System</i> - Mitglied der Graduiertenschule: <i>Erlangen School of Molecular Communication (SFB796)</i>
Okt. 2007 – Jan. 2008	Mitarbeiter in der Abteilung Peptide bei ORPEGEN Pharma GmbH, Heidelberg
März 2003 – Okt. 2007	Studium an der Hochschule Mannheim Studiengang: BIOLOGISCHE CHEMIE Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)
Okt. 2002 – Feb. 2003	Hochschule Mannheim Studiengang: VERFAHRENSTECHNIK
2001	Abitur am Helmholtz-Gymnasium Heidelberg

Erlangen, den 14.11.2014

Marek Mössl

9.8 Erklärungen zur verfassten Arbeit

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die ich meine voranstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere außerdem, dass ich die Arbeit nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Erlangen, den 14.11.2014

Marek Mössl