

**Institut für Biologie und Biochemie**

Arbeitsgruppe Molekulare Bioanalytik und Bioelektronik

# **Entwicklung influenzabindender Peptide für die Biosensorik**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Henry Memczak

Potsdam, den 24.06.2014

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung 4.0 International  
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:  
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2014/7247/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-72470>  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-72470>

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>X</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 GRUNDLAGEN .....</b>	<b>3</b>
2.1 PEPTIDE IN DER BIOSENSORIK .....	3
2.1.1 Allgemeine Eigenschaften von Peptiden .....	4
2.1.2 Wechselwirkungen bindender Peptide.....	5
2.1.3 Funktionelle Präsentation peptidischer Binder auf Oberflächen.....	6
2.1.4 Methoden zur Generierung bindender Peptide .....	9
2.1.5 Peptidbasierte Biosensoren .....	12
2.2 DAS INFLUENZAVIRUS ALS DIAGNOSTISCHES ZIELMOLEKÜL .....	14
2.2.1 Relevanz einzelner Strukturelemente des Influenzaviruses für die Diagnostik .....	16
2.2.2 Das Oberflächenprotein Hämagglutinin .....	18
2.2.3 Hämagglutininbindende Moleküle für die Influenzadiagnostik.....	20
2.3 ZIELSETZUNG .....	23
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
3.1 MATERIALIEN.....	25
3.1.1 Proteine und Chemikalien.....	25
3.1.2 Peptide .....	26
3.1.3 Puffer .....	27
3.1.4 Virusmaterial .....	27
3.2 BINDUNGSCHARAKTERISIERUNGEN MITTELS SPR.....	29
3.2.1 Oberflächenmodifikationen und Immobilisierungsstrategien .....	29
3.2.1.1 Kommerzielle SPR-Oberflächen.....	29
3.2.1.2 Neuartige Oberflächenmodifikationen für SPR .....	30
3.2.2 Bindungsexperimente .....	32
3.2.3 Inhibitionsexperimente .....	32
3.3 UNTERSUCHUNG DER PEPTIDISCHEN SEKUNDÄRSTRUKTUR MITTELS ZIRKULAREM DICHROISMUS .....	33
3.4 EINFLUSS VON INHIBITOREN AUF DIE NEURAMINIDASE-AKTIVITÄT.....	33
3.5 OBERFLÄCHENCHARAKTERISIERUNG MITTELS RASTERKRAFTMIKROSKOPIE .....	34
3.6 CHARAKTERISIERUNG DER PEPTIDISCHEN PRIMÄRSEQUENZ MITTELS MICROARRAYS .....	35
3.7 ÜBERTRAGUNG DES PEPTID-VIRUS-BINDUNGSSYSTEMS AUF BIOSENSORISCHE TESTSYSTEME.....	36

3.7.1 Sensorik mittels faseroptischem Sensor .....	36
3.7.2 Virusnachweis mittels PDA-modifizierter Oberflächen .....	38
3.8 KOMPETITIVE INHIBITION IN VITRO .....	39
3.8.1 Hämagglutinationsinhibitions-Tests zur Charakterisierung von Bindungsinhibitoren .....	39
3.8.2 Zellbasierte Infektionsinhibition .....	39
<b>4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>41</b>
4.1 GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUARTIGER INFLUENZABINDENDER PEPTIDE AUS DEM PARATOP DES ANTIKÖRPERS HC19 .....	41
4.1.1 Molekulardynamik-Simulationen zur Charakterisierung der Peptid-HA-Interaktion <i>in silico</i> .....	42
4.1.2 Charakterisierung der Peptid-Virus-Interaktion mittels SPR .....	44
4.1.2.1 Temperaturabhängigkeit .....	48
4.1.2.2 Abhängigkeit vom Salzgehalt .....	49
4.1.2.3 pH-Abhängigkeit .....	50
4.1.3 Spezifität der Peptid-Virus-Interaktion .....	52
4.1.3.1 Kompetitive Inhibition der viralen Bindung .....	52
4.1.3.2 Ligandspezifität .....	55
4.1.3.2 Analytspezifität .....	56
4.1.4 Einfluss der Peptidimmobilisation auf die Detektion von Influenzaviren .....	57
4.1.4.1 Variation der Kopplungsstrategien .....	58
4.1.4.2 Variation der Ligandendichte .....	59
4.1.5 Einfluss des säureinduzierten Konformationswechsels auf die Peptid-Virus-Interaktion .....	61
4.1.6 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von PeB mittels zirkularem Dichroismus .....	62
4.1.7 Charakterisierung gebundener Viren mittels AFM .....	66
4.1.8 Einfluss der Peptide auf die Neuraminidaseaktivität der Influenzaviren .....	69
4.2 VARIATION DER PEPTIDSEQUENZ PEB ZUR BINDUNG AKTUELLER HA-VARIANTEN .....	71
4.2.1 Determinierung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung des Peptids PeB gegenüber Influenzaviren verschiedener Serotypen .....	71
4.2.2 Entwicklung substituierter Peptidvarianten mit verbesserten Bindungseigenschaften .....	74
4.2.3 Influenzabindende Peptide für verschiedene Serotypen .....	76
4.3 ÜBERTRAGUNG DES PEB-VIRUS-BINDUNGSSYSTEMS AUF BIOSENSORISCHE TESTSYSTEME .....	80
4.3.1 Fluoreszenzbasierter faseroptischer Sensor .....	80
4.3.2 PDA-basierter kolorimetrischer Virussensor .....	81
4.4 PEB UND SEINE VARIANTEN ALS POTENTIELLE WIRKSTOFFE - KOMPETITIVE INHIBITION DER INFLUENZABINDUNG UND -INFEKTION <i>IN VITRO</i> .....	86
4.4.1 Hämagglutinationsinhibition .....	86
4.4.2 Infektionsinhibition <i>in vitro</i> .....	88
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6 AUSBLICK .....</b>	<b>93</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>

<b>ANHANG.....</b>	<b>105</b>
I PEPTIDVARIANTEN FÜR DIE SPR-ANALYSE .....	105
II PEPTIDE DER SUBSTITUTIONSANALYSE.....	106
III WEITERE ERGEBNISSE DER SUBSTITUTIONSANALYSE .....	107
IV NEUARTIGE OBERFLÄCHEN FÜR DIE SPR-SPEKTROSKOPIE .....	108
<b>PUBLIKATIONEN UND PATENTE .....</b>	<b>113</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>115</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>117</b>

## Abkürzungen und Symbole

AS	Aminosäure
AFM	Rasterkraftmikroskopie ( <i>atomic force microscopy</i> )
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BHA	Bromelain-gespaltenes HA
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CAL	Influenzastamm A/California/07/2009, H1N1
CD	zirkularer Dichroismus ( <i>circular dichroism</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region ( <i>complementary determining region</i> )
CMDP	2D Carboxymethylierte Dextranoberfläche
ELISA	Immunadsorptionstest
ESI-MS	Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie
Fab	antigenbindendes Fragment ( <i>fragment antigen binding</i> )
Fc	kristallisierbares Fragment ( <i>fragment crystallizable</i> )
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FTP	Femtotip-Puffer
HA	Hämagglutinin
HAI	Hämagglutinationsinhibition
HBSP	Hepes-Puffer ( <i>hepes buffered saline polysorbate</i> )
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie ( <i>high pressure liquid chromatography</i> )
$IC_{50}$	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie ( <i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i> )
k.B.	keine Bindung
kD	Kilodalton
$K_i$ (HAI)	Inhibitorkonstante im HAI-Test
LOD	Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> )
MALDI	Matrix-gestützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
MDCK	Madin-Darby Hundenieren ( <i>Madin Darby canine kidney</i> )

MD	Molekulardynamik
MIP	molekular gepragte Polymere ( <i>molecularly imprinted polymers</i> )
MP	Matrixprotein
MP1	Matrixprotein 1
MP2	Matrixprotein 2
MSW	Influenzastamm A/MuteSwan/ Germany/R901/06; K3141
NA	Neuraminidase
n.b.	nicht bestimmt
NP	Nukleoprotein
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCDA	10,12-Pentacosadiinsaure
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDA	Polydiacetylen
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
<i>p</i> -MP	<i>para</i> -Maleimidophenyl
RBS	Rezeptorbindungsstelle
RFE	relative Fluoreszenzeinheit
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RU	Resonanzeinheit ( <i>resonance unit</i> )
scFv	Einzelkettenantikorper ( <i>single chain fragment variable</i> )
SELEX	systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
SL3	2,3'-Sialyllaktose
SL6	2,6'-Sialyllaktose
SPR	Oberflachenplasmonenresonanzspektroskopie ( <i>surface plasmon resonance spectroscopy</i> )
TCID	Gewebekultur-Infektionsdosis ( <i>tissue culture infectious dose</i> )
VH	Einzeldomanenantikorper ( <i>heavy chain variable domain</i> )
VIC	Influenzastamm A/Victoria/210/2009, H3N2
VIET	Influenzastamm A/Vietnam/1203/2004, H5N1
WSN	Influenzastamm A/WSN/1933, H1N1
X31	Influenzastamm A/Aichi/2/1968, H3N2

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anzahl der Publikationen im Bereich peptidbezogener Biosensoren..	3
Abbildung 2:	Übersicht verwendeter Kopplungsstrategien.....	8
Abbildung 3:	Prinzip des Peptid-Phagen-Displays..	10
Abbildung 4:	IgG-Antikörper und aus ihnen abgeleitete Funktionseinheiten.....	11
Abbildung 5:	Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung des Influenzaviruses. ....	14
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des Antigen drifts und Antigen shifts. ....	15
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Hämagglutinationsinhibitionstests. ....	17
Abbildung 8:	Struktur der Hämagglutinin-Kopfdomäne (HA) mit identifizierten antigenbindenden Regionen und der Rezeptorbindungsstelle. ....	20
Abbildung 9:	Rationales Vorgehen zur Generierung, Charakterisierung und Adaptierung influenzabindender Peptide..	23
Abbildung 10:	Peptidmicroarray zur Determinierung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung ....	35
Abbildung 11:	Detektionsprinzip des faseroptischen Sensors. ....	37
Abbildung 12:	<i>In silico</i> generiertes dreidimensionales Modell der Interaktion zwischen dem Peptid PeB (blau) und HA (rot) des Influenzastammes X31. ....	43
Abbildung 13:	Bindung von X31-Viren an immobilisierte Peptide PeA, PeB und PeC. ....	45
Abbildung 14:	Bindungsfähigkeit von Influenzaviren bei Variation der Temperatur. ....	48
Abbildung 15:	Bindungsfähigkeit von Influenzaviren bei Variation der Salzkonzentration. ....	49
Abbildung 16:	Bindungsfähigkeit von Influenzaviren bei Variation des pH-Wertes. ....	50
Abbildung 17:	Kompetitive Inhibition der Bindung von X31-Viren. ....	53
Abbildung 18:	Ligandspezifität. ....	55
Abbildung 19:	Analytspezifität. ....	56
Abbildung 20:	Einfluss der Ligandendichte von Fetuin und PeB auf die Detektion von X31- Viren. ....	60
Abbildung 21:	Einfluss des pH-induzierten Konformationswechsels im HA auf die Bindung an PeB. ....	62
Abbildung 22:	CD-Spektren des Peptids PeB. ....	64
Abbildung 23:	CD-Schmelzkurven des Peptids PeB. ....	65
Abbildung 24:	AFM-Aufnahmen: Falschfarbendarstellung der Oberflächentopographie. ...	67
Abbildung 25:	Messung der Neuraminidase-Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors DANA (A) und PeB (B). ....	69
Abbildung 26:	Ergebnisse des Peptidmicroarrays zur Substitutionsanalyse bei Inkubation von Virusmaterial der Stämme X31 (Abbildung links, A/Aichi/2/1968) und NY (Abbildung rechts, A/NewYork/55/2004). ....	71
Abbildung 27:	Bindungsstudien verschiedener Peptidvarianten mittels SPR.....	76



Abbildung 28: Sequenzalignment der verwendeten HA-Stämme.....	78
Abbildung 29: Sensorgramme der Bindung von X31-Viren an eine unmodifizierte (links) und peptidmodifizierte Glasfaser (rechts). .....	80
Abbildung 30: Fluoreszenzverhalten von PDA-Filmen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Salzkonzentration (NaCl). .....	82
Abbildung 31: Schaltverhalten von peptidmodifizierten PDA-Filmen bei Zugabe von X31-Viren.....	83
Abbildung 32: Spezifität des Virus-induzierten Schaltverhaltens eines PDA-Films. ....	84
Abbildung 33: Hämagglutinationsinhibition von X31-Viren mittels PeB, PeB <sup>GF</sup> und PeB <sup>P</sup> . 86	
Abbildung 34: Zelltest zur <i>in vitro</i> Infektionsinhibition. ....	89
Abbildung 35: Ergebnisse des Peptidmicroarrays zur Substitutionsanalyse bei Inkubation von Virusmaterial der Stämme H1N1 (Abbildung links, A/California/07/2009) und VIC (Abbildung rechts, A/Victoria/210/2009). 107	
Abbildung 36: Neuartige Oberflächenmodifikationen für SPR.. ....	109
Abbildung 37: Charakterisierung der Oberflächenmodifikationen anhand des Modellsystems MP1/Anti-FITC. ....	110
Abbildung 38: Bindung von X31 Viren an immobilisiertes Peptid PeB auf <i>para</i> -Maleimidophenyl-funktionalisierten SPR-Oberflächen.....	112

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auswahl bekannter HA-bindender Moleküle. ....	21
Tabelle 2:	Übersicht verwendeter Chemikalien und Proteine.....	25
Tabelle 3:	Übersicht verwendeter Peptide. ....	26
Tabelle 4:	Übersicht der verwendeten wässrigen Puffer.....	27
Tabelle 5:	Eigenschaften CDR-abgeleiteter Peptide.....	42
Tabelle 6:	Aufschlüsselung der Anteile der Freien Energie ( $G$ ) je Aminosäure im Peptid PeB. ....	43
Tabelle 7:	Auflistung der freien Bindungsenergien für den PeB-HA-Komplex nach einzelnen Aminosäuren im HA.....	44
Tabelle 8:	Kompetitive Inhibition der Bindung von X31-Viren an immobilisierte Peptidliganden.....	54
Tabelle 9:	Physikalische Eigenschaften der zum Spezifitätstest verwendeten Proteine.....	57
Tabelle 10:	Einfluss der Peptidimmobilisierung auf die Influenzadetektion.....	58
Tabelle 11:	Klassifizierung mittels AFM detektierter Partikel auf einer PeB-modifizierten Chipoberfläche. ....	68
Tabelle 12:	Vergleich der Ergebnisse der Substitutionsanalyse mit den theoretischen Vorhersagen der Molekulardynamik-Simulation der Peptid-Virus-Interaktion für X31.....	72
Tabelle 13:	Nachweisgrenzen verschiedener HA-Serotypen.....	77
Tabelle 14:	Quantitative Auswertung der HAI-Experimente mit verschiedenen Bindungsinhibitoren.....	87
Tabelle 15:	Peptide für die Entwicklung substituierter Peptidvarianten (4.2.2).....	105
Tabelle 16:	Peptide der Substitutionsanalyse.....	106
Tabelle 17:	Eigenschaften der verwendeten neuartigen Oberflächenmodifikationen für SPR. ....	110





# 1 Einleitung

Das Influenzavirus verursacht Grippe. Grippe ist eine infektiöse Krankheit, die jährlich Epidemien und in größeren regelmäßigen Abständen Pandemien verursacht. Die Grippe führt bei infizierten Menschen zu klinischen Symptomen wie Fieber, Husten, Entzündungen der oberen Atemwege und Muskelschmerzen. Eine Influenzainfektion kann potentiell tödlich verlaufen, beispielsweise durch Hervorrufen einer sich anschließenden Lungenentzündung. Risikogruppen für derartige Komplikationen sind vor allem Kinder, alte Menschen und Menschen mit geschwächtem Immunsystem<sup>1</sup>.

Sowohl die Spanische Grippe von 1918 als auch die Asiatische Grippe von 1957 und die Hongkong-Grippe aus dem Jahre 1968 verbreiteten sich zu Pandemien und bewirkten den Tod von mehreren Millionen Menschen weltweit<sup>2</sup>. Die Schweinegrippe 2009 (H1N1) und der Ausbruch von H7N9 in China Anfang 2013 hat die Welt an die ständige Bedrohung durch Influenzaviren erinnert<sup>3-6</sup>. Trotz dieser enormen Bedrohung durch die vom Influenzavirus ausgelöste Grippe, sind die Diagnose- und Behandlungsmöglichkeiten rückständig. Es stehen mit den Neuraminidasehemmern Oseltamivir (Tamiflu<sup>®</sup>, Roche) und Zanamivir (Relenza<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline) praktisch nur zwei spezifische Wirkstoffe zur Verfügung. Die tatsächliche Wirksamkeit dieser Medikamente ist immer noch umstritten. Ihre Verabreichung verringert die Erkrankungsdauer nach gesicherten Erkenntnissen nur um etwas weniger als einen Tag, führt aber wahrscheinlich auch zu einer geringeren Mortalität und einer geringeren Anzahl an Hospitalisierungen<sup>7</sup>.

Entscheidend für einen Behandlungserfolg mit den aktuell verfügbaren Medikamenten ist eine rechtzeitige Diagnose, da eine Verabreichung von Oseltamivir als auch Zanamivir nur innerhalb der ersten 48 Stunden nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome überhaupt sinnvoll erscheint. In diesem Zeitraum besteht jedoch bei symptomatischer Diagnose eine hohe Verwechslungsgefahr mit anderen Atemwegserkrankungen. Die typische Labordiagnostik mittels Zellkultur, Antikörpernachweis oder Elektronenmikroskopie dauert mehrere Tage, ist damit für eine medikamentöse Behandlung zu langsam und dient vor allem zur allgemeinen Überwachung der Influenza-Aktivität innerhalb von Gesellschaften. Der spezifische und sensitive Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dauert in der Praxis noch etwa einen Tag und ist damit ebenfalls nicht für eine zügige und flächendeckende Diagnostik geeignet. Daher wurden bereits Antikörper-basierte

Schnelltests entwickelt, die mit guter Sicherheit in nur 15 Minuten ein, mit bloßem Auge auch für den Laien identifizierbares, Ergebnis liefern. Die Kosten der Schnelltests (ca. 20 €) liegen aber immer noch zu hoch, um eine kontinuierliche Überwachung zu erlauben und werden in Deutschland bei ärztlicher Indikation nur für Risikopatienten von den Krankenkassen bezahlt. Die Spezifität dieser Tests ist zwar hoch ( $\geq 96\%$ ), sofern sie innerhalb von 48 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome durchgeführt werden. Die Sensitivität liegt jedoch nur bei durchschnittlich 62%, sodass negative Testresultate mittels aufwendigerer Methoden überprüft werden sollten<sup>8</sup>. Aufgrund dieser Situation wurden in der letzten Saison mit deutlich erhöhter Influenzaaktivität in Deutschland (im Winter 2008/2009) nur bei 1% aller Infizierten der Virus tatsächlich nachgewiesen (47008 labordiagnostische Nachweise bei geschätzten 4.3 Mio. Infizierten<sup>9</sup>). Eine flächendeckende spezifische, und nicht nur symptomatische Therapie der Grippe, ist somit derzeit unmöglich. Daraus ergibt sich ein dringender Bedarf an schnellen und exakten Nachweismethoden<sup>10</sup>.

Ein Weg zur weiteren Verbesserung von Diagnostika im Allgemeinen ist die Verwendung von kleinen Eiweißmolekülen, sogenannten Peptiden, anstelle von Antikörpern. Peptide sind kostengünstiger als Antikörper und erlauben aufgrund ihrer geringen Größe auch die Etablierung völlig neuartiger Sensorsysteme. Synthetisch hergestellte Peptide eröffnen die Möglichkeit zur Generierung verschiedenster Peptidvarianten mit definierten Funktionalitäten zur Immobilisierung auf unterschiedlichen Oberflächen. Außerdem weisen sie eine intrinsische chemische und thermische Stabilität auf<sup>11</sup>. Insbesondere können Peptide als Rezeptoren in integrierten Biosensoren verwendet werden. Integrierte Biosensoren vereinigen alle Analyseschritte von der molekularen Erkennung eines Analytmoleküls bis zur Signalgebung in einem Makromolekül und arbeiten vollständig gerätefrei. Durch multivalente Bindung vieler kleiner Peptide an einen größeren Analyten mit multiplen Bindungsstellen können damit voraussichtlich besonders sensitive und spezifische Nachweissysteme generiert werden<sup>12</sup>.

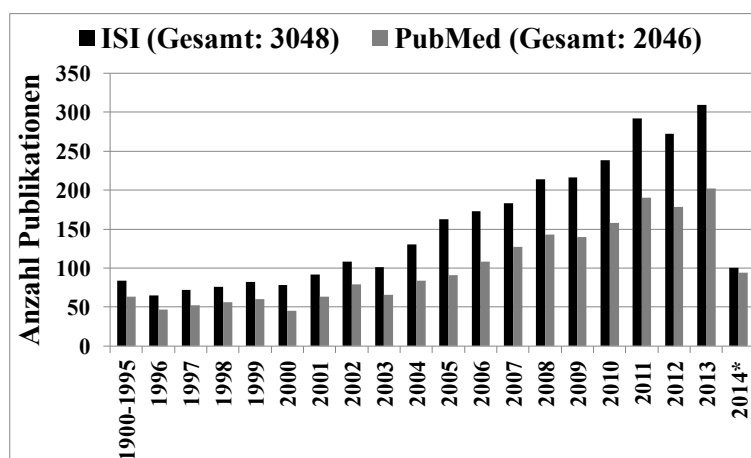
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von neuartigen Peptiden, die spezifisch an das intakte Influenzavirus binden, um dieses für den Einsatz in Biosensoren verfügbar zu machen. Dazu sollen ihre Bindungseigenschaften systematisch charakterisiert und mittels Variation der Aminosäuresequenz optimiert werden. Insbesondere sollen universell bindende Peptide generiert werden, die eine subtypenübergreifende Detektion von Influenzaviren ermöglichen und auch für die Erkennung von neu auftretenden Virusmutationen geeignet sind.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Peptide in der Biosensorik

Ein Biosensor ist ein Gerät, das eine biochemische Information in ein analytisches Signal umwandelt. Der IUPAC-Definition für Biosensoren folgend, kombiniert dieses Gerät die Erkennung eines Analyten durch eine biochemische Reaktion mit der Umwandlung dieser Reaktion in ein physikochemisches Signal (z.B. elektrisch, optisch, thermodynamisch)<sup>13</sup>. Der namensgebende Hauptbestandteil eines Biosensors ist die sensitive biologische Rezeptoreinheit. Dies kann unter anderem ein Zellrezeptor, ein Antikörper, ein Enzym, eine Nukleinsäure (DNA-/RNA-Aptamer) oder ein Peptid sein<sup>14</sup>. In den letzten Jahren sind auch artifizielle biomimetische Materialien, insbesondere MIPs (*molecularly imprinted polymers*), in den Fokus der Forschung an Rezeptoreinheiten gerückt<sup>15-18</sup>.

Die Wahl der Rezeptoreinheit hängt von verschiedenen Faktoren wie zum Beispiel der Art der nachgeschalteten Signalgebung, der zugrundeliegenden Oberfläche und der Verwendung des Biosensors ab. Essentiell für alle Rezeptoren ist die Spezifität gegenüber der Zielstruktur, da diese fast ausschließlich vom Rezeptormolekül selbst abhängt. Eine hohe Sensitivität bzw. Affinität des Rezeptors ist ebenso von Bedeutung, wobei diese noch durch nachfolgende Verstärkungsmechanismen (z.B. enzymatisch) weiter erhöht werden kann. Peptide bilden zunehmend einen Schwerpunkt in der Forschung und Entwicklung von Biosensoren (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Anzahl der Publikationen im Bereich peptidbezogener Biosensoren.** Die Daten wurden aus einer Stichwortsuche nach Inhalten („peptid\* biosens\*“) mit Hilfe der Datenbanken ISI Web of Knowledge ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)) und PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) erhalten (Abfrage am 13.06.2014). \*Die Daten von 2014 umfassen nur Publikationen bis zum Abrufdatum.

### 2.1.1 Allgemeine Eigenschaften von Peptiden

Peptide sind organische Verbindungen, welche aus der linearen Verknüpfung von Aminosäuren (AS) mittels Amidbindungen gebildet werden. Die Anzahl der Aminosäuren grenzt dabei Peptide und Proteine voneinander ab, wobei bis zu einem Molekulargewicht von ca. 10000 Da von Peptiden gesprochen wird<sup>13</sup>.

Peptide kommen natürlich vor, können aber auch mittels chemischer Vollsynthese aus ihren einzelnen Aminosäuren aufgebaut werden<sup>19</sup>. Es sind 23 proteinogene Aminosäuren bekannt, welche nach ihren Funktionalitäten in unterschiedliche Kategorien eingruppiert werden (unpolar-aliphatisch, aromatisch, polar-ungeladen, schwefelhaltig, positiv/negativ geladen)<sup>20</sup>. Die Aminosäurezusammensetzung bestimmt direkt die physikochemischen Eigenschaften des Peptids (z.B. isoelektrischer Punkt (pI), Hydrophobizität). Bereits kurze Peptide ab einer Länge von sieben Aminosäuren können definierte Sekundärstrukturen ausbilden<sup>21</sup>. Diese fixieren sowohl das Peptidrückgrat als auch die Seitenketten der Aminosäurereste und sind für die Funktionalität sowohl für kleine Peptide als auch Proteine von großer Bedeutung. Die nichtkovalenten Wechselwirkungen, die Peptide zu anderen Molekülen eingehen, basieren dabei auf der Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen über die Amidbindungen im Peptidrückgrat auszubilden sowie verschiedenste Wechselwirkungen (van-der-Waals, ionisch etc.) über ihre Seitenketten einzugehen<sup>22</sup>. Alle Aminosäuren außer Glycin sind chiral, die natürlich vorkommenden Peptide und Proteine bestehen ausschließlich aus L-Aminosäuren<sup>20</sup>.

Peptide spielen als Hormone, Transmitter, Toxine und auch Antibiotika eine wichtige Rolle in der Natur. Des Weiteren sind kurze Peptide mit einer Länge von acht bis siebzehn Aminosäuren ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Die Haupthistokompatibilitätskomplexe (*major histocompatibility complexes*, MHCs) der Klasse I und II präsentieren diese kurzen Peptide, welche ein Abbild aller exprimierten Proteine der jeweiligen Zelle darstellen. Die Peptide werden von T-Zellen des Immunsystems erkannt, wodurch diese wiederum die MHC-tragenden Zellen als gesund oder krank identifizieren<sup>23</sup>. Damit sind diese kurzen Peptide in der Lage eine spezifische Immunantwort auszulösen.

Peptide werden aber auch zunehmend künstlich erzeugt, um als Wirkstoffe<sup>24-26</sup>, Inhibitoren<sup>27,28</sup>, Reagenzien in Aufreinigungssystemen<sup>29,30</sup> oder auch Rezeptoren in Biosensoren<sup>31-33</sup> biotechnologisch verwendet zu werden.



### 2.1.2 Wechselwirkungen bindender Peptide

Bindende Peptide interagieren mit ihren Zielstrukturen über nichtkovalente Wechselwirkungen. Dazu zählen insbesondere van-der-Waals-Wechselwirkungen (1-2 kcal/mol), hydrophobe Effekte (<10 kcal/mol), Wasserstoffbrückenbindungen (4-30 kcal/mol) sowie elektrostatische Wechselwirkungen (5-90 kcal/mol)<sup>34,35</sup>. Zur Ausbildung der einzelnen Wechselwirkungsarten sind entsprechende Funktionalitäten im Peptid erforderlich. Das Peptidrückgrat kann über seine Amidbindungen vor allem Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Hydrophobe Aminosäuren insertieren in hydrophobe Taschen im Zielmolekül, während geladene AS ionische Wechselwirkungen eingehen. Die Bindungsregionen im Zielmolekül werden, abgeleitet von Antikörper-Antigen-Interaktionen, als Epitope bezeichnet. Es werden zwei Formen von Epitopen unterschieden. Es existieren zum einen lineare Sequenzepitope (kontinuierlich) und zum anderen Konformationsepitope (diskontinuierlich). Letztere werden aus mehreren Regionen im Zielmolekül über deren dreidimensionale Anordnung im Raum gebildet<sup>36</sup>. Eine Vielzahl momentaner Charakterisierungsmethoden zielt ausschließlich auf lineare Epitope ab, obwohl diskontinuierliche Epitope wahrscheinlich viel häufiger in der Natur vorkommen<sup>37</sup>. Stehen in einem Zielmolekül mehrere Bindestellen zur Verfügung, können diese mittels multivalenter Rezeptoranordnungen (z.B. immobilisierte Peptide auf einer Oberfläche) adressiert werden. Dadurch wird eine stärkere Bindung generiert.

Multivalenz beschreibt die parallele Bindung mehrerer gleichartiger Interaktionsstellen zwischen zwei Bindungspartnern<sup>12,38</sup>. Allgemeine Beispiele dafür sind die Bindung von Antikörpern an mindestens dimere Proteine, mit je zwei gleichartigen Paratopregionen bzw. Epitopen (Bivalenz), die Interaktion des Tetrameren Avidins mit mehrfach biotinylierten Proteinen (Tetravalenz) oder Zell-Zell-Kontakte (Polyvalenz). Die Bindungsstärke bei multivalenten Bindungsereignissen wird im Gegensatz zur Monovalenz (Affinität) als Avidität bezeichnet<sup>12</sup>. Dies verdeutlicht den Unterschied in der Natur der Bindung zwischen Mono- und Multivalenz. Bereits eine bivalente Bindung kann gegenüber der monovalenten Bindung eine um 2-3 Größenordnungen höhere Avidität besitzen<sup>12</sup>. Grund dafür ist die Kooperativität, welche die entropische Begünstigung einer zweiten Bindung durch Vororientierung der Bindungspartner aufgrund des ersten Bindungsereignisses beschreibt. Dennoch sind nicht alle multivalenten Bindungen kooperativ, sondern können auch additiven oder synergistischen Charakter aufweisen<sup>38</sup>. Generell ist das multivalente Bindungsmotiv

## 2 Grundlagen

weitverbreitet in biologischen Systemen, unter anderem bei bivalenten (IgG) bzw. dekavalenten Antikörpern (IgM).

In Biosensoren spielen multivalente Bindungseffekte immer dann eine Rolle, wenn ein Analyt mehr als eine potentielle Bindestelle besitzt, was insbesondere bei der Detektion von Zellbestandteilen, ganzen Zellen oder einigen Viren der Fall ist. Hierbei ist eine gerichtete Immobilisierung der Rezeptoren auf der Oberfläche sowie deren geometrische Anordnung mitentscheidend für eine passgenaue Bindung des Analyten und damit erreichbarer hoher Avidität. Dabei wird zwischen molekularer Multivalenz des jeweils einzelnen Rezeptors und Oberflächenmultivalenz der gesamten Sensoroberfläche unterschieden<sup>39</sup>. Durch gezielte Variation der Anzahl der Bindestellen konnten bereits Rezeptoren mit hoher Sensitivität und Spezifität, z.B. gegen Concanavalin A, erzeugt werden<sup>40</sup>. Neben der Anzahl der Rezeptorbindestellen spielen auch die Bewegungsfreiheitsgrade der Rezeptoren eine wesentliche Rolle<sup>41</sup>. Daher muss je nach Bindungssystem ein Optimum der dreidimensionalen Rezeptoranordnung (z.B. Ligandendichte, Spacerlänge) empirisch gefunden werden. Informatische voraussagende Methoden können dabei behilflich sein, ebenso wie tiefgehende Kenntnisse über die Natur der Bindung, z.B. aus kristallographischen Untersuchungen.

Der Zusammenhang zwischen definierter Immobilisierung und Funktionalität ist somit evident. Dies gilt insbesondere für Peptide in heterogenen Biosensoren<sup>11</sup>.

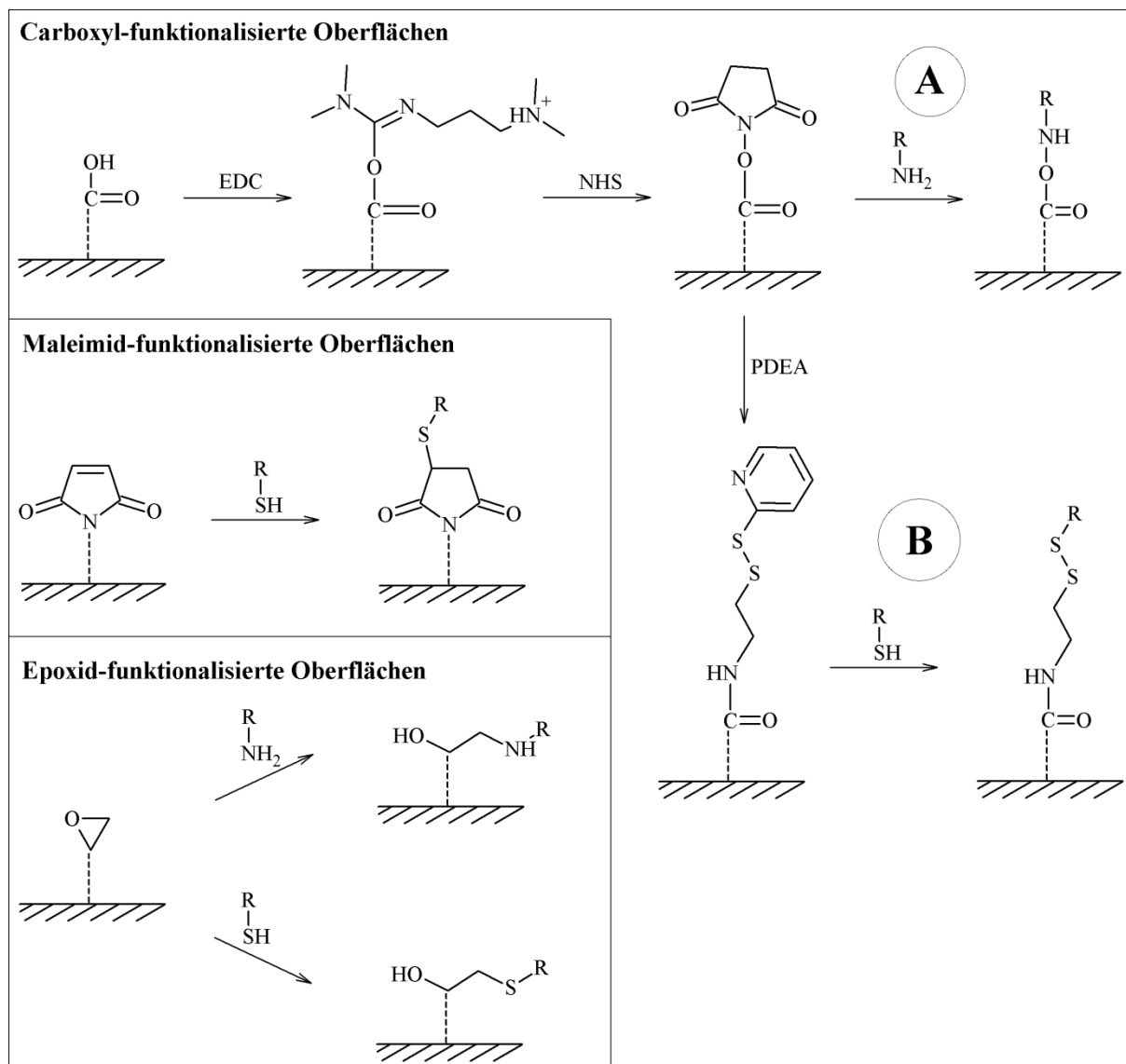
### **2.1.3 Funktionelle Präsentation peptidischer Binder auf Oberflächen**

Viele Biosensoren basieren auf der Analytdetektion mittels immobilisierter Rezeptoren auf einem festen Trägermaterial, sogenannten heterogenen Analyseverfahren. Im Gegensatz zu homogenen Analyseverfahren in Lösung, ermöglichen sie Waschschrte, um in definierter Art und Weise mehrere Reagenzien nacheinander mit dem Rezeptor in Kontakt zu bringen.

Grundsätzlich stehen für die funktionelle Immobilisierung von Liganden im Allgemeinen und Peptiden im Besonderen, auf unterschiedlichen Trägermaterialien verschiedene chemische, physikalische und bioaffine Kopplungsstrategien zur Verfügung<sup>42</sup>. Adsorptive Verfahren basierend auf van-der-Waals oder hydrophoben Wechselwirkungen sind meist unter physiologischen Bedingungen einfach durchführbar. Ein Nachteil liegt in der geringen Bindungsstärke zwischen Träger und Ligand und damit verbundener Desorption bei Änderung der Konzentration (z.B. Waschen) oder Temperatur. Außerdem führen adsorptive Verfahren im Allgemeinen zu einer ungerichteten Immobilisierung auf der Trägeroberfläche. Damit einhergehend ergibt sich ein verminderter Anteil funktionaler Rezeptoren durch

Kontakt der Analyt-bindenden Ligandregion mit der Oberfläche. Diese Dysfunktionalisierung ist für vergleichsweise kleine Peptide mit einem Molekulargewicht von 1-5 kDa besonders hoch. Deshalb sind adsorptive Immobilisierungsstrategien für Peptide meist ungeeignet<sup>43</sup>. Für eine hohe spezifische Aktivität der Liganden ist deren gerichtete Orientierung sowie die freie Zugänglichkeit der Bindungsregionen entscheidend. Zur bioaffinen Kopplung von Liganden wird meist das Biotin-Avidin Bindungssystem genutzt. Dazu wird der biotinylierte Ligand mit einer Avidin-modifizierten Oberfläche in Kontakt gebracht. Diese Kopplung läuft ebenfalls unter physiologischen Bedingungen ab. Sie führt außerdem zu einer sehr festen Bindung ( $K_D = 10^{-15}$  M), die auch unter harschen Umgebungsbedingungen stabil bleibt<sup>44</sup>.

Ausgehend von verschiedenen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche (z.B. Carboxy-, Epoxy-, Aldehyd-, Maleimid-Gruppen) wurden verschiedenste Methoden zur gerichteten Kopplung biologischer Ligandmoleküle, insbesondere mittels nukleophiler funktionaler Gruppen (z.B. Amino-, Thiolgruppen) entwickelt. Populäre chemische Methoden zur Kopplung von Liganden an Oberflächen beinhalten unter anderem Carbodiimid-vermittelte Aminkopplungen, Thiolkopplung und Additionsreaktionen (z.B. Michael-Addition, 1,3-dipolare Cycloadditionen sogenannte „Click-Reaktionen“)<sup>45</sup>. Zur Durchführung derartiger Kopplungen mit synthetischen Peptiden werden üblicherweise artifizielle funktionelle Gruppen eingeführt (z.B. Hydrazine, Azide) oder alternativ entsprechende Aminosäuren (z.B. Lysin, Cystein) an die Peptidsequenz angefügt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten chemoselektiven Kopplungsmethoden werden in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Übersicht verwendeter Kopplungsstrategien.** Carboxyl-funktionalisierten Oberflächen wurden zunächst mittels Carbodiimid-Chemie (EDC/NHS) aktiviert. Anschließend wurde direkt ein aminhaltiger Ligand (Route A) immobilisiert oder zunächst weiter mit PDEA derivatisiert (Route B), um über eine Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion einen thiolhaltigen Liganden zu koppeln. Maleimidooberflächen reagieren mittels Michael-Addition direkt mit Thiolen, unter Ausbildung eines Thioethers. Epoxid-funktionalisierte Oberflächen eignen sich sowohl zur Kopplung von Aminen (primär/sekundär) als auch thiolhaltigen Verbindungen.

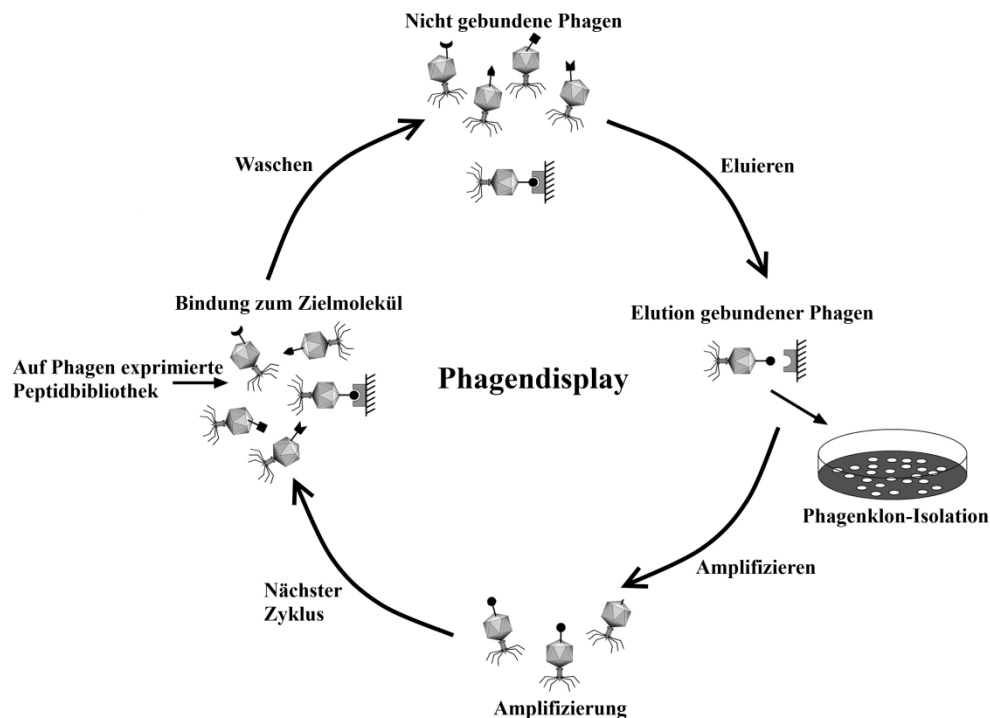
Zusätzlich werden bei der Immobilisierung von Peptiden häufig Spacer verwendet, die den Abstand zwischen bindender Peptidsequenz und Oberfläche weiter vergrößern, um sterische Interferenzen zwischen Ligand und Analyt zu verhindern. Für antimikrobielle Peptide konnte gezeigt werden, dass die Peptidaktivität direkt von der Länge des (Polyethylenglykol-)Spacers und damit einhergehend von der Anzahl zugänglicher Peptide abhängt<sup>46</sup>. Ein Spacer sollte

grundsätzlich die Biokompatibilität des Peptids nicht verringern und idealerweise Kopplungsgruppen zur gerichteten Immobilisierung enthalten. Neben den genannten PEG-Spacern werden für Peptide häufig hydrophile Glycin- und Serin-reiche Spacer verwendet, die einfach N- oder C-terminal an die bindende Peptidsequenz synthetisiert werden<sup>47,48</sup>. Weiterhin finden Oligo-Lysin-Spacer Anwendung, die aufgrund ihrer Ladung einerseits die Wasserlöslichkeit des Peptids verbessern und andererseits über primäre Aminogruppen zur gerichteten chemoselektiven Immobilisierung verfügen<sup>49,50</sup>.

### 2.1.4 Methoden zur Generierung bindender Peptide

Es existieren verschiedene molekularbiologische, biochemische und bioinformatische Methoden, um bindende Peptide gegen ein bestimmtes Zielmolekül zu generieren. Dazu zählen das bioinformatische Design *in silico*, die Verwendung von Interaktionsmotiven einzelner oder mehrerer Aminosäuren, Peptidbibliotheken, das Phagen-Display, die Reduzierung bindender Proteine auf ihre funktionalen Bereiche oder natürlich vorkommende Peptide (z.B. antimikrobielle/zellpenetrierende Peptide)<sup>11</sup>.

Eine häufig verwendete molekularbiologische Methode ist das Phagen-Display, welches bereits in den 1980er Jahren für die Generierung bindender Peptide entwickelt wurde<sup>51</sup>. Beim Peptid-Phagen-Display wird von einer Bakteriophagenbibliothek ausgegangen, wobei jede Phage durch genetische Modifikation eine andere Peptidvariante auf ihrer Oberfläche exprimiert (Abbildung 3).

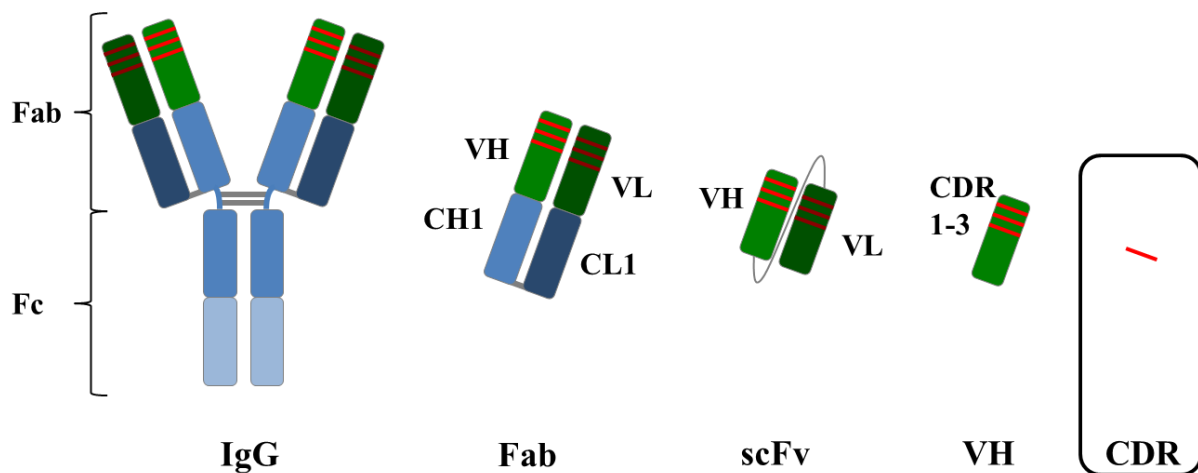


**Abbildung 3: Prinzip des Peptid-Phagen-Displays<sup>52</sup>.** Die Methode umfasst die Wiederholung mehrerer Zyklen, bestehend aus Bindung der Phagen, Waschen, Elution und Amplifizierung.

Diese Bibliothek wird unter geeigneten Bedingungen mit der Zielstruktur zusammengebracht, so dass Phagen, die ein bindendes Peptid exprimieren, an ihr haften bleiben. Nichtgebundene Phagen werden anschließend abgewaschen und verworfen. Gebundene Phagen werden eluiert (z.B. kompetitiv oder mittels Elutionsreagenzien) und anschließend in Bakterienzellen amplifiziert. Die so erhaltenen Phagen werden in einem erneuten Zyklus wiederum mit der Zielstruktur zusammengebracht, gebundene Phagen eluiert und erneut amplifiziert. Durch das evolutive Auswahlverfahren werden die stärksten Binder in der Phagenbibliothek angereichert. Nach mindestens 2-3 Zyklen werden nach der Elution einzelne Phagenklone isoliert und anschließend ihre DNA sequenziert. Daraus kann dann die exprimierte Peptidsequenz ermittelt werden (Genotyp-Phänotyp-Kopplung), welche die Zielstruktur bindet. Die Effizienz des Phagen-Displays hängt unter anderem von der Variabilität der zugrundeliegenden Bibliothek (typischerweise  $10^9$ - $10^{11}$  unterschiedliche Klone) und der Selektionsstrategie ab.

Eine weitere Methode zur Generierung bindender Peptide besteht darin, Rezeptorproteine zu fragmentieren oder auf ihre bindende Peptidsequenz zu reduzieren. Im Besonderen werden

Peptide aus den definierten Paratopregionen von spezifischen monoklonalen Antikörpern abgeleitet (Abbildung 4).



**Abbildung 4: IgG-Antikörper und aus ihnen abgeleitete Funktionseinheiten.** IgG – Immunoglobulin G; Fab – antigenbindendes Fragment (*fragment antigen binding*); scFv – Einzelkettenantikörper (*single chain variable fragment*); VH – Einzeldomänenantikörper (*heavy chain variable domain*); CDR – Komplementaritätsbestimmende Region (*complementarity determining region*).

Antikörper mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 150 kDa (IgG) bestehen aus dem wirtsspezifischen Fc-Teil (*fragment, crystallizable*) und dem variablen Fab-Teil (*fragment antigen binding*), welches die antigenbindenden Regionen enthält. Es konnte vielfach gezeigt werden, dass auch bei Beschränkung auf die wesentlichen Funktionseinheiten ähnliche Bindungseigenschaften dieser kleineren Einheiten erzielt werden können wie mit dem vollständigen Antikörper<sup>53–55</sup>. So finden nur die Fab-Fragmente allein, daraus abgeleitete Einzelkettenantikörper (scFv) und auch Einzeldomänenantikörper (sog. „Nanobodies“) verschiedene Anwendungen, in denen sie den vollständigen Antikörper ersetzen.

Die für die Bindung der Zielstruktur verantwortlichen Bereiche sind aber tatsächlich kurze Peptidsequenzen (je drei pro leichter und schwerer Kette), die sogenannten *complementarity determining regions* (CDRs) oder auch Paratope. Diese enthalten die für den Kontakt zur Zielstruktur entscheidenden Aminosäuren und werden durch die nichtbindenden umgebenden Regionen in ihrer räumlichen Anordnung fixiert.

Es sind bereits einige Beispiele bekannt, bei denen erfolgreich bindende Peptide aus diesen Paratopregionen abgeleitet wurden<sup>56–58</sup>. Typischerweise liegt die Affinität dieser kurzen Peptide (3-15 AS) um einige Größenordnungen unterhalb derer des Gesamtantikörpers. Dies ist einerseits darin begründet, dass sich die Sekundärstruktur der Peptide in Lösung von der

## 2 Grundlagen

im Antikörper unterscheidet. Andererseits werden im Antikörper insgesamt 12 Paratope präsentiert, die dem Antikörper ermöglichen über mehrere Bindestellen multivalent mit der Zielstruktur zu interagieren (siehe 2.1.2 „Multivalenz“). Dieser Effekt kann künstlich nachgeahmt werden, indem bindende Peptide durch geeignete Präsentation an einer Gerüststruktur bzw. auf einer Oberfläche angeordnet werden<sup>12,38</sup>.

Eine naive Herangehensweise ist die Verwendung von zufälligen Peptidbibliotheken, die auf Zellulose- oder Glas direkt synthetisiert werden<sup>59</sup> und ähnlich wie beim Phagen-Display zu physiologisch nicht relevanten bindenden Peptiden führen. Peptidbibliotheken können aber auch genutzt werden, um mittels Epitop-/Paratopmapping bekannte Binder auf ihre funktionalen peptidischen Einheiten zu reduzieren. Eine weitere Anwendung der Bibliotheken besteht in der Verbesserung von bindenden Peptiden durch ein Alanin-Screening (bei dem jede Aminosäure gegen ein Alanin ausgetauscht wird) oder eine vollständige Substitutionsanalyse (bei der jede Aminosäure gegen jede andere der 20 kanonischen Aminosäuren ausgetauscht wird)<sup>60</sup>. Auf diese Art wird gezielt die Primärstruktur verändert, um gewünschte Bindungseigenschaften zu generieren.

Im Allgemeinen führen die dargestellten Ansätze aufgrund ihres qualitativen oder semi-quantitativen Charakters nur zu einer Vorauswahl bindender Peptide. Diese müssen anschließend weiter verbessert und mittels zusätzlicher Methoden in ihren Bindungseigenschaften charakterisiert und gegebenenfalls weiterentwickelt werden.

### 2.1.5 Peptidbasierte Biosensoren

Kleine Peptide (<30 AS) als Rezeptoren in Biosensoren bieten viele praktische Vorteile und eröffnen neue Möglichkeiten der Sensorentwicklung. Sie können einfach und vollautomatisiert mittels Festphasensynthese vollsynthetisch hergestellt werden. Dies ist kostengünstig und wird industriell bis in den Kilogramm-Maßstab betrieben<sup>61</sup>. Durch die Kombination der verschiedenen natürlich vorkommenden Aminosäuren sowie der Möglichkeit artifizielle Aminosäuren als auch völlig proteinfremde Bausteine zu verwenden, kann eine diverse Vielfalt an Molekülen und Funktionalitäten generiert werden. Des Weiteren kann durch Substitutionsanalysen gezielt die Primärstruktur der Peptide verändert werden, um neue Funktionalitäten oder bestimmte Spezifitäten zu erzeugen. Wie bereits beschrieben, existieren verschiedene, gut etablierte molekularbiologische und chemische Methoden zum schnellen Screening von Peptidbibliotheken. Nicht zuletzt ist ihre Sekundärstruktur als auch ihr Interaktionsverhalten mit anderen Molekülen vergleichsweise einfach zu modellieren.



Daher wurden Peptide auch bereits für verschiedenste Sensorsysteme eingesetzt, um Ionen, kleine organische Moleküle (z.B. Zellgifte), Proteine, Zellbestandteile oder auch ganze Zellen zu detektieren<sup>11</sup>.

Es existieren auch Beispiele für Peptide, die ganze Zellen in biosensorischen Systemen detektieren können und dazu mit verschiedensten Signalgebungsmethoden verknüpft wurden. So werden antimikrobielle Peptide zum Nachweis von Bakterien mittels Leitfähigkeitsmessungen genutzt<sup>62</sup>. Ebenso wurde der Einsatz von 12-meren Peptiden zum simultanen Nachweis verschiedener Salmonellen durch mechanische Auslenkung mehrerer parallel angeordneter Mikrocantilever beschrieben<sup>63</sup>. Klassisch wurden Salmonellen und *Escherichia Coli* nach Bindung an spezifische Peptide auch mittels vorheriger Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen<sup>64</sup>. Prinzipiell können Peptide analog klassischer Rezeptormoleküle (z.B. Antikörper) also mit verschiedensten Signalgebungsmethoden kombiniert werden. Zusätzlich eröffnen sie aufgrund ihrer geringen Größe die Möglichkeit der Generierung vollständig integrierter Biosensoren, welche die molekulare Erkennung (durch das Peptid) und die Signalgebung innerhalb eines Makromoleküls (sog. Sensor-Aktor-Moleküle) vereinen. Damit ermöglichen sie einen Nachweis ohne Probenaufbereitung oder Hinzufügen weiterer Reagenzien<sup>65</sup>.

Schlüsselherausforderungen für die Verwendung von Peptiden in Biosensoren bleiben weiterhin eine verbesserte Sensitivität (vor allem im Vergleich mit Antikörpern) und erhöhte Spezifität. Beide Aspekte könnten durch die Etablierung einer multivalenten Rezeptorpräsentation adressiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden bindende Peptide gegen strukturell intakte Influenzaviren entwickelt sowie ihre funktionelle Präsentation zur Bindung der Viruspartikel charakterisiert.

## 2.2 Das Influenzavirus als diagnostisches Zielmolekül

Das Influenzavirus ist ein umhüllter, meist kugelförmiger Virus mit einem mittleren Durchmesser von 120 nm<sup>66</sup> und gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. Diese Familie ist durch ein Genom, bestehend aus achtfach segmentierten negativen RNA-Strängen charakterisiert und wird in die Subtypen A, B und C unterteilt.

Das Hauptoberflächenprotein ist Hämagglutinin (HA). Dieses ist entscheidend an der Zellbindung an und der Fusion mit der Wirtszellmembran beteiligt<sup>67,68</sup>. Weitere membranständige Oberflächenproteine sind die Neuraminidase (NA) und das Matrixprotein 2 (M2). Unter der Lipiddoppelschicht formiert das angeschlossene Matrixprotein 1 (M1) durch Multimerisation ein Viruskapsid. Das im Virus enthaltene segmentierte Genom besteht aus Ribonucleoproteinkomplexen, die durch das Nukleoprotein 1 (NP) und die virale RNA gebildet werden (Abbildung 5)<sup>69</sup>.

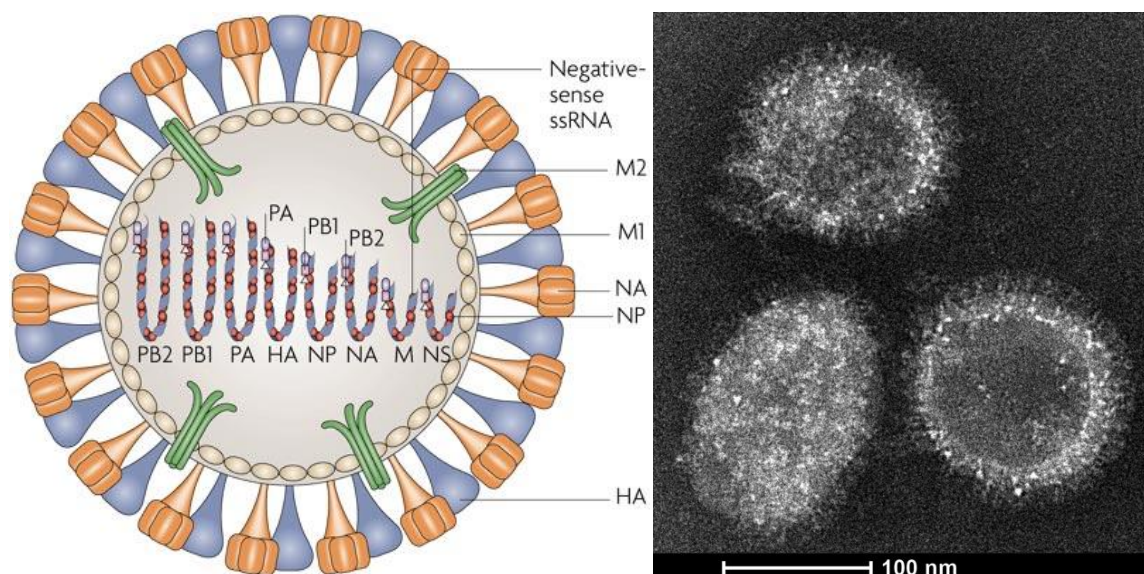
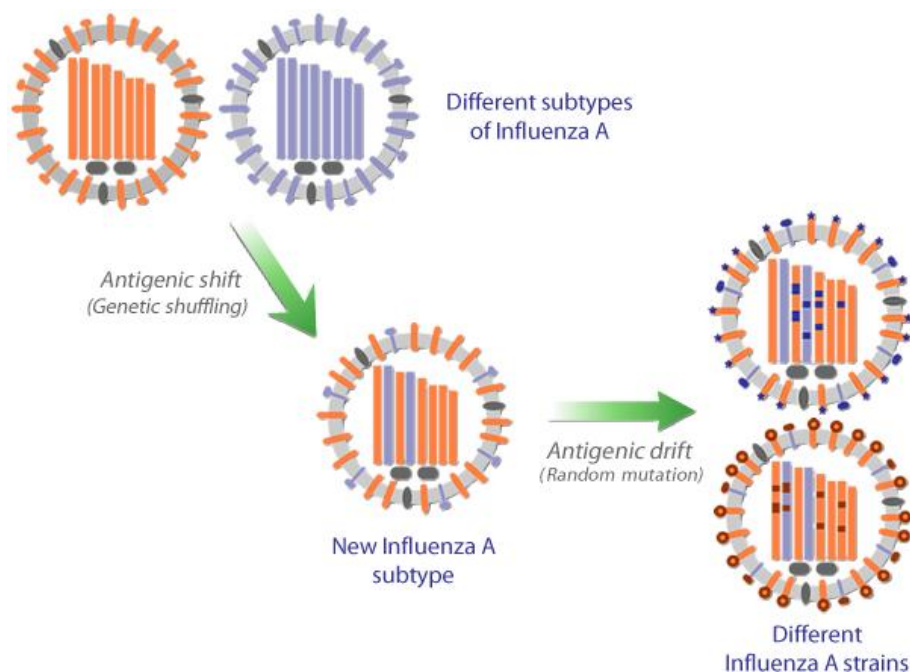


Abbildung 5: Schematische<sup>70</sup> und elektronenmikroskopische Darstellung (Dr. K. Ludwig, FU Berlin) des Influenzavirus.

In der klinischen Diagnostik sind Antikörper die bevorzugten Bindungsmoleküle zur Identifikation und Serotypisierung des Virus. Antikörper sind auch zur Generierung von Influenzatherapeutika im Fokus der Forschung, insbesondere gegen pandemische Influenzastämme<sup>71,72</sup>. Die hohe Mutations- und Rekombinationsrate des Virus führt fortlaufend zu neuen Influenzastämmen. Dadurch entwickelt der Virus Resistenzen gegen

aktuelle Wirkstoffe (z.B. Oseltamivir, Zanamivir, Adamantane) und vermeidet eine Neutralisation durch Antikörper<sup>73</sup>. Diese Vermeidungsstrategie wird Antigendrift genannt und bezeichnet die allmähliche evolutive Anpassung der antigenen Proteine des Virus. Demgegenüber bezeichnet Antigenshift (auch: *reassortment*) die sprunghafte Änderung des Genoms durch Vermischung segmentierter RNA-Stränge zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei gleichzeitiger Infektion eines gemeinsamen Wirts (Abbildung 6)<sup>74</sup>.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Antigendriffs und Antigenshifts.** Beim Antigenshift werden durch gleichzeitige Infektion einer Wirtszelle mit Influenzaviren verschiedener Stämme RNA-Segmente vermischt, wodurch sprunghaft neue Virusvarianten entstehen. Antigendrift beschreibt die allmähliche evolutive Anpassung der RNA und damit der Proteine durch zufällige Mutationen. Die Grafik stammt vom WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (VIDRL) ([http://www.influenzacentre.org/Images/img\\_influenza\\_biology.png](http://www.influenzacentre.org/Images/img_influenza_biology.png), Zugriff am 18.06.2014).

Solche antigenen Veränderungen finden hauptsächlich in den zwei Oberflächenglykoproteinen statt<sup>75</sup>:

- (I) Hämagglutinin, welches an terminale Sialinsäuren bindet und
- (II) Neuraminidase, welches glykosidische Bindungen mit terminalen Sialinsäuren spaltet und damit die Freisetzung des Virus von der Wirtszelle und die Ausbreitung im Wirtorganismus ermöglicht.

## 2 Grundlagen

Aufgrund der Variationen in den Oberflächenantigenen können Impfstoffe die Ausbreitung der Grippe nur zeitlich begrenzt kontrollieren<sup>75</sup>. Der Nachweis des Virus kann sowohl über seine Oberflächen- und zytoplasmatischen Proteine, als auch molekularbiologisch erfolgen und wird im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

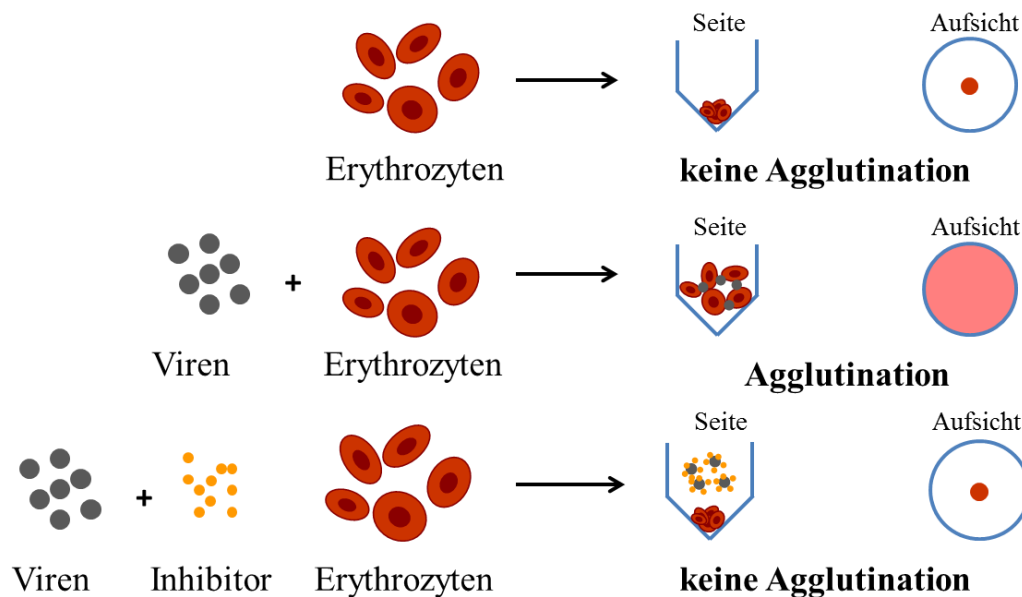
### 2.2.1 Relevanz einzelner Strukturelemente des Influenzavirus für die Diagnostik

Der erste Nachweis von humanen Influenzaviren wurde 1933 von W. Smith<sup>76</sup> erbracht. Der Nachweis der Krankheit war damals ausschließlich über eine symptomatische Diagnose (Fieberkurve, Schnupfen etc.) möglich. Die Infektion von Frettchen zu Forschungszwecken erfolgte in der Arbeit von W. Smith durch das Einbringen von Rachenabstrichen infizierter Menschen in die Nase der Tiere. Dass es sich bei dem Erreger um einen Virus handelte, wurde daraus geschlossen, dass eine Infektion auch nach Sterilfiltration der Abstriche über einen 0.6 µm Porenfilter möglich war. Somit konnte ein bakterieller Erreger ausgeschlossen und indirekt auf das Vorhandensein des Influenzavirus geschlossen werden.

Heutzutage stehen neben dem symptomatischen Nachweis verschiedene genotypische und phänotypische Methoden zur spezifischen Influenzadiagnostik zur Verfügung<sup>77</sup>. Von großer Bedeutung für die Verfolgung von Influenzaepidemien ist die Kultivierung der Viren in MDCK-Zellkulturen (*Madin-Darby canine kidney*) mit anschließendem serologischen, molekularbiologischen oder elektronenmikroskopischen Nachweis. Aus serologischer Sicht ist vor allem die Komplementbindungsreaktion von Bedeutung. Hierbei erfolgt der Nachweis von Komplexen aus spezifischem Antikörper und influenzatypspezifischem Nukleoprotein (NP). Eine Serotypisierung (z.B. H1N1, H3N2) ist damit nicht möglich, da das NP innerhalb eines Subtyps (A, B oder C) identisch ist<sup>78</sup>. Von großer labordiagnostischer Bedeutung ist auch die RT-PCR (*reverse transcription PCR*), welche ausgehend von der viralen RNA den molekularbiologischen Nachweis komplementärer, amplifizierter cDNA (*complementary DNA*) ermöglicht. Damit ist auch die Serotypisierung von Influenzaprobe möglich, die durch Wahl der entsprechenden Primer durchgeführt werden kann. Es existieren außerdem diverse kommerziell erhältliche Streifentests (*lateral flow assays*), die zumeist das NP adressieren. Sie ermöglichen eine schnelle Detektion, benötigen jedoch einen Probenaufbereitungsschritt zur Extraktion der eingeschlossenen Virusproteine und können ebenfalls nicht zur Serotypisierung herangezogen werden<sup>77</sup>.

Neben den Nachweissystemen basierend auf Strukturen innerhalb des Virus (NP, RNA) sind insbesondere Methoden zur direkten Detektion von Oberflächenstrukturen des Virus

von Bedeutung. Zum serologischen Nachweis werden vor allem Hämagglutinationsinhibitionstests (HAI-Test) durchgeführt (Abbildung 7), die die Fähigkeit des viralen HAs zur Agglutination roter Blutzellen ausnutzen. Beim HAI-Test werden charakterisierte Antisera als Inhibitoren eingesetzt, wodurch auch eine Serotypisierung der Probe möglich wird<sup>77,79,80</sup>.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Hämagglutinationsinhibitionstests (HAI-Test).** Aufgereinigte Erythrozyten aus humanem oder aviärem Blut sedimentieren in einem konischen Gefäß punktförmig in der Gefäßmitte. Influenzaviren können durch Bindung an Zuckerstrukturen an der Erythrozytoberfläche mehrere Blutzellen miteinander vernetzen. Dies führt zur Agglutination, welche als Gelbildung im gesamten Gefäß in der Aufsicht leicht mit bloßem Auge erkennbar ist. Bei zusätzlicher Anwesenheit eines Bindungsinhibitors zeigen die Zellen dasselbe Sedimentationsverhalten wie ohne Zugabe des Virus. Sie agglutinieren nicht.

HA-bindende Antikörper werden auch in Streifentests eingesetzt, in denen Viren direkt aus Abstrichen von infizierten Patienten diagnostiziert werden. Diese sind jedoch meist auf die Identifikation von bestimmten Subtypen begrenzt<sup>10,81</sup>. Die Nachweisgrenzen dieser Tests liegt mit  $10^3$ - $10^4$  TCID (*tissue culture infectious dose*) üblicherweise 2-3 Größenordnungen oberhalb eines ELISAs bzw. 4-6 Größenordnungen oberhalb eines molekularbiologischen Nachweises mittels PCR. Eine Nachweisgrenze bezogen auf die Anzahl der Viruspartikel bzw. die absolute Proteinmenge konnte für diese Streifentests nicht ermittelt werden. Vergleichbare Tests, die auf das Nukleoprotein anstelle des HA zielen, weisen eine

## 2 Grundlagen

Nachweisgrenze von 20-100 µg/ml Gesamtprotein, entsprechend  $10^7$ - $10^8$  Viruspartikeln pro Milliliter auf<sup>82</sup>.

Es gibt zahlreiche Forschungsarbeiten, die eine Identifizierung und Serotypisierung von Influenzaviren mittels auf das HA gerichteter Bindemoleküle zum Ziel haben. Diese werden nachfolgend, nach einer detaillierten Betrachtung des HA selbst, dargestellt.

### 2.2.2 Das Oberflächenprotein Hämagglutinin

Hämagglutinin ist ein trimeres membranständiges Glykoprotein und macht ca. 80% aller Proteine an der Oberfläche des Influenzaviruses aus. Es ist maßgeblich für die Bindung des Virus an die Zellmembran der Wirtszelle verantwortlich und ermöglicht durch einen pH-induzierten Konformationswechsel die Fusion von Virus- und Zellmembran während der Endozytose<sup>67,68,83-85</sup>.

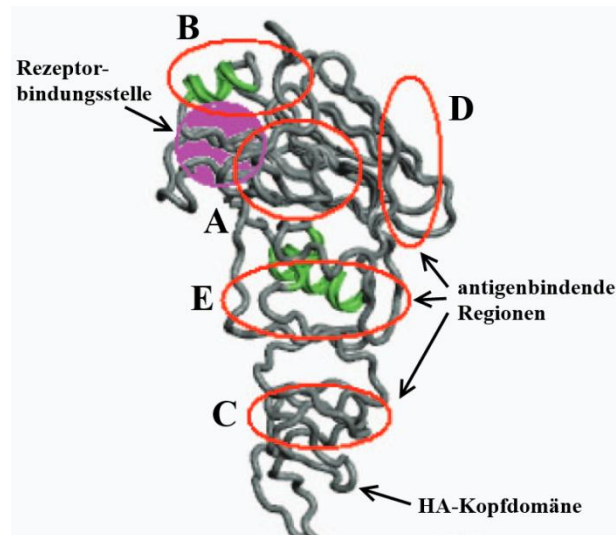
Das HA ist ein Homotrimer, es befinden sich ca. 400-500 HA-Trimere auf jeder Virusoberfläche<sup>86</sup>. Der mittlere Abstand zwischen den HAs beträgt 10 nm, der Abstand zwischen den Rezeptorbindungsstellen des Trimers beträgt 4 nm<sup>87</sup>. Ein HA besteht aus 547 AS, von denen 328 AS zur globulären Kopfdomäne HA1 mit der Rezeptorbindungsstelle und 221 AS zur Stammregion HA2 gehören<sup>88</sup>.

Die Serotypisierung von Influenzaviren des Subtyps A basiert auf Grundlage der Differenzen in den Oberflächenproteinen HA und NA. Bislang sind 18 HA-Serotypen von Vogel- und Säugetierviren (H1 - H18) bekannt, aber nur drei (H1, H2 und H3) sind auf die menschliche Population übergegangen und sind von Mensch zu Mensch übertragbar<sup>69,89,90</sup>. Andere Subtypen werden derzeit nur vom Tier auf den Menschen übertragen (z.B. H5N1, H7N9). Die Rolle des HA ist für die Entstehung von epidemischen und pandemischen Virusvarianten von entscheidender Bedeutung. Der letzte pandemische Influenzavirus vom Stamm H1N1 aus dem Jahr 2009 (A/California/07/2009) wies typische Punktmutationen auf, die eine Transmittierbarkeit des Virus zwischen verschiedenen Spezies und zwischen Menschen ermöglicht<sup>91,92</sup>. Hier liegt die größte Gefahr: Erwerben hochpathogene Stämme (z.B. H5N1) durch wenige Punktmutationen die Fähigkeit zur Übertragbarkeit zwischen Menschen, so können Pandemien mit hoher Mortalitätsrate ausgelöst werden. Das typische warnende Beispiel ist die „Spanische Grippe“ von 1918, welche als „Mutter aller Pandemien“ bezeichnet wird<sup>2</sup>. Nach gesicherten Erkenntnissen starben in dieser Influenzawelle mindestens 22 Mio. Menschen weltweit, die Dunkelziffer liegt aber vermutlich noch um das 2-3-fache höher<sup>2,93,94</sup>.

Die große Bedeutung des HA für die Infektionsfähigkeit des Virus liegt darin begründet, dass es sowohl für die Herstellung des ersten Kontaktes zur und zum Eindringen in die Wirtszelle verantwortlich ist. Außerdem muss über das HA als exponiertes Oberflächenprotein eine Neutralisierung durch das Wirtsimmunsystem verhindert werden. Der Wirtszellkontakt wird über die Rezeptorbindungsstelle im HA hergestellt. Diese interagiert mit 2,3'- oder 2,6'-verknüpften Sialylglykanen auf der Oberfläche von Epithelzellen des respiratorischen Traktes. An der Bindung zu den Zuckerstrukturen sind maßgeblich die Schleifenregionen 130 und 220 sowie die Helixregion 190 beteiligt<sup>94</sup>. Die dabei involvierten Aminosäuren sind teilweise hochgradig konserviert<sup>95</sup>. Die monovalente Bindung von HA zum Glykan besitzt eine Affinität im niedrigen millimolaren Bereich und ist damit sehr schwach<sup>68</sup>. Erst durch multivalente Bindung vieler HA-Moleküle eines Virus an mehrere Zuckerstrukturen des Wirtes wird eine hochaffine und spezifische Bindung generiert<sup>96</sup>. Diese Interaktion definiert auch die Wirtsspezifität des Virus. So binden aviäre Viren bevorzugt Sialinsäuren, welche über eine  $\alpha$ -2,3'-Bindung mit Galaktose verknüpft sind, während humane Stämme  $\alpha$ -2,6'-verknüpfte Sialinsäuren erkennen. Schweine können mit beiden wirtsspezifischer Virustypen (porcine Stämme) infiziert werden, weshalb in ihnen eine große Gefahr des Antigenshifts durch Vermischung verschiedener Influenzaserotypen besteht<sup>75</sup>. Nach Kontakt des HA mit der Wirtszellmembran wird dieses endozytiert.

Ein genereller Abwehrmechanismus der Zelle ist die Verringerung des pH-Wertes im Endosom durch Einstrom von Wasserstoffionen. Dieses macht sich der Influenzavirus zunutze. Durch die Verringerung des pH-Wertes wird im HA ein Konformationswechsel ausgelöst, wodurch wiederum ein hydrophobes Fusionspeptid an der HA-Außenfläche präsentiert wird<sup>88</sup>. Das Fusionspeptid vermittelt letztlich den direkten Kontakt zwischen viraler Membran und Zellmembran. Dadurch wird über mehrere Zwischenschritte schließlich den Transport der viralen RNA in den Zellkern ermöglicht.

Das HA gehört zu den hochgradig mannosylierten Proteinen, wobei die Rolle der Glykosylierung während der Infektion des Virus noch unklar ist. Es wurden bereits mehrere HA-bindende Antikörper beschrieben, durch welche insgesamt sechs antigenbindende Regionen (A-F) identifiziert werden konnten (Abbildung 8)<sup>74,97,98</sup>.



**Abbildung 8: Struktur der Hämagglutinin-Kopfdomäne (HA) mit identifizierten antigenbindenden Regionen und der Rezeptorbindungsstelle<sup>99</sup>.** Die antigenbindende Region F liegt unterhalb der Kopfdomäne innerhalb der HA-Stammregion.

Die antigenbindenden Regionen des HA sind wie die Rezeptorbindungsstelle selbst stark konserviert, weshalb sie typische Zielregionen für spezifische Bindemoleküle darstellen.

### 2.2.3 Hämagglutininbindende Moleküle für die Influenzadiagnostik

Das HA war und ist Gegenstand intensiver Forschungen zur Generierung von bindenden Molekülen mit dem Ziel Rezeptoren für Biosensoren zu gewinnen. Ein weiteres Ziel besteht darin Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe zu generieren. Dazu wurden in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten unterschiedlichste Bindemoleküle entwickelt. Diese binden sowohl an lineare Epitopsequenzen, Strukturepitope als auch an im HA vorhandene Glykane<sup>71,100,101</sup>. Verschiedene Gruppen dieser Binder mit ausgewählten Beispielen sind in Tabelle 1 dargestellt.



**Tabelle 1: Auswahl bekannter HA-bindender Moleküle.**

<b>Gruppe</b>	<b>Beispiel</b>	<b>adressierter HA-Serotyp</b>
monoklonale Antikörper	CH65 <sup>102</sup>	H1
	C05 <sup>103</sup>	H1, H2, H3
	S139/1 <sup>104</sup>	H1, H2, H3, H5, H9, H13
	HC19 <sup>105,106</sup>	H3
Nanobodies	MLV(H5) <sup>107</sup>	H5
Lektine	surfactant protein D <sup>108</sup>	H1, H3
	CL-43 <sup>109</sup>	H1, H3
<i>in silico</i> generierte Proteine	HB36/HB80 <sup>110</sup>	H1, H2, H5, H6
Sialinsäure-enthaltende Makromoleküle und Partikel	SPG <sup>111</sup>	H1
	AuNP 17 <sup>87</sup>	H3
Peptide als Sialinsäure-Mimetika	s2 <sup>112</sup>	H1, H3
	EB <sup>113</sup>	H1, H2, H3, H5, H7, B
	L-P1 <sup>114</sup>	H9
	P1 <sup>115</sup>	H5
Aptamere	A22 (DNA) <sup>116</sup>	H2, H3
	A-20 (RNA) <sup>117</sup>	B
	8-3 (RNA) <sup>118</sup>	H5, H7

Bei nahezu allen HA-bindenden Molekülen handelt es sich gleichzeitig um potentielle Inhibitoren, die die Anbindung des HA-Moleküls an die Wirtszellmembran oder die Fusion des HA mit der Wirtszellmembran verhindern. Besonders interessante Bindungseigenschaften zeigen einzelne Antikörper wie z.B. C05 und S139/1. Beide Antikörper binden unter anderem an der konservierten Rezeptorbindungsstelle (RBS) im HA. Dadurch können sie mit einer großen Bandbreite verschiedener HA-Serotypen und unterschiedlicher Influenzastämme interagieren. Da die Interaktionsfläche der Antikörper größer ist als die RBS stellen diese Antikörper außerdem kompetitive Inhibitoren der viralen Bindung an die Wirtszelle dar. Deshalb werden sie auch als Breitband-Antikörper (*broadly neutralizing antibodies*) bezeichnet. Aus Kokristallisationsexperimenten ging hervor, dass nur einzelne CDRs der beiden Antikörper (HCDR3 bei C05 und HCDR2 bei S139/1) tatsächlich attraktive Beiträge zur Bindung an das HA aufweisen. Dies impliziert bereits die Möglichkeit, die Größe der Antikörper auf ihre funktionalen Elemente, die CDRs, zu reduzieren.

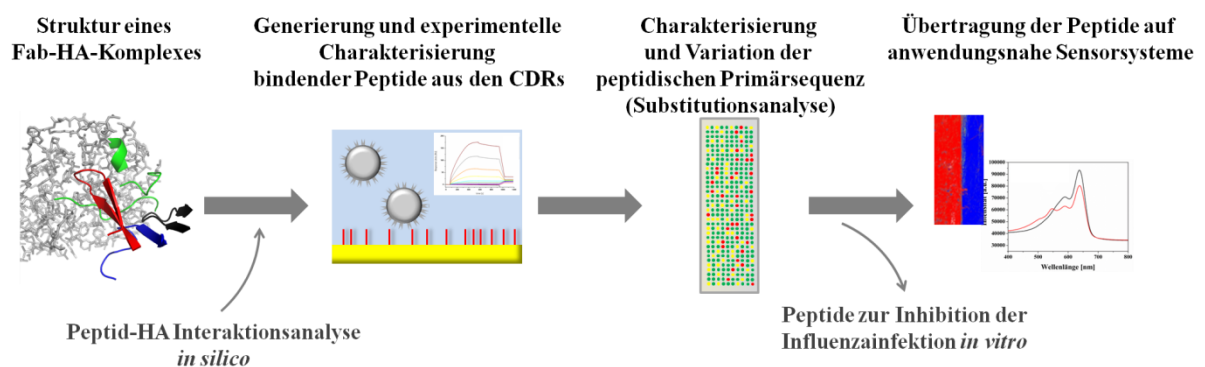
## 2 Grundlagen

Der in dieser Arbeit als Ausgangspunkt gewählte Antikörper HC19 bindet über seine CDRs insbesondere die 130-Schleifenregion und die 190-Helix des Hämagglutinins, welche zur diskontinuierlichen Rezeptorbindungsstelle gehören. Diese Regionen sind zwischen verschiedenen Influenzaserotypen besonders konserviert, was die Grundlage für eine Bindung verschiedener Influenzastämme darstellt.

Es wurden bereits einige Versuche unternommen, kleinere Moleküle zur spezifischen Bindung an HA zu generieren. Neben Nanobodies aus Kamelantikörpern sind hier vor allem mittels SELEX (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) generierte Aptamere sowie Peptide zu nennen, die an verschiedenen Positionen mit HA interagieren. Alle bisher bekannten influenzabindenden Peptide wurden entweder aus Phagen-Display-Experimenten gewonnen<sup>112,114,115</sup>, aus natürlich vorkommenden Peptiden (z.B. aus Skorpiongift) abgeleitet<sup>119</sup> oder mittels bioinformatischer Methoden *in silico* generiert<sup>120</sup>. Bis auf das stark amphiphile Peptid EB (RRKK-AAVALLPAVLLALLAP) wirken alle bekannten Peptide nur gegen ausgewählte Influenzaserotypen.

## 2.3 Zielsetzung

Um ein Peptid zu generieren, welches eine breite Aktivität gegen mehrere Influzasertypen aufweist, wird in der vorliegenden Arbeit erstmals der Versuch unternommen, bindende Peptide aus den CDRs eines Anti-HA Antikörpers zu generieren. Dazu werden lineare Peptide aus den CDRs des Antikörpers HC19<sup>105</sup> abgeleitet (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Rationales Vorgehen zur Generierung, Charakterisierung und Adaptierung von Peptiden.** Zunächst werden Peptidsequenzen aus den CDRs eines HA-bindenden Antikörpers abgeleitet und deren Bindungseigenschaften *in silico* charakterisiert. Die Bindungseigenschaften der Peptide gegenüber den Influzaviren werden anschließend in Abhängigkeit verschiedener Parameter experimentell mittels SPR untersucht. Die Primärsequenz eines Peptids wird mittels Microarray-basierter Substitutionsanalyse hinsichtlich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Peptid-Virus-Interaktion analysiert. Gleichzeitig werden daraus adaptierte Peptidvarianten zur Bindung verschiedener Influzastämme und -serotypen generiert. Schließlich wird das Potential der gefundenen Binder in anwendungsnahen biosensorischen Testsystemen evaluiert sowie die Fähigkeit der Peptide zur Inhibition der Virusinfektion *in vitro* charakterisiert.

Es existiert die Kristallstruktur des Fab-Fragmentes des Antikörpers im Komplex mit Hämagglutinin von Influzaviren des Stammes X31 (A/Aichi/2/1968, H3N2). Der Antikörper bindet die konservierte RBS des Virus, welche ein diskontinuierliches Epitop darstellt. Daher wird die Hypothese aufgestellt, dass die abgeleiteten Peptide ebenfalls mit der RBS interagieren und somit in der Lage sind weitere Influzastämme zu binden. Dies beinhaltet ebenfalls die Möglichkeit einer kompetitiven Inhibition mit den natürlichen Rezeptoren des Virus.



## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Proteine und Chemikalien

Alle Chemikalien und Proteine wurden, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet wie geliefert.

**Tabelle 2: Übersicht verwendeter Chemikalien und Proteine.**

Abkürzung	Bezeichnung	Hersteller
<b>Puffersubstanzen</b>		
Borat	Natriumborat	AppliChem
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	AppliChem
MES	2-(N-morpholino-)ethansulfonsäure	Carl Roth
PBS	Phosphatpuffer, lyophilisiert	Carl Roth
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Carl Roth
<b>Antikörper und andere Proteine</b>		
Anti-H3	monoklonaler anti-H3 Antikörper (InA246)	Hytect
RAM	polyklonaler anti-Maus Antikörper (aus Kaninchen)	Acris
Anti-FITC	monoklonaler anti-FITC Antikörper (B13DE1)	Dr. K. Hanack (Univ. Potsdam)
ADH	Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich
	Asialofetuin	Sigma-Aldrich
BSA	Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich
	Casein	Sigma-Aldrich
	Chitinase ( <i>Streptomyces griseus</i> )	Sigma-Aldrich
	C-Streptavidin	iba lifesciences
	Cytochrom C	Sigma-Aldrich
	Fetuin	Sigma-Aldrich
HSA	humanes Serumalbumin	Sigma-Aldrich
	Hyaluronidase (aus Rinderhoden)	Fluka
	Insulin (aus Rindermagen)	Sigma-Aldrich
	Lysozym (Huhn)	Fluka
	Neutravidin	Sigma-Aldrich
	Pektinase ( <i>rhizopus sp.</i> )	Fluka
	Ribonuklease A	Sigma-Aldrich
<b>Glykane</b>		
SL3	2,3'-Sialyllaktose	Carbosynth
SL3b	biotinylierte 2,3'-Sialyllaktose	Lectinity
SL6	2,6'-Sialyllaktose	Carbosynth
SL6b	biotinylierte 2,6'-Sialyllaktose	Lectinity
DANA	N-Acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminsäure-natriumsalz	Carbosynth
<b>weitere Chemikalien</b>		
Alkyl-PEG-OH		Polypure
Alkyl-PEG-COOH		Polypure
	Biotin	Sigma-Aldrich
	Essigsäure	AppliChem
EA	Ethanolamin	AppliChem
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	Sigma-Aldrich

### 3 Materialien und Methoden

	Fluoresceinisothiocyanat	Sigma-Aldrich
	Liponsäure	Sigma-Aldrich
MUNANA	4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäurenatriumsalz	Carbosynth
	Natriumcarbonat	AppliChem
	Natriumhydroxid	AppliChem
NHS	N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich
PDEA	2-(2-Pyridinyldithio)ethanamin	GE Healthcare
	Polyvinylpyrrolidon 90	Arnold Suhr
	Tween 20 (ultrarein)	Sigma-Aldrich

#### 3.1.2 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden, wie in nachfolgender Tabelle dargestellt, von kommerziellen Anbietern erhalten. Die Peptide wurden vom jeweiligen Hersteller mittels HPLC und MALDI- bzw. ESI-MS auf ihre Reinheit und Identität geprüft. Physikalische Eigenschaften der Peptide wurden mit Hilfe der Software PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>, Tulane University, New Orleans, USA) ermittelt. Die Aminosäuren der Peptide werden im Einbuchstabencode angegeben.

**Tabelle 3: Übersicht verwendeter Peptide.**

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller	Reinheit [%]	M <sub>w</sub>
<b>Peptid-Virus-Interaktionen</b>				
PeA	SGFLLISNGVHWV-amid	Biosynthan	>95	1428
Lys-PeA	KKKK-SGFLLISN-amid	Biosynthan	>95	1234
PeB	ARDFYDYDVFYAMD-amid	Genecust	98	1953
Cys-PeB-full	C-ARDFYDYDVFYAMD-amid	3BP	80	2056
Lys-PeB-full	KKKK-ARDFYDYDVFYAMD-amid	3BP	80	2465
Lys-PeB	KKKK-FYDYDVFY-amid	Biosynthan	80	1643
Cys-PeB	CKK- $\beta$ A-FYDYDVFY-amid	Biosynthan	90	1561
$\beta$ Ala-PeB	G- $\beta$ A- $\beta$ A-FYDYDVFY-amid	Biosynthan	95	1329
His-PeB	HHH- $\beta$ A-FYDYDVFY-amid	Biosynthan	95	1612
Btn-PeB	Btn- $\beta$ A-PEG2-FYDYDVFY-amid	Biosynthan	>95	1572
PeB-Btn	PEG2-FYDYDVFY-PEG2-EDA-Btn	Biosynthan	>95	1545
Lys-PeB-cycl.	KKKK-C-FYDYDVFY-C-amid (zyklisch)	Biosynthan	95	1847
	KKKK-FYYYDVFY-amid	Biosynthan	70	1691
PeB <sup>GF</sup>	ARDFYGYDVFYAMD-amid	Biosynthan	90	1879
Lys-PeB <sup>GF</sup>	KKKK-FYGYDVFY-amid	Biosynthan	64	1569
PeB <sup>N</sup>	ARDFYDYDVFNYAMD-amid	Genecust	94	1904
Lys-PeB <sup>N</sup>	KKKK-FYDYDVFN-amid	Biosynthan	85	1594
PeB <sup>P</sup>	ARDFYDPDVFYAMD-amid	Genecust	96	1887
Lys-PeB <sup>P</sup>	KKKK-FYDPDVFY-amid	Biosynthan	80	1578
PeB <sup>YF</sup>	ARDFYYYDVFYAMD-amid	Biosynthan	90	1985
Lys-PeB <sup>YF</sup>	KKKK-FYYYDVFY-amid	Biosynthan	58	1675
	KKKK-FYDYPVFY-amid	Biosynthan	85	1625
	KKKK-FYDYDPFY-amid	Biosynthan	80	1641
	KKKK-FYDYDQFY-amid	Biosynthan	80	1672
	KKKK-FYDYDRFY-amid	Biosynthan	95	1700
	KKKK-FYDYDVPY-amid	Biosynthan	85	1593

	KKKK-FYDYDVFP-amid	Biosynthan	85	1577
	KKKK-FYDYDVFF-amid	Biosynthan	75	1630
	KKKK-FYDYDVFT-amid	Biosynthan	80	1581
	KKKK-FYGYDVFY-amid	Biosynthan	63	1585
	KKKK-FYGYDQFY-amid	Biosynthan	83	1614
	KKKK-FYYYDQFY-amid	Biosynthan	73	1720
PeC	LGVIWAGGNTNY-amid	Genecust	98	1264
Lys-PeC	KK-BABA-LGVIWAGGNTNY-amid	3BP	90	1662
<b>Peptid-Antikörper Interaktionen</b>				
Lys-MP1	KKKKSG- GPPGMVGDWWDW-amid	Biosynthan	>95	2059
Cys-MP1	C-SGSG-GPPGMVGDWWDW-amid	Biosynthan	90	1793

### 3.1.3 Puffer

Alle Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, unter Verwendung von Reinstwasser hergestellt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe verdünnter NaOH- bzw. HCl-Lösungen eingestellt.

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten wässrigen Puffer.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
HBSP	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4
MES	32.5 mM 2-(N-morpholino-)ethansulfonsäure, 4 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 6.5
PBS	6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
FTP	20 mM Tris, 30% (v/v) Glycerin, 3% Polyvinylpyrrolidon 90 (w/v), 0.1% (v/v) Tween 20, pH 8.4
CP	100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , pH 8.5
Tris	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2

### 3.1.4 Virusmaterial

UV-inaktivierte Viren der Stämme X31 (A/Aichi/2/1968, H3N2 *reassembled* mit A/PuertoRico/8/1934, H1N1), WSN (A/WSN/1933, H1N1) sowie MSW (A/MuteSwan/Germany/R901/06; K3141, H7N1) wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik der Humboldt-Universität zu Berlin (Prof. Dr. A. Herrmann) zur Verfügung gestellt. X31 und MSW Viren wurden in bebrüteten Hühnereiern gezüchtet. Viren des Stammes WSN wurden durch Infektion von MDCK II Zellen hergestellt. Virusisolate aus der allantoitischen Flüssigkeit von Hühnereiern bzw. Zelllysate wurden zunächst mittels Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit geklärt (300 g, 10 min) und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert (100000 g, 1 h). Die Inaktivierung erfolgte durch Bestrahlung des Viruskonzentrats mit einer laborüblichen UV-Lampe ( $\lambda = 254$  nm) im Abstand von 10 cm für

### 3 Materialien und Methoden

5 min. Die Inaktivierung der Infektivität wurde durch Infektion von MDCK II Zellen überprüft. Die Bindungsfähigkeit der Oberflächenproteine wurde mittels Hämagglutinationsassays mit humanem Blut (DRK Berlin, (AB+)) sichergestellt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kommerziell erhältlicher BCA Assay (Kit, Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgien) unter Zuhilfenahme eines BSA-Standards nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Inaktivierter Virus des Stammes VIET (A/Vietnam/1203/2004, H5N1, NR-12148) wurde von BEI Resources (NIAID, NIH, USA) erhalten. Die monovalenten Spaltimpfstoffe der Stämme NY (A/NewYork/55/2004, H3N2) sowie VIC (A/Victoria/210/2009, H3N2) wurden von Dr. Zierenberg (GlaxoSmithKline, Dresden) zur Verfügung gestellt. Das Spaltimpfstoffmaterial (Pandemrix, GlaxoSmithKline) des Stammes CAL (A/California/07/2009, H1N1) wurde vom Ministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz des Landes Brandenburg erhalten.

**Säurebehandlung.** Zur Induzierung des pH-abhängigen Konformationswechsels des Hämagglutinins wurden zwei Methoden zur Säurebehandlung der Viruslösungen eingesetzt:

a) Die Viruslösung (50 µl) wurde zunächst mit dem gleichen Volumen 100 mM Essigsäure-NaOH pH 4.5 gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 µl der Lösung auf 30 kD Zentrifugalfiltern (Stemcell Technologies, Grenoble, Schweiz) aufgegeben und anschließend 10 min bei 14000 g zentrifugiert. Zur Neutralisation wurden anschließend 400 µl des jeweiligen Analysenpuffers (i.d.R. HBSP) zum Retentat hinzugegeben und wieder 10 min bei 14000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Das Retentat (ca. 20-50 µl) wurde anschließend aufgenommen.

b) Die Viruslösung (200 µl) wurde zur Einstellung von pH 5.0 mit 8.5 µl 100 mM Zitronensäure versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 5.5 µl NaOH (500 mM) hinzugegeben.



## 3.2 Bindungscharakterisierungen mittels SPR

Zur quantitativen Charakterisierung von Peptid-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen wurde die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) verwendet. Diese ermöglicht den markierungsfreien Nachweis der Bindung von Analyten in Echtzeit mittels oberflächengebundener Liganden. Die Liganden werden auf modifizierten Goldoberflächen immobilisiert, wobei eine quantitative Kontrolle der Ligandendichte erfolgt<sup>121</sup>. Das Messprinzip basiert auf der Detektion von oberflächennahen Änderungen (max. Entfernung von der Oberfläche ca. 300 nm) des Brechungsindex, welche in Resonanzeinheiten (*resonance unit*, RU) gemessen wird. Das Messsignal korreliert direkt mit der Masse an der Oberfläche adsorbierter Moleküle ( $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$ )<sup>122</sup>.

SPR Messungen wurden auf einem Biacore T100 (T200 Sensitivity Enhanced), einem Biacore FlexChip (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) bzw. einem Reichert SR7000DC (Xantec bioanalytics, Düsseldorf) durchgeführt. Für alle Messungen wurde, sofern nicht anders angegeben, eine Analysentemperatur von 25 °C sowie HBSP als Laufpuffer verwendet. Als Nachweisgrenze wird die Probenkonzentration mit einem Messsignal oberhalb der LOD (*limit of detection*) angegeben. Diese ist folgendermaßen definiert:

$$LOD = \overline{I_{NC}} + 3 \cdot SD_{I_{NC}} \quad (1)$$

$I_{NC}$  - Messsignal der Negativkontrolle (Puffer, sofern nicht anders angegeben)

### 3.2.1 Oberflächenmodifikationen und Immobilisierungsstrategien

#### 3.2.1.1 Kommerzielle SPR-Oberflächen

Für die Immobilisierung an Carboxyl-funktionalisierte Oberflächen wurden kommerziell erhältliche Chips (CM5, CM4, CM3 - GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden; CMD200M, CMDP - Xantec Bioanalytics, Düsseldorf; G-COOH-sp, p-COOH-sp - Ssens, Enschede, Niederlande) verwendet.

Aminkopplungen wurden über Carbodiimid-vermittelte Aktivierung der Carboxylgruppen durchgeführt<sup>123</sup>. Optimale Vorkonzentrierungsbedingungen wurden für jedes Peptid bzw. Protein durch Verdünnung in verschiedenen Acetatpuffern (10 mM, pH 4.0-5.5) bzw. Phosphatpuffern (10 mM, pH 6.0-7.5) und Verwendung verschiedener Ligandkonzentrationen ermittelt. Die Immobilisierung erfolgte nach dem allgemeinen Schema: Aktivierung mittels EDC/NHS (0.4/0.1 M, Endkonzentrationen: 0.2/0.05 M) – Ligandimmobilisierung –

### 3 Materialien und Methoden

Inaktivierung (Ethanolamin 1 M, pH 8.5). Bei einer Fließrate von 10 µl/min wurde für CM5 und CM4 Chips eine optimale Aktivierungszeit von 420 s, für CMD200M und CMDP Chips von 300 s und für G-COOH-sp und G-COOH-p Chips von 180 s ermittelt. Proteine wurden üblicherweise bei einer Massenkonzentration von 20-100 µg/ml, Peptide bei 100-500 µg/ml immobilisiert. Für alle Chips wurde die Inaktivierung mittels Ethanolamin für 420 s durchgeführt.

Thiolkopplungen über PDEA-vermittelte Oberflächenaktivierung wurden entsprechend der Angaben des Herstellers („Ligand Thiol Coupling“, Sensor Surface Handbook, GE Healthcare) durchgeführt. Nach Aktivierung mittels EDC/NHS wurde für 240 s PDEA (80 mM PDEA, 0.1 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, pH 8.5) über die Oberfläche geleitet und anschließend der Ligand immobilisiert (vgl. Aminkopplung). Die Oberfläche wurde mittels Cystein (50 mM Cystein, 1 M NaCl, 0.1 M Natriumacetat, pH 4.0) abgesättigt (240 s).

Für biotinylierte Liganden wurde zunächst mittels Aminkopplung Neutravidin immobilisiert (100 µg/ml, pH 5.5, 800 s, 5 µl/min). Der biotinylierte Ligand wurde anschließend bei einer Konzentration von 10 µg/ml im Laufpuffer für 180 s injiziert. Anschließend wurde für 120 s mit 10 µM Biotin in Laufpuffer abgesättigt.

Epoxid-funktionalisierte SPR Sensorchips für Experimente am Biacore FlexChip wurden von der PolyAn GmbH (Berlin, Deutschland) erhalten. Dafür wurden die Peptide in unterschiedlichen Konzentrationen mittels eines Spottingroboters (sciFLEXARRAYER S5, Scienion, Berlin) in einem Volumen von 1 nl aufgebracht und anschließend für 12 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach Einlegen des Chips ins SPR-Gerät wurde mit Ethanolamin (1 M, pH 8.5, 1200 s, Fließgeschwindigkeit 100 µl/min) abgesättigt.

#### **3.2.1.2 Neuartige Oberflächenmodifikationen für SPR**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch neuartige Funktionalisierungen auf Goldoberflächen für die Verwendung in der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und insbesondere zur Charakterisierung von Peptid-Protein- bzw. Peptid-Virus-Interaktionen untersucht.

***Para-Maleimidophenyl (p-MP)***. Die Funktionalisierung mittels *para*-Maleimidophenyl erfolgt über elektrochemische Abscheidung des korrespondierenden Aryl-Diazoniumsalzes (*para*-Maleimidophenyldiazoniumtetrafluoroborat, *p*-MPDT) auf Goldoberflächen<sup>124</sup>.

Dadurch wird eine kovalente Kohlenstoff-Gold-Bindung etabliert, was zu einer stabilen elektronenleitenden Schicht führt. Der Vorteil dieser Beschichtungsart liegt in seiner Universalität gegenüber der zugrundeliegenden Oberfläche (Metalle und Halbmetalle) sowie der elektronenleitenden Fähigkeit, was die Verwendung der funktionalisierten Oberflächen in optischen und elektrochemischen Sensorsystemen ermöglicht<sup>125</sup>.

*Para*-Maleimidophenyl-funktionalisierte Oberflächen wurden mittels elektrochemischer Abscheidung von *p*-MPDT auf Gold in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Rappich (Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie GmbH) nach einem dort entwickelten Protokoll hergestellt<sup>126</sup>. Die Immobilisierung Cystein-haltiger Peptide erfolgte bei einer Konzentration von 100 µg/ml in Natriumphosphat-Puffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 7) bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min und Injektionszeiten zwischen 300 und 1800 s. Zur Absättigung wurden zunächst 50 mM Cystein in 1 M NaCl und pH 4.0 für 20 min bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 µl/min injiziert. Anschließend wurde der Chip für 12 h mit 1 mg/ml BSA in HBSP geblockt.

**Liponsäure.** Die Liponsäure kann unter Aufspaltung der intramolekularen Disulfidbrücke chelatisierend über beide Schwefelatome an die Goldoberfläche binden und stellt somit eine bidentate Haftgruppe dar. Dies führt gegenüber monodentaten Molekülen zu einer stabileren Bindung zum Gold<sup>127</sup>. Zur Herstellung dieser Liponsäure-modifizierter Goldoberflächen wurden 100 µg/ml Liponsäure in Ethanol für 12 h bei Raumtemperatur auf einem unfunktionalisierten Goldchip (Ssens) inkubiert. Anschließend wurde mehrfach mit Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Der Modifizierungsnachweis wurde über Kontaktwinkelmessungen erbracht (Gerät: Contact Angle OCA, dataphysics, Filderstadt).

**Alkyl-PEGs.** Alkylierte Polyethylenglykole vereinen die Eigenschaften von Alkanthiolen und Polyethylenglykolen. Alkanthiole bilden dabei als monodentate Haftmoleküle hochgeordnete, selbstassemblierende Monolagen auf Gold aus<sup>128</sup>. Die Funktionalisierung dieser Alkanthiole mittels hydrophilem Polyethylenglykol führt zu einer hohen Biokompatibilität und für SPR-Experimente im Besonderen zu geringen unspezifischen Wechselwirkungen.

Thiol-funktionalisierte Alkyl-PEGs mit endständigen Carboxyl- bzw. Hydroxylgruppen (Polypure AS, Oslo, Norwegen) wurden in unterschiedlichen Mischverhältnissen bei einer Gesamtkonzentration von 100 µg/ml in Ethanol für 12 h auf nicht-funktionalisierten Goldchips (Ssens) inkubiert. Anschließend wurde mehrfach mit Ethanol gewaschen und im

Stickstoffstrom getrocknet. Der Modifizierungsnachweis wurde über Kontaktwinkelmessungen erbracht (Gerät: Contact Angle OCA, dataphysics, Filderstadt).

#### 3.2.2 Bindungsexperimente

**Biacore T100 und Reichert SR7000DC.** Für Bindungsexperimente wurde eine Fließgeschwindigkeit von mindestens 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  verwendet. Für Experimente zur kinetischen Analyse wurde eine Fließgeschwindigkeit von mindestens 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  verwendet. Quantitative Bindungssignale in Abhängigkeit von der Konzentration wurden erhalten, indem das Signal 10 s nach Injektionsstopp über einen Zeitraum von 5 s gemittelt wurde. Alle Bindungssignale wurden gegen eine Kontrollfließzelle (wenn nicht anders angegeben: Aktivierung und Absättigung ohne Ligandimmobilisierung bzw. Immobilisierung von Neutravidin und anschließende Absättigung mit Biotin) sowie gegen eine Injektion von Laufpuffer referenziert, um Puffer- und Matrixeffekte zu eliminieren. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Biacore Evaluation Software 1.1 bzw. 2.0.

**Biacore FlexChip.** Für alle Bindungsexperimente wurde eine Fließgeschwindigkeit von 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  verwendet. Die Analytlösung wurde zum Erreichen langer Expositionszeiten in einem Kreislauf wiederholt über die Sensoroberfläche geleitet. Unabhängig von der Injektionszeit wurden 1.8 mL Analytlösung vorgelegt. Die Regenerationslösung war in allen Experimenten mittels Biacore FlexChip 50 mM NaOH.

#### 3.2.3 Inhibitionsexperimente

Eine konstante Konzentration des Virus (z.B. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für X31) wurde bei gleichzeitiger Variation der Inhibitorkonzentration verwendet. Die Lösung aus Analyt und Inhibitor wurde in einem geeigneten Gefäß gemischt und für mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie injiziert wurde. Die SPR-Parameter der Inhibitionsexperimente wurden analog zu den Bindungsexperimenten gewählt.

Die prozentuale Inhibition wurde relativ zu mindestens fünf Injektionen des Analyten ohne Inhibitor berechnet sowie zusätzlich zu einer Injektion des Inhibitors gleicher Konzentration referenziert. Gegebenenfalls wurde die Abnahme der Bindungskapazität des Sensorchips über die Zeit mit Hilfe mehrerer Analytinjektionen zu verschiedenen Zeitpunkten kontrolliert und zur weiteren Referenzierung herangezogen.

### 3.3 Untersuchung der peptidischen Sekundärstruktur mittels zirkularem Dichroismus

Zur Verifizierung einer möglichen Sekundärstruktur des Peptides PeB wurden Messungen zum zirkularen Dichroismus (*circular dichroism*, CD) verschiedener Peptidlösungen durchgeführt. Die Methode erlaubt durch Detektion der Interaktion der chiralen Eiweißmoleküle mit zirkular polarisiertem Licht Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur von Eiweißen.

Alle Messungen erfolgten an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter (Betreuung der Experimente durch Dr. N. Jahnke, Universität Potsdam) in einer 1 mm Küvette und mit 200 µl Probenvolumen. Zur Aufnahme eines Wellenlängenscans wurde, sofern nicht anders angegeben, ein Wellenlängenbereich von 180-240 nm in Schritten von 1 nm kontinuierlich abgefahren. Das Primärsignal in mdeg wurde über je 4 s und von drei direkt aufeinanderfolgenden Messungen gemittelt. Schmelzkurven wurden bei der jeweils angegebenen festen Wellenlänge in einem Temperaturbereich von 5-95 °C aufgenommen. Ergänzend wurden Wellenlängenscans bei 5, 70 und 90 °C durchgeführt. Aus den Rohdaten wurde die molare Elliptizität  $\theta_{mrw}$  in  $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}\cdot 10^{-3}$  nach folgender Formel berechnet:

$$\theta_{mrw} = \left( \frac{C_{MR} \cdot \theta}{10 \cdot c \cdot l} \right) / 1000 \quad (2)$$

$C_{MR}$  - mittlere Aminosäurenkonzentration [g/mol],  $\theta$  - gemessene Elliptizität [deg],  $c$  - Massenkonzentration des Analyten [g/ml],  $l$  - Weglänge [cm]

Die molare Elliptizität erlaubt den Vergleich der Messwerte mit Literaturdaten, unabhängig von der Zusammensetzung des Proteins bzw. Peptids, der verwendeten Konzentration und der Weglänge im Strahlengang.

### 3.4 Einfluss von Inhibitoren auf die Neuraminidase-Aktivität

Der Neuraminidase-Aktivitätsassay basiert auf der Fähigkeit der Neuraminidase zur Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Glykoproteinen<sup>129</sup>. Diese enzymatische Aktivität wird ausgenutzt, um das Substrat 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäurenatriumsalz (MUNANA) unter Abspaltung der Sialinsäure ( $\alpha$ -D-Neuraminsäure) in 4-Methylumbelliferon (MBF) umzuwandeln. Das MBF wird anschließend über seine Eigenfluoreszenz detektiert. Basierend auf einem etablierten Assay<sup>130</sup>, wurden Anpassungen des Protokolls hinsichtlich Anregungs- und Detektionswellenlänge, Virus- und Substratkonzentration sowie

### 3 Materialien und Methoden

Inkubationszeiten durchgeführt. Anschließend wurde der Einfluss der influenzabindenden Peptide sowie eines bekannten NA-Inhibitors (DANA) auf die Neuraminidaseaktivität untersucht.

Zu 47.75  $\mu\text{l}$  MES wurden in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten (REF 353219, BD Bioscience) 1.25  $\mu\text{l}$  Viruslösung (verschiedene Konzentrationen) und 1  $\mu\text{l}$  einer 10 mM MUNANA-Lösung (gelöst in 10% MeOH in MES, Endkonzentration 200  $\mu\text{M}$ ) gegeben. Anschließend wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren die Reaktionslösung vermischt. Zur Durchführung von Inhibitionsexperimenten wurde statt reinem MES eine Inhibitor-haltige MES-Lösung vorgelegt und vor Substratzugabe 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz für weitere 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, sofern nicht anders angegeben. Die Reaktion wurde gegebenenfalls durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  14 mM NaOH in Reinstwasser gestoppt. Die Fluoreszenz des Produktes (MBF) wurde an einem Mikrotiterplattenreader (BMG LABTECH FLUOstar Omega Microplate Reader) bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einem Emmissionsfilter von 510 nm ausgelesen. Die absoluten Fluoreszenzsignale wurden gegen eine geeignete Negativkontrolle (wenn nicht anders angegeben: gleicher Reaktionsansatz mit MES statt Viruslösung) normiert, um das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) zu ermitteln.

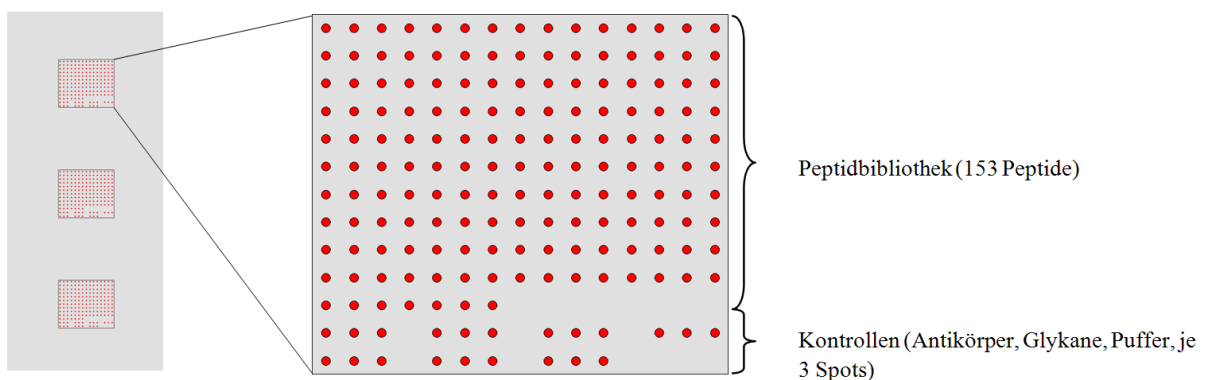
#### **3.5 Oberflächencharakterisierung mittels Rasterkraftmikroskopie**

Der Nachweis der Bindung von strukturell intakten Influenzaviren wurde mittels rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen (AFM) erbracht. Dazu wurden carboxymethyldextran-modifizierte Goldchips (CMD200M) analog zu den SPR Experimenten funktionalisiert. Nach Aktivierung der Chipoberfläche mittels 100  $\mu\text{l}$  EDC/NHS 0.4/0.1 M für 5 min, wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 100  $\mu\text{g/ml}$  PeB-Lösung (KKKK-FYDYDVFY) in Acetat-Puffer (pH 5.5) für 30 min inkubiert. Die Absättigung erfolgte für 30 min mit 100  $\mu\text{l}$  1 M Ethanolamin (pH 8.5). Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 10  $\mu\text{g/ml}$  X31-Lösung in HBSP für 30 min inkubiert, dreimal mit HBSP und dreimal mit Reinstwasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die AFM Aufnahmen erfolgten an einem CP-II AP 2001 (Veeco Germany, Mannheim) mit einer AC 160TS (Olympus, Hamburg) Spitze im Tapping-Modus bei einer Oszillationsfrequenz von 300 kHz durchgeführt. Die AFM-Messungen wurden von A. Christmann (Fraunhofer IBMT, Potsdam) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Software Gwyddion 2.28 (SPM data) hinsichtlich Rauigkeiten, Partikelgrößen und Topographie ausgewertet.

### 3.6 Charakterisierung der peptidischen Primärsequenz mittels Microarrays

Ein Microarray ist ein Biochip aus einem planaren Trägermaterial (typischerweise Glas, Zellulose oder Silizium), auf dem eine Vielzahl von Liganden (z.B. DNA, Proteine, Zucker, Peptide) in einem örtlich aufgelösten regelmäßigen Raster im Mikrometermaßstab gekoppelt werden<sup>131</sup>. Dies ermöglicht die parallele Analyse aller immobilisierter Liganden im Hochdurchsatzverfahren. Dazu wird das Trägermaterial mit dem fluoreszenzmarkierten Analyten in Kontakt gebracht, welcher selbst nur an Positionen mit spezifischem Liganden bindet. Dieses Bindungsereignis wird schließlich mit einem Fluoreszenzscanner orts aufgelöst ausgelesen. Peptidmicroarrays bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und werden unter anderem zur Ligandoptimierung, Enzymprofilierung als auch serologischen Diagnostik eingesetzt<sup>132</sup>.

In dieser Arbeit wurden Peptidbibliotheken zur Identifizierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie Optimierung der Primärsequenz peptidischer Liganden benutzt. Dazu wurde eine Peptidbibliothek zur vollständigen Substitutionsanalyse des Peptids PeB erstellt, in der jede Aminosäure an jeder Position gegen jede andere der 20 kanonischen Aminosäuren ausgetauscht wurde (siehe Anhang). Die 153 Peptide dieser Bibliothek wurden anschließend synthetisiert (PepStar<sup>®</sup> Peptidbibliothek, JPT GmbH, Berlin) und auf Glasobjektträgern im Spotformat immobilisiert. Der resultierende Microarray wies drei identische Subarrays auf, welche jedes Peptid sowie verschiedene Positiv- und Negativkontrollen enthielt (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Peptidmicroarray zur Determinierung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung.** Links ist das Layout der drei identischen Subarrays auf einem Glasobjektträger dargestellt, rechts die Anordnung der einzelnen Sonden im Subarray. Neben den Peptidvarianten zur Substitutionsanalyse wurden weitere Kontrollproteine und -glykane immobilisiert.

Anschließend wurde nach einem optimierten Protokoll mit fluoreszenzmarkiertem Virusmaterial inkubiert und schließlich die Fluoreszenz des an die immobilisierten Sonden gebundenen Materials ausgelesen. Die erhaltenen peptidmodifizierten Objektträger wurden ohne weitere Vorbehandlung verwendet. Die markierten Analyten wurden für 4-12 h in angegebener Konzentration in Femtotip-Puffer (FTP)<sup>133</sup> inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit FTP und zweimal mit Reinstwasser gewaschen und sofort im Stickstoffstrom getrocknet.

Die Fluoreszenz wurde mittels laserbasiertem Fluoreszenzscanner (Axon 4200A, Molecular Devices, Biberach) bei Wellenlängen von 532 und 633 nm und einer Auflösung von 10  $\mu\text{m}$  gemessen und mit Hilfe der Software GenePix Pro 6.0 ausgewertet. Zur Auswertung der Fluoreszenzintensitäten wurde der hintergrundkorrigierte Median der Intensitäten aller Pixel des Probenspots verwendet. Die Bewertung aller Microarrays wurde, sofern nicht anders angegeben, unter Berechnung des Kontrastes  $C$  durchgeführt.

(2)

$I_S$  – relative Fluoreszenz des Probenspots (nach Abzug des lokalen Hintergrundes)

$I_{NC}$  – relative Fluoreszenz der Negativkontrolle (nach Abzug des lokalen Hintergrundes)

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen wurde unter Verwendung kommerzieller Kits (Fluoro-spin 647 bzw. Fluoro-spin 537, emp Biotech, Berlin) entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Effektivität der Fluoreszenzmarkierung wurde durch Messung der Proteinabsorption bei 280 nm sowie der Absorption bei entsprechender Wellenlänge des Farbstoffes evaluiert. Gegebenenfalls wurde die Bindungsfähigkeit der Proteine vor und nach Markierung mit Hilfe von SPR-Experimenten verifiziert.

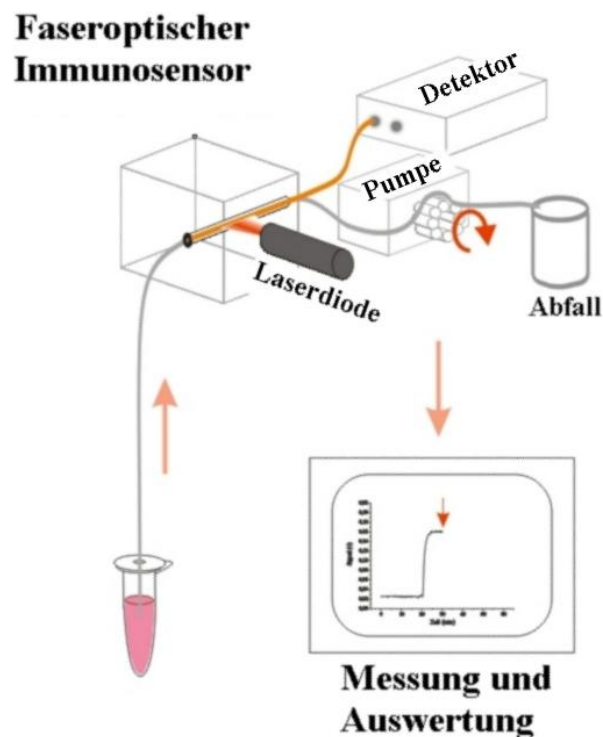
## 3.7 Übertragung des Peptid-Virus-Bindungssystems auf biosensorische Testsysteme

### 3.7.1 Sensorik mittels faseroptischem Sensor

Das gefundene Bindersystem aus Peptid und Virus wurde auf einen bereits für das Progesteron-Monitoring kommerzialisierten faseroptischen Sensor übertragen, welcher am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik entwickelt wurde. Die Rezeptormoleküle werden dabei auf eine dünne epoxy-funktionalisierte Glasfaser ( $\varnothing = 0.7 \text{ mm}$ ) immobilisiert.



Zur Detektion des fluoreszenzmarkierten Analyten wird Licht der Wellenlänge 633 nm in die Glasfaser eingekoppelt. Bei Bindung des über ein fluidisches System zur Faser geleiteten Analyten, wird das vom Fluorophor emittierte Licht am Ausgang der Glasfaser über einen optischen Sensor wellenlängenspezifisch in einer Frequenz von 0.1 Hz als Spannung detektiert. Nach computergestützter Prozessierung der Daten können so Zeit-Spannungskurven erstellt werden, die ähnlich wie beim SPR eine Echtzeitanalyse des Bindungsereignisses ermöglichen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Detektionsprinzip des faseroptischen Sensors.** Die spezifische Bindung eines fluoreszenzmarkierten Analyten (z.B. Influenzavirus) an die ligandmodifizierte Glasfaser wird nach Anregung über eine Laserdiode in Echtzeit detektiert.

Epoxidfunktionalisierte Glasfasern wurden durch Inkubation in Antikörper- bzw. Peptidlösung (100 µg/ml, Carbonat-Puffer pH 9.0) modifiziert. Die Oberfläche wurde mittels 1% BSA in Reinstwasser und 0.5% Tween 20 geblockt. Nach Einbau der Faser in das Messgerät wurde mehrfach mit PBS gespült, bis ein stabiles Basisliniensignal erhalten werden konnte. Danach wurden Lösungen von Farbstoff-markiertem Virus (X31-Dye647) in verschiedenen Konzentrationen (7.5 bzw. 30 µg/ml) und für verschiedene Zeiten injiziert. Die Bindung des Virus wurde mit 50 mM NaOH regeneriert.

### 3.7.2 Virusnachweis mittels PDA-modifizierter Oberflächen

Polydiacetylen-Polymere (PDA-Polymere) besitzen aufgrund der parallelen Ausrichtung ihrer einzelnen  $\pi$ -konjugierten Polymerketten eine blaue Farbe, weisen ein Absorptionsmaximum bei ca. 650 nm auf und fluoreszieren nicht. Durch verschiedene Ereignisse (Temperaturänderung, pH-Änderung, mechanische Beanspruchung) kann die Ausrichtung der Polymerketten zueinander verändert werden. Dadurch wird ein Farbübergang von blau zu rot induziert. Das Absorptionsmaximum des roten Zustandes liegt bei 540 nm. Außerdem zeigt das Polymer in diesem Zustand eine ausgeprägte Fluoreszenz<sup>134</sup>. Der Übergang kann auch durch spezifische Bindung einzelner funktionalisierter Polymerketten an ein Analytmolekül ausgelöst werden<sup>135,136</sup>. Dadurch wird die Verwendung in Biosensoren ermöglicht. Die Bindung des Analyten und die sichtbare Signalgebung sind somit innerhalb eines Makromoleküls vollständig integriert.

Peptidmodifizierte PDA-Slides wurden von der PolyAn GmbH (Berlin), einem literaturbekannten Protokoll folgend, hergestellt<sup>137</sup>. Zur Herstellung der Monomere wurde 10,12-Pentacosadiinsäure (PCDA) mittels Carbodiimid-vermittelter Aminkopplung an Lysin-modifizierte Peptide (Lys-PeB, KKKK-FYDYDVFY) gekoppelt. Anschließend wurden reine PCDA- und peptidmodifizierte PCDA-Monomere gemischt und per Spin-coating auf einen modifizierten Glasobjektträger aufgebracht. Anschließend wurde mittels Photocrosslinking auspolymerisiert.

Die Analytbindung erfolgte in Tris-Puffer bei verschiedenen Salzkonzentrationen und pH-Werten durch Aufbringen der Analytlösung im Spotformat (Genetix QArray2, Molecular Devices, UK) oder ganzflächig auf die PDA-modifizierten Glasobjektträger. Anschließend wurde dreimal mit Tris-Puffer und dreimal mit Reinstwasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines laserbasierten Fluoreszenzscanners (Axon 4200A, Molecular Devices, Biberach), die UV-Vis Spektren mittels Photometer (Specord 200, Analytik Jena) ausgelesen.

### 3.8 Kompetitive Inhibition *in vitro*

#### 3.8.1 Hämagglutinationsinhibitions-Tests zur Charakterisierung von Bindungsinhibitoren

Die Hämagglutinationsinhibition (HAI, siehe 2.1.1) wurde zum Nachweis der Interaktion von Peptiden und Zuckern mit dem HA sowie zur Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften dieser Moleküle genutzt.

Je 50  $\mu\text{l}$  der verwendeten Inhibitoren wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:2 in einer klaren Mikrotiterplatte in PBS vorgelegt. Anschließend wurden 2 Hämagglutinationseinheiten (*hemagglutination units*, HAU) entsprechend  $2 \cdot 10^6$  Viruspartikel zu jeder Vertiefung (*well*) hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50  $\mu\text{l}$  einer 1%-igen Erythrozytlösung ( $\sim 2 \cdot 10^6$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) hinzugefügt und erneut für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine exakte Bestimmung des Hämagglutinationsgrades wurde die Mikrotiterplatte um  $60^\circ$  gekippt, was zu einer Tropfenformierung der enthaltenen roten Blutzellen führte. Die Inhibitorkonstante  $K_i(\text{HAI})$  ist die niedrigste Inhibitorkonzentration bei welcher eine vollständige Inhibition beobachtet werden konnte. Der  $IC_{50}$ -Wert wurde als Mittelwert zwischen  $K_i(\text{HAI})$  und der höchsten Konzentration mit vollständiger Hämagglutination bestimmt.

#### 3.8.2 Zellbasierte Infektionsinhibition

Die Inhibition der Influenzainfektion von Säugerzellen wurde zur weiteren Charakterisierung der inhibitorischen Eigenschaften der gefundenen Peptide untersucht. Dazu wurde eine lebend-tot Unterscheidung mittels MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazoliumsalz, Promega) durchgeführt. MTS wird von metabolisch aktiven Zellen zu Formazan umgesetzt, welches durch Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm spektroskopisch nachgewiesen werden kann.

MDCK II Zellen ( $3.4 \cdot 10^4$  Zellen) wurden am Tag vor der Infektion in Mikrotiterplatten ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Influenzaviren (X31) wurden mit den Peptiden in einer 2-fachen Verdünnungsreihe für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln vorinkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die vorinkubierten Viren für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nichtgebundene Viren wurden danach entfernt, indem bei  $37^\circ\text{C}$  mit Infektionsmedium gewaschen wurde. Die Zellen wurden weitere 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zum Auslesen wurde 20  $\mu\text{l}$  MTS-Lösung zu jedem Well hinzugefügt und weitere 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorption des umgesetzten

### 3 Materialien und Methoden

MTS-Substrates wurde schließlich bei 490 nm mit Hilfe eines Plattenreaders ausgelesen. Die Inhibitionsexperimente wurden von D. Lauster (HU Berlin) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse werden analog der in der Zielsetzung gezeigten Vorgehensweise dargestellt, dabei wird die Hypothese verfolgt, dass spezifische Peptide aus den Paratopen eines hämagglutininbindenden Antikörpers abgeleitet werden können. Zunächst werden die Bindungseigenschaften der CDR-abgeleiteten Peptide mittels Molekulardynamik-Simulationen *in silico* und experimentell mittels SPR untersucht. Anschließend wird die Primärsequenz eines Peptids mittels Substitutionsanalyse genauer charakterisiert und zur Verbesserung der Bindungseigenschaften variiert. Schließlich wird das Bindersystem auf anwendungsnahe Testsysteme übertragen. Zusätzlich werden Experimente zur *in vitro* Inhibition der Virusinfektion dargestellt, da einige Peptide inhibitorische Eigenschaften zeigen.

### 4.1 Generierung und Charakterisierung neuartiger influenzabindender Peptide aus dem Paratop des Antikörpers HC19

Die Strukturdaten eines Fab-HA-Komplexes des Antikörpers HC19 (PDB: 2vir<sup>106</sup>) wurden genutzt, um lineare hämagglutininbindende Peptide aus dessen Paratopsequenz abzuleiten. Die hypervariable komplementaritätsbestimmende Region der schweren Kette (*complementarity determining region*, HCDR) besitzt die meisten Kontakte des Antikörpers mit Hämagglutinin (Stamm: H3N2 A/Aichi/2/1968, „X31“), wie aus der Kristallstrukturanalyse des Fab-Fragmentes im Komplex mit HA hervorgeht. Die für die Bindung entscheidenden Schleifen (*Loops*) wurden aus der Primärsequenz des Fab-Fragmentes abgeleitet<sup>138</sup>. Für die spezifische Bindung eines Antikörpers ist außer der Primärsequenz der CDRs auch die sterische Anordnung der Aminosäuren im dreidimensionalen Raum maßgebend. Daher wurden neben den Kernsequenzen auch N- und C-terminale Erweiterungen vorgenommen, um eine mögliche stabile Sekundärstruktur (siehe dazu 4.1.6 „Untersuchungen zur Sekundärstruktur mittels zirkularem Dichroismus“) der abgeleiteten Peptide zu erreichen (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Eigenschaften CDR-abgeleiteter Peptide.** Die Peptideigenschaften wurden mittels PepDraw ermittelt ([http://tulane.edu/news/newwave/010411\\_peptides.cfm](http://tulane.edu/news/newwave/010411_peptides.cfm), Zugriff am 18.06.2014). Die unterstrichenen Aminosäuren bilden die CDRs<sup>138</sup>.

Abkürzung	Sequenz <sup>a</sup>	$M_w$ [Da]	pI	Hydrophobizität <sup>b</sup> [kcal/mol]
PeA	SG <u>FLLIS</u> NGVHWV	1428	7.9	5.96
PeB	ARD-FYDYDV <u>FY</u> -YAMD <sup>c</sup>	1953	3.5	17.88
PeC	LGVIW <u>AGG</u> NTNY	1264	5.5	8.17

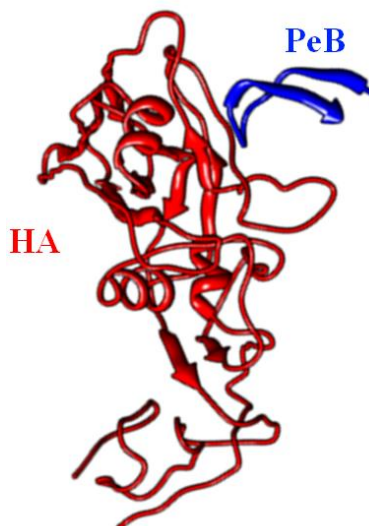
<sup>a</sup>Die Peptide sind C-terminal amidiert. <sup>b</sup>Die Hydrophobizität ist in der Wimley-White Skala<sup>139</sup> angegeben, welche die notwendige Freie Energie zur Überleitung des Peptids von einer wässrigen in eine hydrophobe Umgebung beschreibt (Vergleichswerte: Dekasparaginsäure +44.3 kcal/mol, Dekaleucin: -4.6 kcal/mol). <sup>c</sup>Das Peptid PeB wurde in einer kurzen Variante bestehend aus den zentralen acht Aminosäuren F1-Y8 und in einer verlängerten 15 Aminosäuren umfassenden Variante verwendet.

Die Interaktion der abgeleiteten Peptide mit dem HA wurde mittels Molekulardynamik-Simulation *in silico* vorausberechnet. Die Ergebnisse dieser Studie sollen zunächst kurz rekapituliert werden, bevor die Darstellung der experimentellen Validierung erfolgt.

### 4.1.1 Molekulardynamik-Simulationen zur Charakterisierung der Peptid-HA-Interaktion *in silico*

Die Molekulardynamik-Simulation der Peptid-HA Interaktionen ging von der Kristallstruktur des Fab-HA-Komplexes (PDB: 2vir) des Antikörpers HC19 aus und wurde von P. Kar und V. Knecht (MPI-KG, Potsdam) durchgeführt. Die molekulare Bindungsdynamik der einzelnen Peptide wurde für 10 ns simuliert. Aus diesen Untersuchungen wurde die gesamte Gibbs'sche Freie Energie der Bindung berechnet. Die Freie Energie konnte für das Peptid PeA nicht bestimmt werden, da es während der Simulation von der HA-Oberfläche dissoziierte. Dieses Peptid geht somit losgelöst von der restlichen Antikörperstruktur keine stabile Bindung zum HA ein. Für die Bindung von HA an die Peptide PeB und PeC wurden Freie Energien von -13.1 bzw. -15.3 kcal/mol bestimmt. Diese Werte liegen in der typischen Größenordnung nicht-kovalenter Interaktionen (siehe 2.1.2 „Wechselwirkungen bindender Peptide“).

Aus den literaturbekannten Strukturdaten geht hervor, dass das Peptid PeB während der Bindung direkt an der konservierten Rezeptorbindestelle des HA lokalisiert ist, weshalb die PeB-HA Interaktion genauer charakterisiert wurde. Aus der Simulation der Molekulardynamik kann ein dreidimensionales Strukturmodell dieser Interaktion erstellt werden (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** *In silico* generiertes dreidimensionales Modell der Interaktion zwischen dem Peptid PeB (blau) und HA (rot) des Influenzastammes X31. Das Peptid PeB interagiert mit der Spitze des HA im Bereich der Rezeptorbindungsstelle (vgl. Abbildung 8 „Struktur der Hämagglutinin-Kopfdomäne“)

Das Peptid behält der Molekulardynamik-Simulation folgend auch in Lösung seine Strang-Schleifen-Strang Konformation vergleichbar zur Sekundärstruktur im Fab-Fragment bei. Die Schleifenregion bleibt dabei zum HA orientiert und geht bindende Wechselwirkungen ein, während die  $\beta$ -Stränge vom HA wegdeuten. Es wurden die energetischen Anteile jeder Aminosäure an der Interaktion im Peptid und im HA berechnet (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Aufschlüsselung der Anteile der Freien Energie ( $G$ ) je Aminosäure im Peptid PeB.

AS	$G$ [kcal/mol]
F1	-0.8
Y2	-0.1
D3	+0.8
Y4	-1.7
D5	+2.3
V6	-0.2
F7	-2.1
Y8	-0.1

Es ist evident, dass die für die Sekundärstruktur verantwortlichen terminalen Aminosäurereste (N-terminal: A-D, C-terminal: Y-D) weder signifikant attraktive, noch repulsive energetische Beiträge leisten. Die größten attraktiven Beiträge zur Freien Energie besitzen die hydrophoben Aminosäuren F1 (-0.8 kcal/mol) und F7 (-2.1 kcal/mol) sowie

Y4 (-1.7 kcal/mol). Die negativ geladenen Asparaginsäuren D3 und D5 wirken repulsiv (+0.8 bzw. + 2.3 kcal/mol). Eine Substitution dieser Aminosäuren könnte demnach zu einer höher affinen Interaktion zwischen Peptid und HA führen.

Die attraktiven Wechselwirkungen im HA resultieren maßgeblich aus Interaktionen von S136, N137 und L194 mit der Peptidsequenz (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Auflistung der freien Bindungsenergien für den PeB-HA-Komplex nach einzelnen Aminosäuren im HA.** Die Anteile der van-der-Waals ( $T_{\text{vdW}}$ ) und die Summe aller elektrostatischen Energien ( $T_{\text{pol, elek}}$ ), sowie der Gesamtenergiebeitrag der jeweiligen Aminosäure ( $T_{\text{TOT}} = T_{\text{pol, elek}} + T_{\text{vdW}}$ ) sind dargestellt. Nur AS mit  $|ΔG| ≥ 0.8$  kcal/mol sind aufgelistet. Alle Werte sind in kcal/mol angegeben.

AS	$T_{\text{vdW}}$	$T_{\text{pol, elek}}$	$T_{\text{TOT}}$
<b>S159</b>	-0.6	-2.4	-3.0
<b>N160</b>	-0.6	-1.2	-1.8
<b>E215</b>	-0.6	+1.7	+1.1
<b>L219</b>	-1.0	±0.0	-1.0

Die Glutaminsäure E215 wirkt signifikant repulsiv. Eine detailliertere Analyse der energetischen Verhältnisse zeigt, dass die Interaktion maßgeblich auf van-der-Waals (-28.3 kcal/mol), intermolekularen elektrostatischen Interaktionen (-187.7 kcal/mol) sowie dem hydrophoben Effekt (-2.8 kcal/mol) beruht. Demgegenüber stehen ungünstige Desolvationseffekte polarer Gruppen (+205.8 kcal/mol), welche allerdings durch die attraktiven Wechselwirkungen überkompensiert werden.

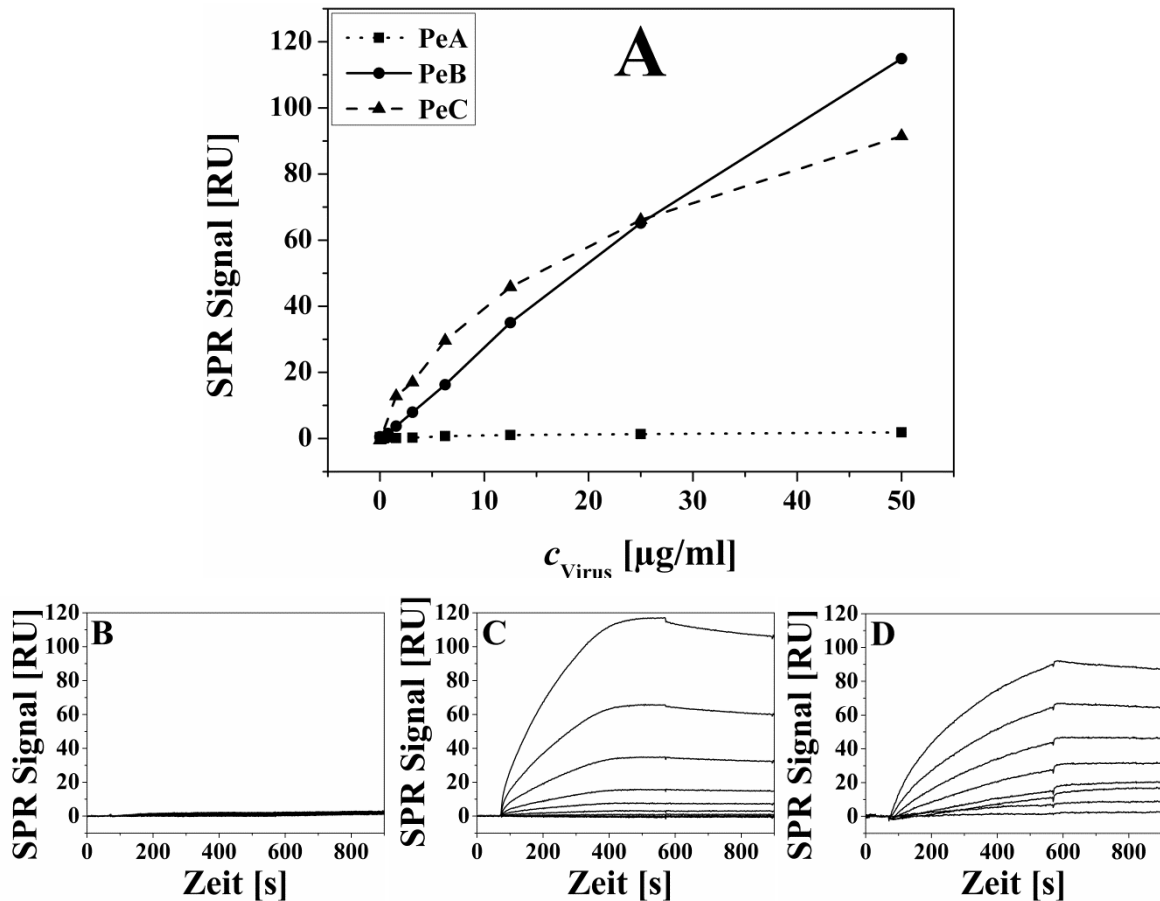
Die Verifizierung der theoretisch vorhergesagten Bindungsverhältnisse erfolgte nun experimentell, zunächst durch Bindungsuntersuchungen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR).

### 4.1.2 Charakterisierung der Peptid-Virus-Interaktion mittels SPR

Für die Anwendung von Liganden jeglicher Art in einem sensitiven und spezifischen Biosensor müssen diese in geeigneter Weise funktional immobilisiert werden. Dazu wurden die Peptidsequenzen der drei CDRs auf die für die Interaktion relevanten Abschnitte beschränkt und mit N-terminalen Oligolysin-Linkern versehen. Diese dienen zum einen zur Erhöhung der Löslichkeit der hydrophoben Peptide und zum anderen zur gerichteten Immobilisierung über Aminkopplungen (keines der Peptide enthält außer dem N-Terminus



weitere primäre Amine). Die drei Peptide wurden auf carboxymethylierten Dextranchips immobilisiert und die Bindung von strukturell intakten UV-inaktivierten X31-Influenzaviren mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) charakterisiert (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Bindung von X31-Viren an immobilisierte Peptide PeA, PeB und PeC.** A: Die Bindungssignale nach Injektionsstopp wurden gegen die eingesetzte Viruskonzentration aufgetragen. B-D: Repräsentative Sensorgramme von Injektionen des X31-Virus über eine PeA-Lys (A, 0.77 pmol/mm<sup>2</sup>), PeB-Lys (B, 0.73 pmol/mm<sup>2</sup>) und PeC-Lys (C, 1.93 pmol/mm<sup>2</sup>) modifizierte Sensoroberfläche. Die eingesetzte Viruskonzentration betrug 0.78-50 µg/ml. Die Virusinjektion startete bei t = 60 s (Start Assoziationsphase) und stoppt bei t = 560 s (Start Dissoziationsphase).

Die Immobilisierungsbedingungen für die lysinmodifizierten Peptide wurden zunächst hinsichtlich der Aktivierungszeit, der Peptidinjektionszeit sowie Peptidkonzentration, der Fließgeschwindigkeit und des pH-Wertes des Immobilisierungspuffers optimiert, um eine hohe Ligandendichte zu erreichen. Die Immobilisierung der Peptide über Aminkopplung konnte dadurch unter einheitlichen Bedingungen bei einer Aktivierungszeit von 300 s (Chip: Xantec CMD200M), einer Peptidkonzentration von 500 µg/ml, einer Peptidinjektionszeit von 1200 s bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min und einem pH-Wert von 5.5 in 10 mM Acetat-Puffer erfolgen. Es wurden zwischen 0.73-1.93 pmol/mm<sup>2</sup> Peptid immobilisiert. Dies

## 4 Ergebnisse und Diskussion

entspricht einer durchschnittlichen Ligandendichte von 0.4-1.2 Molekülen pro nm<sup>2</sup>. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Peptide in einer ca. 150 nm starken Dextranmatrix immobilisiert wurden und dadurch nicht alle Peptide für die Virusbindung zur Verfügung stehen. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass bei dem erreichten Immobilisierungsniveau mehrere Peptide ein Viruspartikel ( $d \approx 120$  nm) gleichzeitig binden können, sodass multivalente Bindungseffekte zu erwarten sind.

Es kann keinerlei Virusbindung an das Peptid PeA beobachtet werden. Die Peptide PeB und PeC zeigen ein vergleichbares Bindungsverhalten. Im untersuchten Bereich bis 50 µg/ml wird eine konzentrationsabhängige Zunahme des SPR-Signals beobachtet. Bei beiden Peptiden wird bis zur maximal eingesetzten Konzentration kein Gleichgewichtszustand (*steady-state*) erreicht. Die Auftragung des Bindungssignals gegen die Konzentration (Abbildung 12A) zeigt allerdings für beide Peptide eine beginnende Sättigung bei der höchsten eingesetzten Konzentration. Die Sensorgramme der Virusbindungen (Abbildung 12C/D) zeigen einen typischen Kurvenverlauf spezifischer Bindungsereignisse<sup>140</sup>. Während bei niedrigen Konzentrationen das Signal in der gesamten Assoziationsphase linear steigt, ist bei höheren Konzentrationen eine Krümmung zu beobachten. Bei weiterer Erhöhung der Analytkonzentration ist die Einstellung eines Gleichgewichtszustandes zu erwarten. Dies war aus experimentell-praktischen Gründen allerdings nicht möglich, da bei höherer Konzentration aufgrund des geringen Verdünnungsgrades der Analytlösung zusätzlich Puffereffekte auftreten. In der Dissoziationsphase ist ein langsamer Signalarückgang zu beobachten, der die sehr langsame Ablösung gebundener Viruspartikel von der Sensoroberfläche zeigt. Dies weist auf die multivalente Bindung der Viren über eine Vielzahl von Oberflächenproteinen an die dicht immobilisierten Liganden hin.

Eine vollständige kinetische Analyse der Peptid-Virus-Interaktion ist mit immobilisierten Peptiden aufgrund des multivalenten Bindungsverhaltens nicht möglich. Die verfügbaren kinetischen Modelle zum entsprechenden Fit des Kurvenverlaufs können den Einfluss der Multivalenz auf das Assoziationsverhalten mathematisch nicht erfassen<sup>12</sup>. Es existieren Modelle zur einfachen 1:1 Interaktion und zur bivalenten Bindung (z.B. von Antikörpern). Außerdem kann die Überlagerung von Signalen mehrerer Analyten unterschiedlicher Affinität bzw. mehrerer Liganden in heterogenen Modellsystemen berücksichtigt werden. Eine vereinfachte Betrachtungsweise der Bindung von Viruspartikeln an die immobilisierten Peptide nach dem 1:1 Modell könnte prinzipiell zu einer Abschätzung der apparenten Affinitäten dienen. Im vorliegenden Fall führt diese Vorgehensweise allerdings zu qualitativ

ungenügenden Fits, welche den Kurvenverlauf nicht adäquat nachbilden können. Dementsprechend wird auf eine Darstellung dieser Ergebnisse und deren Diskussion verzichtet. Aussagekräftige Messwerte können allerdings aus der Dissoziationsphase erhalten werden. Hierzu kann, unabhängig vom Molekulargewicht und der molekularen Bindungssituation (mono-/bivalent etc.) des Analyten, die Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  bestimmt werden. Es ergeben sich Werte von  $1.5 \pm 0.5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für PeB und  $6.1 \pm 5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für PeC. Wie bereits mit bloßem Auge erkennbar, sind dies niedrige Ratenkonstanten am Rande der Messgrenzen des Gerätes (Biacore T100, Instrument Handbook). Die Messwerte liegen in der gleichen Größenordnung wie für multivalente HA-Interaktionen mit immobilisierten Glykoproteinen<sup>141</sup> ( $k_d = 2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

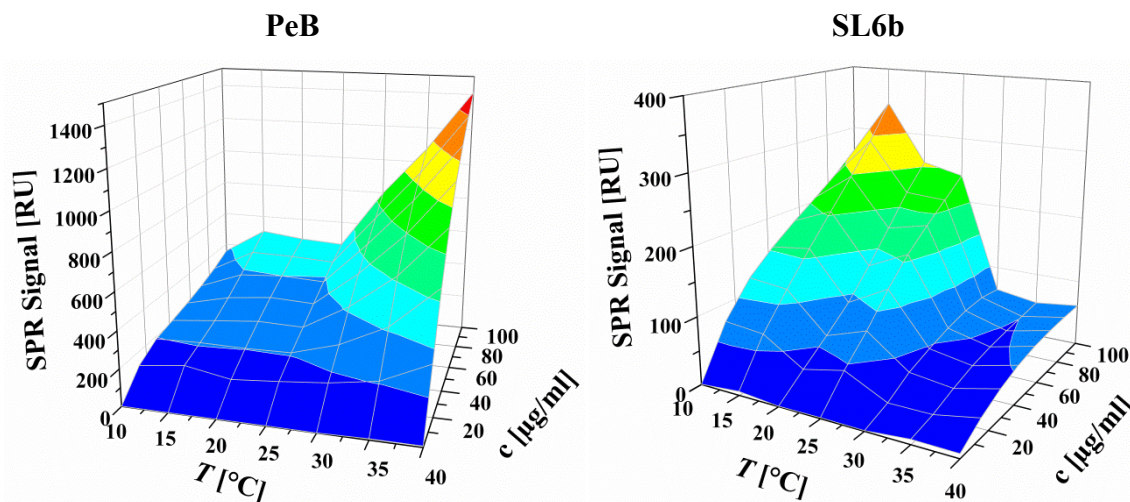
Die absoluten Intensitäten der Virussignale sind für große Partikel, die eine starke Änderung des oberflächennahen Brechungsindex bewirken, unerwartet. Sie stimmen in der Größenordnung jedoch mit literaturbeschriebenen SPR-Daten der Influenzavirusbindung an immobilisierte Antikörper<sup>142</sup> bzw. BHA-Rosetten an immobilisierte Glykane überein<sup>141</sup>.

Der experimentelle Nachweis der Bindefähigkeit der vom Paratop des Antikörpers abgeleiteten Peptide PeB und PeC konnte damit erbracht werden. Das Peptid PeB interagiert den Erkenntnissen aus der Kristallstrukturanalyse des Fab-HA-Komplexes sowie der Vorhersagen der molekularen Modellierung mit der konservierten Rezeptorbindungsstelle im HA. Das Peptid bietet damit das Potential mit anderen HA-Serotypen zu interagieren sowie kompetitiv inhibierend zu wirken. Die Interaktion zwischen PeB und Virus wird aus diesem Grund im weiteren Verlauf näher untersucht und das Peptid hinsichtlich verschiedener Eigenschaften modifiziert.

Zur weiteren Charakterisierung der PeB-Virus-Interaktion wurde diese in Abhängigkeit von Änderungen des pH-Wertes, des Salzgehaltes sowie der Temperatur mittels SPR untersucht. So werden Rückschlüsse auf thermodynamische und andere grundlegende Eigenschaften der Wechselwirkung ermöglicht. Ein direkter quantitativer Vergleich der absoluten Affinitäten ist hierbei aufgrund der multivalenten Natur der Virus-Oberflächen-Interaktion nicht möglich, da der zusätzliche Einfluss von Ligandendichte und dem damit verbundenen intermolekularen Abstand funktionaler Binder nicht evaluiert werden kann. Ligandendichte-Effekte werden im Abschnitt 4.1.4.2 beschrieben.

#### 4.1.2.1 Temperaturabhängigkeit

Die temperaturabhängige Bindungscharakterisierung erlaubt Rückschlüsse auf thermodynamische Eigenschaften der Peptid-Virus-Interaktion. Dazu wurden, wie in den vorangegangenen Experimenten, Viren verschiedener Konzentration (5 ng/ml – 100 µg/ml) bei Temperaturen zwischen 10 und 40 °C (in 5 K Schritten) an immobilisiertes Peptid PeB und zum Vergleich an immobilisierte biotinylierte  $\alpha$ -2,6'-Sialyllaktose (SL6b) gebunden (Abbildung 14).

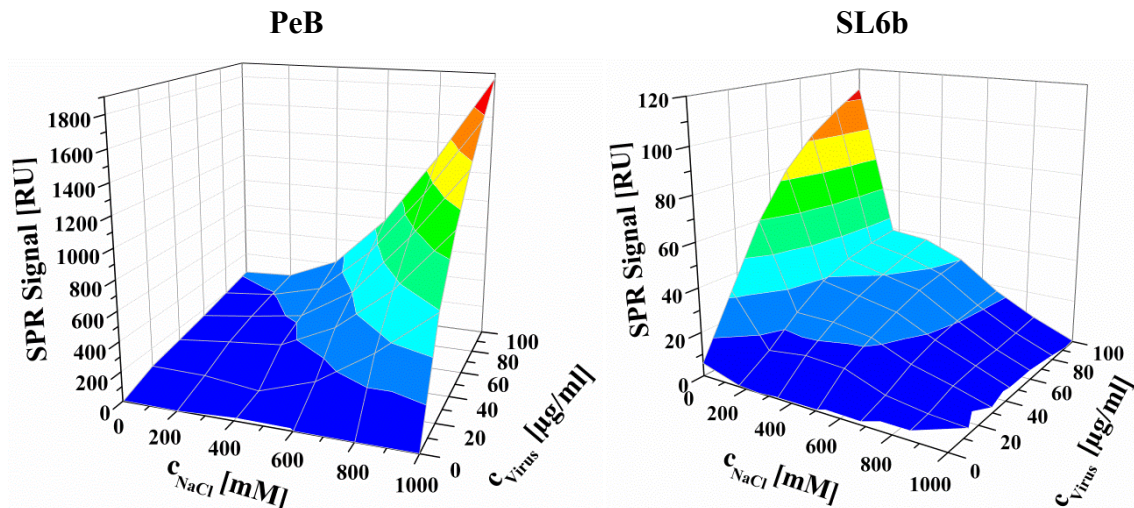


**Abbildung 14: Bindungsfähigkeit von Influenzaviren bei Variation der Temperatur.** Absolute SPR-Signale nach Injektion von X31-Viren verschiedener Konzentration über eine PeB- (Abbildung links) bzw. SL6b-modifizierte Oberfläche (Abbildung rechts). Die Temperatur wurde in Schritten von 5 K zwischen 10 und 40 °C variiert.

Für die beiden Liganden ergeben sich diametral gegenläufige Ergebnisse. Während die Bindung an das Peptid bei höheren Temperaturen effektiver abläuft, wird die Bindung an den Zucker bei niedrigen Temperaturen verstärkt. Das maximale Bindungssignal an das Peptid bei der höchsten verwendeten Viruskonzentration liegt bei 40 °C um den Faktor 4.0 höher als bei 10 °C. Wird Sialyllaktose verwendet, verringert sich das Bindungssignal zwischen dem Optimum bei 15 °C und dem Minimum bei 35 °C um den Faktor 6.4. Dies wird dadurch verursacht, dass den beiden Interaktionen verschiedene Wechselwirkungen zu Grunde liegen. Während die Bindung an Sialyllaktose maßgeblich durch Wasserstoffbrückenbindungen realisiert wird (welche bei geringerer Temperatur stärker sind<sup>121,143,144</sup>), hängt die Bindung an das Peptid PeB stark von van-der-Waals-Wechselwirkungen ab (siehe 4.1.1 „Molekuldynamik-Simulation“). Die Bindungen können demnach als entropie- (PeB) bzw. enthalpiegetrieben (SL6b) charakterisiert werden<sup>121</sup>.

#### 4.1.2.2 Abhängigkeit vom Salzgehalt

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Peptid-Virus-Interaktion vom Salzgehalt kann weitere Rückschlüsse auf die Natur der Bindung und deren zugrundeliegenden intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. vdW-Kräfte, ionische Wechselwirkungen) geben. Der Einfluss der Konzentration einwertiger Ionen wurde durch Variation des NaCl-Gehalts untersucht (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Bindungsfähigkeit von Influenzaviren bei Variation der Salzkonzentration.** Absolute SPR-Signale nach Injektion von X31-Viren verschiedener Konzentration über eine PeB- (Abbildung links) bzw. SL6b-modifizierte Oberfläche (Abbildung rechts). Es wurden bei einer Analysentemperatur von 25 °C NaCl-Konzentrationen von 0, 50, 150 und 1000 mM verwendet.

Im gesamten Konzentrationsbereich kann für eine PeB-modifizierte Sensorfläche eine Zunahme der Bindungskapazität beobachtet werden. Insgesamt erhöht sich das Bindungsniveau um den Faktor 7.6 (HBSP mit 0 M bzw. 1 M NaCl). Im Gegensatz dazu wird auf der SL6b-modifizierten Oberfläche bei Erhöhung der NaCl-Konzentration eine Verringerung des Bindungsniveaus bis hin zur vollständigen Signalunterdrückung detektiert. Üblicherweise werden SPR-Experimente bei einer mittleren physiologischen Salzkonzentration von 150 mM durchgeführt, um einerseits unspezifische elektrostatische Interaktionen mit der negativ geladenen Oberfläche zu minimieren und andererseits spezifische elektrostatische attraktive Kräfte nicht vollständig zu unterdrücken. Somit kann die Zunahme der Signalintensität bei PeB dahingehend interpretiert werden, dass die anziehende Wechselwirkung maßgeblich von hydrophoben Interaktionen bestimmt wird. Dies ist konsistent mit den Berechnungen der Molekulardynamik-Simulation, wonach attraktive Beiträge zur Freien Energie der Bindung überwiegend von van-der-Waals-Interaktionen

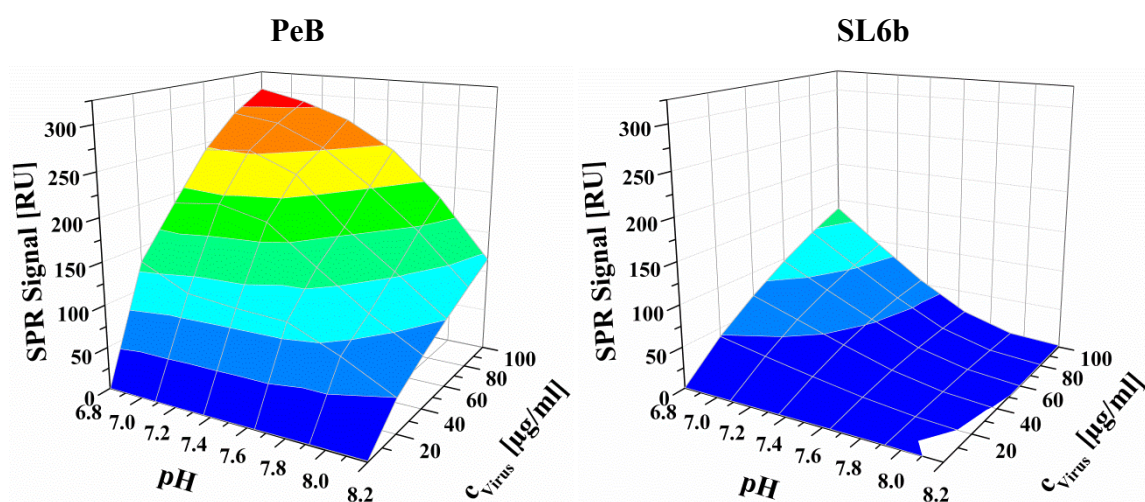
## 4 Ergebnisse und Diskussion

stammen. Dem gegenüber neutralisieren sich elektrostatische und polare Wechselwirkungen annähernd (siehe 4.1.1 „Molekulardynamik-Simulation“). Im Gegensatz dazu und in Übereinstimmung mit bekannten Daten, beruht die Interaktion mit der Sialyllaktose auf Wasserstoffbrückenbindungen<sup>94</sup>. Diese werden durch hohe Salzkonzentrationen und damit einhergehender Abschirmung lokaler Ladungen geschwächt<sup>145,146</sup>.

Die Beobachtungen der Temperatur- und Salzkonzentrationsabhängigkeit führen zu den gleichen Schlussfolgerungen, welche die Natur der PeB- bzw. Sialyllaktose-Virus-Interaktion betreffen und sind auch konsistent mit den Ergebnissen der Molekulardynamik-Simulation. Für biologische Systeme ist außerdem die pH-Abhängigkeit einer Interaktion ein weiterer wichtiger Parameter.

### 4.1.2.3 pH-Abhängigkeit

Der Einfluss des pH-Wertes ist für die Charakterisierung einer nichtkovalenten Wechselwirkung, insbesondere im Hinblick auf die Verwendung in Biosensoren, wichtig. Der pH-Wert der Probe (z.B. Schleimhautabstrich) kann ohne weitere Aufbereitung nicht variiert werden, des Weiteren können nachfolgende Assayschritte z.B. zur Signalgebung stark pH-abhängig sein. Daher ist eine Kontrolle des pH-Wertes innerhalb eines biosensorischen Systems von besonderer Bedeutung oder verlangt unter Umständen eine Robustheit der reinen Rezeptor-Analyt-Wechselwirkung gegenüber verschiedenen pH-Werten. Experimentell wurde der pH-Wert um den physiologischen Bereich (pH 7.4) zwischen pH 6.8 und pH 8.2 in Schritten von 0.2 variiert (Abbildung 16). Dies ermöglichte die Verwendung nur einer Puffersubstanz (Hepes), sodass weitere Einflüsse durch Verwendung anderer Puffersubstanzen ausgeschlossen werden konnten.



**Abbildung 16: Bindungsfähigkeit von Influenzaviren bei Variation des pH-Wertes.** Absolute SPR-Signale nach Injektion von X31-Viren verschiedener Konzentration über eine PeB-

(Abbildung links) bzw. SL6b-modifizierte Oberfläche (Abbildung rechts). Der pH-Wert wurde in Schritten von 0.2 zwischen pH 6.8 und 8.2 variiert.

In diesem Bereich zeigt sich für PeB eine deutliche Tendenz zu höheren Bindungskapazitäten bei niedrigerem pH-Wert. Bei pH 6.8 (100 µg/ml) liegt das Bindungsniveau etwa dreimal so hoch wie bei pH 8.2. Zudem stellt sich bei niedrigeren pH-Werten nahezu ein Plateau ein, sodass nicht von einer weiteren signifikanten Signalerhöhung bei weiter abfallendem pH-Wert ausgegangen werden kann. Dem gegenüber sinkt das Bindungsniveau bei steigendem pH-Wert stärker, sodass eine Unterdrückung des Signals bei höherem pH-Wert (ca. pH 9) erwartet wird. Eine vollständige Signalunterdrückung wurde im untersuchten Bereich für alle Konzentrationen nicht beobachtet. Es wird konstatiert, dass die Bindung von X31-Viren an eine PeB-modifizierte Oberfläche bei leicht saurem pH-Wert begünstigt ist.

Ein vergleichbares Verhalten wurde für die Bindung an 2,6'-Sialyllaktose beobachtet (Abbildung 16). Das Signal steigt bei sauren pH-Werten an und sank im eher basischen Milieu bis auf null ab. Gegenüber PeB ist die Toleranz verschiedener pH-Werte somit weitaus geringer ausgeprägt, das System weniger robust. Bei niedrigem pH-Wert weist die Virusoberfläche ein positives Potential auf, wodurch Bindungen an negativ geladene Liganden bzw. Oberflächen generell verstärkt werden<sup>147</sup>. Dies ist, den Ergebnissen folgend, wahrscheinlich die hauptsächliche Ursache für die beobachtete Zunahme der Signalintensitäten bei niedrigen pH-Werten, da beide Liganden netto eine negative Ladungsbilanz aufweisen (PeB (ohne Linker): -2; SL6: -1). Die beobachtete Verstärkung könnte auch durch eine stärkere unspezifische Wechselwirkung mit der negativ geladenen carboxymethylierten Dextranoberfläche des Chips verursacht worden sein, was jedoch durch die routinemäßig mitgeführte Kontrolle einer nicht-modifizierten Sensoroberfläche ausgeschlossen wird. Hier wird unabhängig vom pH-Wert kein Bindungssignal detektiert.

Aus der detaillierten Untersuchung der Abhängigkeit der PeB-Virus-Interaktion von physikalischen Faktoren geht zusammenfassend hervor, dass diese Wechselwirkung erstens entropiegetrieben abläuft und zweitens maßgeblich durch hydrophobe Interaktionen realisiert wird. Die Ergebnisse liefern Indikationen zur Verbesserung der Sensitivität eines PeB-basierten Biosensors unter optimalen Umgebungsbedingungen ( $T = 40\text{ °C}$ ,  $c_{\text{NaCl}} = 1\text{ M}$ , pH 6.8). Nach diesen, die Sensitivität betreffenden Aspekte, wird im folgenden Abschnitt die Spezifität der Peptid-Virus-Interaktion charakterisiert.

### **4.1.3 Spezifität der Peptid-Virus-Interaktion**

Die Spezifität der Peptid-Virus-Interaktion wurde durch drei grundsätzlich verschiedene experimentelle Anordnungen untersucht. Zum einen wird die virale Bindung an den natürlichen Rezeptor durch das Peptid kompetitiv inhibiert. Zusätzlich wird die Spezifität durch Vergleichsexperimente noch weiter charakterisiert. Dazu werden zwei, sich wechselseitig ergänzende, Versuche durchgeführt. Zunächst wird die Bindung an leicht modifizierte PeB-Varianten überprüft und anschließend die Bindung influenzafremder Proteine an das immobilisierte Peptid untersucht.

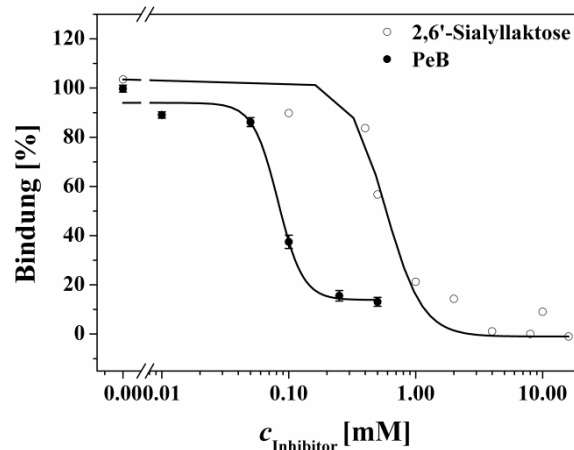
#### ***4.1.3.1 Kompetitive Inhibition der viralen Bindung***

Der Antikörper HC19 hemmt die Bindung von Hämagglutinin an seinen natürlichen Rezeptor kompetitiv durch Interaktion mit der Rezeptorbindungsstelle<sup>105,106</sup>. Aus den Ergebnissen der Molekulardynamik-Simulationen geht hervor, dass bei Bindung des Peptids PeB die dafür verantwortlichen Interaktionen intakt bleiben. Sie wirken daher vergleichbar zur Situation im Fab-Fragment des Antikörpers inhibierend. Die kompetitive Inhibition wird nun mittels weiterer SPR-Experimente untersucht, bei denen der natürliche Rezeptor des HAS durch immobilisierte biotinylierte 2,6'-Sialyllaktose sowie Fetuin imitiert wird<sup>141</sup>. Dies stellt zusätzlich eine Spezifitätskontrolle dar, da nur bei Interaktion mit dem HA und dort nur mit der Rezeptorbindungsstelle ein inhibierender Effekt erwartet werden kann.

Für beide Liganden wird ein konzentrationsabhängiges Inhibitionsverhalten für PeB, nicht jedoch für PeA beobachtet. Für PeA ist dies eine weitere Bestätigung, sowohl der vorangegangenen Bindungsexperimente, als auch der Molekulardynamik-Simulation. Bei beiden Methoden ist keine Wechselwirkung mit dem viralen Hämagglutinin festzustellen.



Die Bindung an 2,6'-Sialyllaktose wird mittels PeB um bis zu 85% bei der höchsten eingesetzten Konzentration (500  $\mu\text{M}$ ) gehemmt (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Kompetitive Inhibition der Bindung von X31-Viren.** Inhibition der Bindung von X31-Viren an eine 2,6'-Sialyllaktose modifizierte Oberfläche durch die Sialyllaktose selbst sowie das Peptid PeB.

Eine vollständige Inhibition mittels gelöster 2,6'-Sialyllaktose (SL6) selbst, wird ab 4 mM beobachtet. Aus den sigmoidalen Fits der Inhibitionskurven ergeben sich  $IC_{50}$ -Werte von 115  $\mu\text{M}$  für PeB bzw. 1175  $\mu\text{M}$  für 2,6'-Sialyllaktose (Tabelle 8). Der  $IC_{50}$  ist genau so hoch wie in der Literatur für die Anbindung von X31 BHA-Rosetten (mittels Bromelain vom Virus abgespaltenes HA bildet in Lösung Rosetten aus 6-10 HA-Trimeren) an immobilisiertes Fetuin beschrieben ( $IC_{50} = 1.2 \text{ mM}$ )<sup>141</sup>. Dies reflektiert die niedrige Dissoziationskonstante der 2,6'-Sialyllaktose von  $2 \text{ mM}$ <sup>148</sup>. Je nach verwendetem Testsystem werden auch noch höhere  $IC_{50}$ -Werte beschrieben, z.B. bis zu  $7.9 \text{ mM}$ <sup>149</sup> für die Inhibition in Zellexperimenten.

Fetuin ist ein Glykoprotein, welches sowohl 2,3'- als auch 2,6'-verknüpfte Sialinsäurederivate auf der Oberfläche trägt<sup>141</sup>. Daher weist Fetuin eine breite Spezifität gegen HA verschiedener aviärer und humaner Influenzaviren auf. Die Bindung von X31-Viren an Fetuin wird mittels PeB um bis zu 70% reduziert, mittels SL6 ist eine vollständige Bindungsinhibition möglich ( $IC_{50}$ -Werte: PeB 89  $\mu\text{M}$ , SL6 2730  $\mu\text{M}$ ). Die unvollständige Inhibition mittels PeB reflektiert möglicherweise das duale Bindevverhalten der X31-Viren an die zwei Sialinsäurederivate. Ursprünglich handelt es sich hierbei um humane Viren, die allerdings für die Aufzucht in bebrüteten Hühnereiern genetisch modifiziert wurden. Demnach weisen sie sowohl eine Affinität zu humanen als auch aviären Rezeptoren auf,

weshalb beide Sialinsäurederivate auf der Fetuinoberfläche gebunden werden. Zusätzlich handelt es sich auf der Fetuinoberfläche um mehrfach verzweigte Zucker<sup>150,151</sup>, welche einen höheren Grad an molekularer Multivalenz zu den gebundenen Viren und damit eine stärkere Avidität im Vergleich zur immobilisierten Sialyllaktose ermöglichen (siehe 2.1.2). Aufgrund der beschriebenen Spezifitäten binden X31-Viren nur schwach an 2,3'-Sialyllaktose (SL3). Dies wird auch aus den Inhibitionsexperimenten mit SL3 deutlich, in denen eine Kompetition an SL6b und Fetuin im untersuchten Konzentration bis 10 mM nicht vollständig erreicht wird.

**Tabelle 8: Kompetitive Inhibition der Bindung von X31-Viren an immobilisierte Peptidliganden.** Es sind die  $IC_{50}$ -Werte in  $\mu\text{M}$  dargestellt (Mittelwerte einer Doppelbestimmung), die aus sigmoidalen Fits (logistisch, 4-Parameter) der entsprechenden Inhibitionskurven erhalten wurden.

Inhibitor	Ligand		
	SL3b	SL6b	Fetuin
SL3	750	(3500)	(3500)
SL6	385	1175	2730
PeB	111	115	89

In Klammern: Fits aus unvollständigen Datensätzen (kein Plateau bei maximaler eingesetzter Inhibitorkonzentration).

Eine kompetitive Inhibition liegt vor, wenn das inverse Experiment mit immobilisiertem Peptid und unter Verwendung des natürlichen Rezeptormoleküls (hier: 2,6'-Sialyllaktose) als Inhibitor ebenfalls zur Unterdrückung der Virusbindung an den Liganden führt. Hierbei wird eine maximale Inhibition von 40% bei einer Sialyllaktose-Konzentration von 5 mM erreicht. Die unvollständige Inhibition hat vermutlich zwei Gründe: Zum einen ist die absolute Affinität der Sialyllaktose geringer als die des Peptids, zum anderen ist bekannt, dass der Grad der Inhibition vom Virusstamm abhängen kann<sup>152</sup>. Daher werden viel höhere Sialyllaktose-Konzentrationen benötigt, um die Bindung an das immobilisierte Peptid vollständig zu inhibieren, als im umgekehrten Fall. Die beobachtete Inhibition von 2,6'-Sialyllaktose kann unter Berücksichtigung dieser Effekte und vor allem gegenüber der Kontrolle mit 2,3'-Sialyllaktose, welche keine Inhibition zeigte, somit ebenfalls als spezifisch angesehen werden.

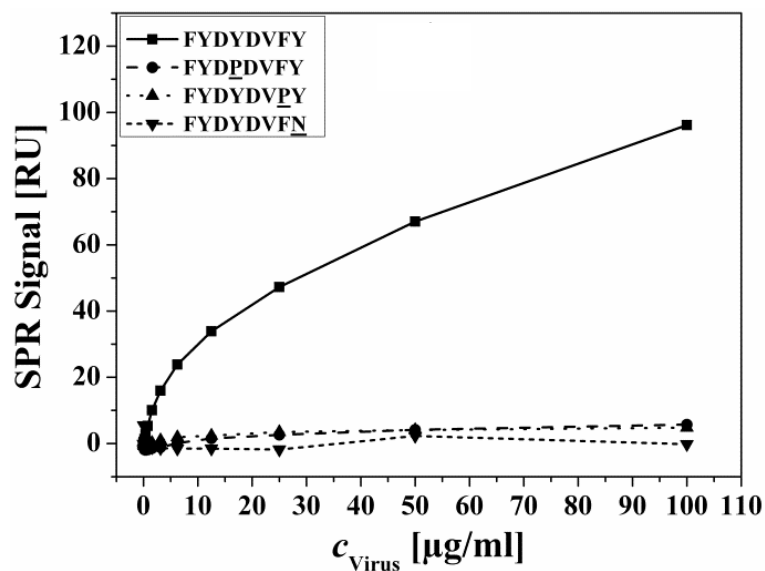
Die beobachtete inhibitorische Wirkung des Peptids PeB auf die Virusbindung stellt einen Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Wirkstoffes dar. Das Peptid PeB fungiert in diesem Fall als sogenannter Zugangsblocker (*entry-blocker*). Es verhindert die Interaktion des

Influenzaviruses mit den Rezeptoren der Epithelzellen und blockiert damit möglicherweise die Aufnahme des Virus in die Zelle. Nähere Untersuchungen zum inhibitorischen Verhalten des Peptids PeB *in vitro* werden in Abschnitt 4.4 („PeB und seine Varianten als potentielle Wirkstoffe“) dargestellt.

Die Peptide PeB und PeC binden nach Immobilisierung Influenzaviren des Stammes X31, wobei PeB zusätzlich eine kompetitive Inhibition des Virus gegenüber dessen natürlichen Rezeptor zeigt. Das Peptid PeA aus CDR1 zeigt in allen Experimenten keinerlei Wechselwirkung mit viralem HA. Die beobachtete kompetitive Inhibition ist bereits eine starke Indikation für eine spezifische Wechselwirkung, da dadurch reine Oberflächen- und Assayeffekte (z.B. unspezifische Wechselwirkung mit dem Chip, systematische Fehler durch Verdünnungseffekte) ausgeschlossen werden.

#### 4.1.3.2 Ligandspezifität

Zur weiteren vergleichenden Untersuchung wird die Bindung von X31-Viren an verschieden substituierte PeB-Varianten getestet (Abbildung 18). Dazu wurden die Aminosäuren Y4, F7 sowie Y8, welche den MD-Simulationen folgend attraktiv zur Bindung beitragen (siehe 4.1.1), substituiert.



**Abbildung 18: Ligandspezifität.** Konzentrationsabhängige Bindungssignale (SPR) von X31 an verschiedene Varianten des Peptids PeB.

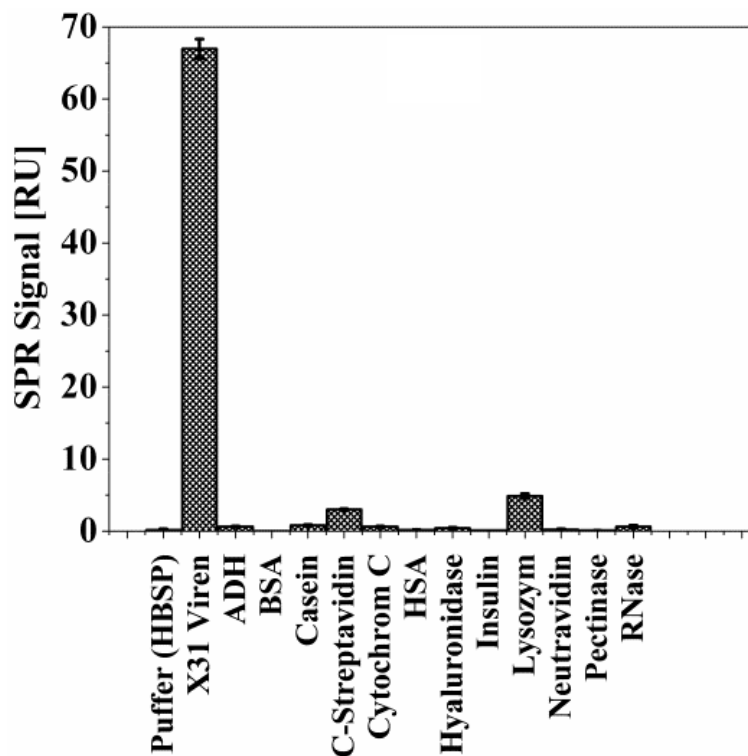
Wie ersichtlich wird, zeigt der Virus im Bereich bis 100  $\mu\text{g/ml}$  keinerlei Bindung an verschiedene Peptidvarianten. Der Austausch der Aminosäuren Y4 zu P sowie F7 zu P und

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Y8 zu N bewirken den vollständigen Verlust der Bindungsfähigkeit gegenüber X31 Viren. Daher können unspezifische Effekte, beispielsweise durch elektrostatische Wechselwirkungen, ausgeschlossen werden. Keine der vorgenommenen Substitutionen verändert die Gesamtladung des Liganden -2 (ohne Berücksichtigung des Linkers). Dies ist insbesondere deshalb wichtig, weil der verwendete Oligolysin-Linker zur Immobilisierung der Peptide vier positive Ladungen trägt.

### 4.1.3.3 Analytspezifität

Die Spezifität gegenüber verschiedenen Analyten wurde zunächst im Vergleich zu einer divergenten Peptidbibliothek getestet (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Analytspezifität.** Bindung verschiedener Proteine an einen PeB-modifizierten Sensorchip im Vergleich zur Bindung von X31 bei einer einheitlichen Massenkonzentration von 10 µg/ml.

Es wurden Proteine verschiedener Molekulargewichte, Ladung und Funktion verwendet, um eine große Diversität allgemeiner Proteineigenschaften zu berücksichtigen (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Physikalische Eigenschaften der zum Spezifitätstest verwendeten Proteine.**

	$M_w$ [kDa]	pI
Alkoholdehydrogenase (ADH)	150	5.6
Rinderserumalbumin (BSA)	66	4.7
Casein	25	5.0
C-Streptavidin	12	5.1
Cytochrom C	12	10.0
humanes Serumalbumin (HSA)	66	4.7
Hyaluronidase	55	5.4
Insulin	5.7	5.3
Lysozym	14.4	10
Neutravidin	60	6.3
Pektinase	40	7.9
RNase A	13.7	9.6

Außer für die Proteine C-Streptavidin sowie Lysozym ist keine signifikante Bindung detektierbar. Für diese beiden Proteine beträgt das unspezifische Signal 4.5% bzw. 7.2%. Diese unspezifischen Effekte sind gering, müssen bei Verwendung in einem Biosensor allerdings berücksichtigt werden. Insbesondere der Einfluss von Lysozym muss bedacht werden, da bei einer Probennahme aus Speichel mit hohen Konzentrationen dieses Enzyms (30-100  $\mu\text{g/ml}$ ) gerechnet werden muss<sup>153</sup>. Weitere systematische unspezifische Wechselwirkungen mit bestimmten Proteingruppen sind nicht festzustellen.

Aus allen drei Experimenten zur Charakterisierung der Spezifität der PeB-X31-Interaktion geht hervor, dass die Interaktion spezifisch verläuft und auf der Bindung des Peptids an die Rezeptorbindungsstelle des HA im Influenzavirus beruht. Für eine weitere Optimierung hinsichtlich der Sensitivität des Peptids PeB wurde es mittels verschiedener Kopplungsmethoden auf unterschiedlichen Oberflächen immobilisiert.

#### 4.1.4 Einfluss der Peptidimmobilisation auf die Detektion von Influenzaviren

Die Funktionalität von Liganden im Allgemeinen und Peptiden im Speziellen hängt maßgeblich von der Art und Weise ihrer Immobilisierung am zugrundeliegenden Trägermaterial ab. Daher wird die Peptid-Virus-Interaktion in Abhängigkeit von der Kopplungsstrategie nun genauer untersucht. Zur Immobilisierung existieren Methoden zur kovalenten und nicht-kovalenten Kopplung, welche sich jeweils weiter in gerichtete und ungerichtete Verfahren unterteilen (siehe 2.1.3 „Funktionelle Präsentation peptidischer Binder“). Für Peptide ist die kovalente und gerichtete Immobilisierung am effektivsten. Ebenso kann die Orientierung der Peptide (N-/C-terminale Kopplung) auf der Oberfläche für eine erfolgreiche Analytdetektion entscheidend sein.

#### 4.1.4.1 Variation der Kopplungsstrategien

Die Bindefähigkeit des Peptids PeB wurde zunächst auf unterschiedlichen Oberflächen und mit variierenden Linkerstrukturen untersucht, um eine möglichst sensitive Nachweisreaktion zu ermöglichen und die Funktionalität des peptidischen Bindersystems auf verschiedenen Oberflächenmodifikationen zu untersuchen (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Einfluss der Peptidimmobilisierung auf die Influenzadetektion.**

Nr.	N-terminale Modifikation	Peptid	C-terminale Modifikation	Oberflächenmodifikation	Kopplungsreaktion	LOD X31 [ng/ml]
1	-	PeB	Amid	CMD <sup>a</sup>	Aminkopplung	3130
2	KKKK	PeB	Amid	CMD	Aminkopplung	190
3	C	PeB	Amid	CMD	Thiolkopplung <sup>b</sup>	k.B.
4	KKKK	PeB(kurz)	Amid	CMD 3D-Epoxy	Aminkopplung Aminkopplung	98.0 4060
5	Biotin-Ttds <sup>c</sup>	PeB(kurz)	Amid	Neutravidin	-	k.B.
6	-	PeB(kurz)	EDA <sup>d</sup> -Biotin	Neutravidin	-	k.B.
7	HHH	PeB(kurz)	Amid	3D-Epoxy	Aminkopplung/ Thiolkopplung	10000
8	C-KK	PeB(kurz)	Amid	3D-Epoxy <i>p</i> -MP	Aminkopplung Michael-Addition	10000 123
10	KKKK-C	PeB(kurz)	C (zyklisiert)	CMD	Aminkopplung	k.B.

<sup>a</sup>CMD - carboxymethyliertes Dextran, <sup>b</sup>PDEA-vermittelt; <sup>c</sup>Ttds - 13-amino-4,7,10-trioxa-tridekanamin-succiniminsäure; <sup>d</sup>EDA - Ethandiamin; k.B. - keine Bindung; PeB - ARDFYDYDFVYYAMD; PeB(kurz) - FYDYDFVY

Die Funktionalität des Peptids PeB hängt stark von dessen Präsentation auf der Oberfläche und dem verwendeten Linkermolekül ab. Die Immobilisierungsmethoden, die auf einer Kopplung über N-terminale primäre oder sekundäre Amine beruhen, ermöglichen allesamt die Virusdetektion. Kopplungen über die freie Thiolgruppe eines Cysteins ermöglichen in einigen Fällen die Influenzadetektion. Die Immobilisierung der Peptide über einen Biotin-Linker (N-/C-terminal) und anschließender nichtkovalenter Kopplung des Peptids an Neutravidin führt zum vollständigen Funktionsverlust und ist damit für das untersuchte Bindungssystem ungeeignet. Dies kann einerseits sterische Gründe haben. Wichtige Motive der Peptidsequenz könnten durch die Immobilisierung in der Bindungstasche des Neutravidins vergraben werden, obwohl hier zusätzlich ein C16-Spacer (Ttds) zwischen erster AS und Biotin eingefügt wurde. Andererseits wurde eine direkte Interaktion des Peptids mit Neutravidin im Spezifitätstest nicht beobachtet. Dennoch können schwache Interaktionen mit Neutravidin nicht ausgeschlossen werden, da diese nun durch die Fixierung des Peptids in der Bindungstasche entropisch begünstigt wären.

Zusätzlich ergeben sich quantitative Variationen. Die direkte Bindung des Volllängenpeptids 1 über seinen freien N-Terminus am Alanin führt zu einer hohen Nachweisgrenze von 3130 ng/ml. Bei Verwendung eines Oligolysin-Linkers (Peptid 2) kann

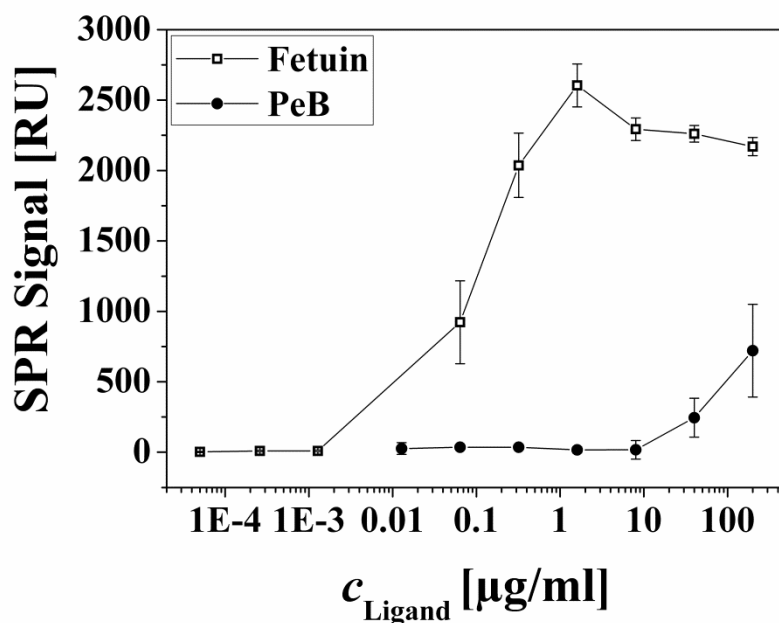
eine um den Faktor 16 niedrigere Nachweisgrenze (190 ng/ml) erzielt werden. Die Funktionalität der derartig gekoppelten PeB-Variante geht auch bei Minimierung der Aminosäuresequenz auf die acht zentralen Aminosäuren (FYDYDVFY) nicht verloren, was bereits in den vorangegangenen Charakterisierungen gezeigt werden konnte. Die Varianten 2 und 4 erweisen sich somit als besonders potente Liganden. Bei Modifikation des 8-meren Peptids mittels dreier Histidine, beziehungsweise eines CKK-Linkers, wird ebenso eine Virusdetektion auf Epoxidoberflächen ermöglicht, allerdings mit höheren Nachweisgrenzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Oberflächenmodifikationen für die SPR-Analytik charakterisiert (siehe Anhang IV). Eine der Modifikationen ist die *para*-Maleimidophenyl-Funktionalisierung, welche universell auf verschiedensten Metallen angewendet werden kann und optische und elektrochemische Auslesemethoden ermöglicht. Auf dieser Oberfläche wurde das Peptid mittels N-terminalem Cystein immobilisiert. Es wird eine Nachweisgrenze von 123 ng/ml beobachtet. Diese liegt ebenso wie auf kommerziellen SPR-Chips im diagnostisch relevanten Bereich (20-100 ng/ml).

Eine Untersuchung des 8-meren Peptids bei Immobilisierung nur über seinen freien N-Terminus konnte nicht durchgeführt werden, da das Peptid für wässrige Kopplungsmethoden eine zu starke Hydrophobizität (+8.46 kcal/mol) aufweist.

### **4.1.4.2 Variation der Ligandendichte**

Bei der Interaktion oberflächengebundener Liganden mit Analyten mit mehreren Bindungsstellen sind multivalente Bindungseffekte zu erwarten (siehe 2.1.2 „Wechselwirkungen bindender Peptide“). Da die Anzahl der Bindungsstellen im Virus nicht definiert variiert werden kann, wurde die Ligandendichte durch Verwendung unterschiedlicher Ligandkonzentrationen zur Immobilisierung variiert. Dies führt zu unterschiedlichen mittleren Abständen der Liganden, welche wiederum der Stärke der multivalenten Interaktion maßgeblich beeinflussen kann. Die Experimente wurden am Biacore FlexChip durchgeführt, welches die parallele Detektion der Analytbindung an bis zu 400 Spots mit immobilisiertem Ligand und damit die Untersuchung vieler verschiedener Ligandendichten ermöglicht. Dazu werden die Liganden zunächst im Microarray-Format immobilisiert und nach Einlegen der Chips ins SPR-Gerät anschließend die Virusbindung detektiert (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Einfluss der Ligandendichte von Fetuin und PeB auf die Detektion von X31-Viren.** Die Liganden wurden unter Verwendung verschiedener Massenkonzentrationen (1:5 Verdünnung ab 200  $\mu\text{g/ml}$ , x-Achse) im Spotformat auf Epoxid-beschichteten Goldchips immobilisiert. Anschließend wurde die Virusbindung bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  mittels SPR (Biacore FlexChip) detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von je vier Spots sowie die Standardabweichung.

Die Bindung an das Glykoprotein Fetuin ist ab einer Konzentration von 64 ng/ml detektierbar. Anschließend steigt das Signal bis 1.6  $\mu\text{g/ml}$  an und geht danach in Sättigung über, da ab dieser Konzentration die Oberfläche vollständig mit Fetuin beladen ist. Es ergibt sich ein gering ausgeprägtes Signalmaximum bei 1.6  $\mu\text{g/ml}$  (2600 RU zu 2400 RU bei 8  $\mu\text{g/ml}$ ), welches für eine multivalente Interaktion zu erwarten wäre. Bei Einsatz geringerer Fetuinkonzentrationen und damit geringerer Ligandendichte stehen nicht genügend Rezeptormoleküle für eine hochaffine Bindung der Viren zur Verfügung. Bei höherer Ligandendichte führen sterische Interferenzen wiederum zu geringeren Bindungssignalen.

Dieser Kurvenverlauf konnte für das Peptid PeB nicht beobachtet werden. Im untersuchten Konzentrationsbereich ergibt sich ab 40  $\mu\text{g/ml}$  PeB ein linearer Signalanstieg. Generell sind höhere Konzentrationen als beim Fetuin nötig, um überhaupt ein Virussignal zu generieren. Dies kann einerseits durch eine geringere Kopplungseffizienz der Peptide gegenüber dem Protein, den geringeren Grad an molekularer Multivalenz (Fetuin besitzt acht potentielle Bindestellen pro Protein) sowie eine geringere spezifische Aktivität der Peptide durch Wechselwirkung mit der Oberfläche begründet werden. Es ist kein ausgeprägtes Signalmaximum und auch noch keine Sättigung erreicht, obwohl in Vergleichsexperimenten



unter ähnlichen Immobilisationsbedingungen eine maximale Oberflächenbeladung mit Peptid beobachtet wurde.

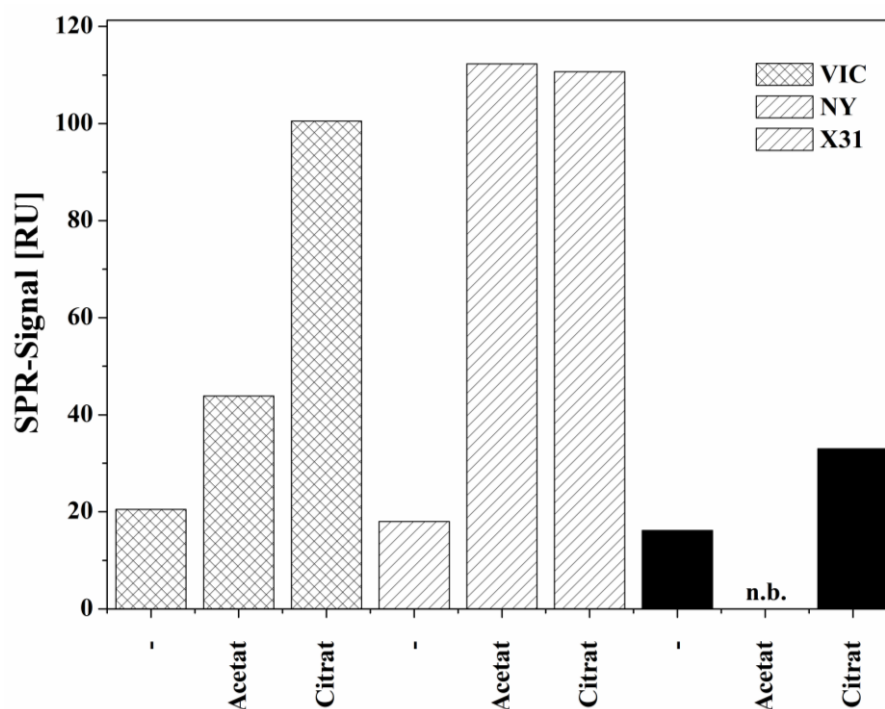
Insgesamt sind die Ligandendichte-Effekte oberhalb eines ligandabhängigen Schwellwertes bei beiden Rezeptoren für einen sensitiven Virusnachweis unkritisch. Eine hohe Oberflächenbeladung ist für die Signalgebung wünschenswert. Eine Überbeladung der Oberfläche, welche durch sterische Effekte zu stark verminderter Sensitivität führen könnte, wird nicht beobachtet.

### **4.1.5 Einfluss des säureinduzierten Konformationswechsels auf die Peptid-Virus-Interaktion**

Das Hämagglutinin des Influenzavirus durchläuft einen säureinduzierten Konformationswechsel bei Unterschreiten von pH 6 (siehe 2.2.2 „Das Oberflächenprotein Hämagglutinin“).

Das Peptid PeB interagiert den experimentellen Bindungsstudien folgend direkt mit dem Sialinsäure-bindenden Bereich im HA, welcher ein Strukturepitop darstellt. Es wird vermutet, dass die Peptid-Virus-Interaktion daher auch von der räumlichen Anordnung der Aminosäuren im HA-Molekül abhängt. Die räumliche Anordnung der einzelnen Segmente der RBS wird durch den säureinduzierten Konformationswechsel verändert, weshalb der Einfluss dieser Änderung auf die Bindung zum Peptid PeB nun näher untersucht werden soll.

Die SPR-basierten Bindungsstudien zum Einfluss des Konformationswechsels wurden mit nativem HA aus den Impfstoffpräparationen VIC (A/Victoria/210/2009) und NY (A/NewYork/55/2004, H3N2) sowie intakten X31-Viren (A/Aichi/2/1968, H3N2) durchgeführt (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Einfluss des pH-induzierten Konformationswechsels im HA auf die Bindung an PeB.** Das Virusmaterial der H3N2-Stämme VIC (A/Victoria/210/2008), NY (A/NewYork/55/2004) und X31 (A/Aichi/2/1968) wurde entweder nicht (-), mit Essigsäure (Acetat) bzw. Zitronensäure (Citrat) behandelt. Dargestellt sind die absoluten SPR-Signale (Mittelwerte einer Doppelbestimmung) nach Injektion von 30 µg/ml Analytlösung über eine PeB-modifizierte Sensoroberfläche.

Für alle untersuchten Influenzastämme wird eine Verstärkung des Bindungssignals nach Auslösen des Konformationswechsels beobachtet. Dies geschah weitestgehend unabhängig von der Methode zur Induzierung des Konformationswechsels. Besonders große Verstärkungen um den Faktor 5-6 wurden für VIC und NY bei Behandlung mit Zitronensäure beobachtet. Auch das Messsignal des Influenzavirus vom Stamm X31 steigt um den Faktor 2 bei Behandlung mittels Zitronensäure.

Das „Aufklappen“ des HA führt vermutlich zu einer stärkeren Exposition der Sialinsäurebinderegion und zu einer Abflachung des Bereiches an der Spitze der distalen HA-Domäne<sup>154</sup> und damit möglicherweise zu einer besseren Zugänglichkeit. Eine vorherige Säurebehandlung von Viren könnte in einem biosensorischen Test diesen Ergebnissen folgend zu einer weiteren Sensitivitätssteigerung führen.

### 4.1.6 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von PeB mittels zirkularem Dichroismus

Im Antikörper bilden die Aminosäuren des Peptids PeB (ARDFYDYDVFYYAMD) eine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die terminalen Aminosäuren ARDFY bzw. YAMD bilden jeweils  $\beta$ -Stränge und werden durch die Schleifenregion bestehend aus den dazwischen

liegenden Aminosäuren DYDVFY verbunden<sup>106</sup>. Der Erhalt dieser Struktur bei Bindung der abgeleiteten Peptide an das HA ist auch bei der MD-Simulation evident (siehe 4.1.1 „Molekulardynamik-Simulation“).

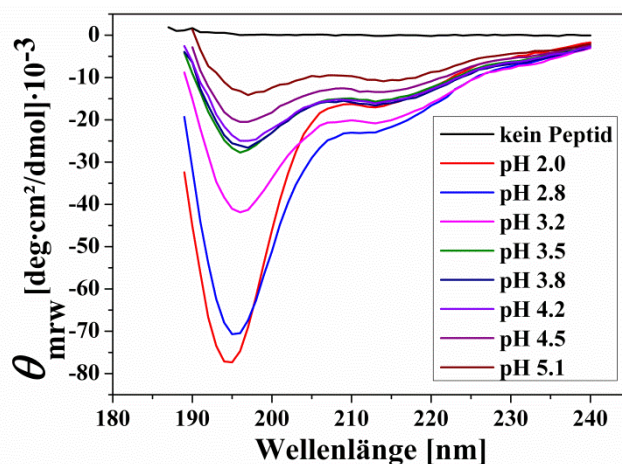
Nachdem die Bindungsfähigkeit der Peptide analog der Voraussagen der MD-Simulation bestätigt werden konnte, soll nun die Sekundärstruktur des Peptids in Lösung näher mittels zirkularem Dichroismus (CD) untersucht werden. Einerseits dient dies der Überprüfung der Vorhersagen aus der MD-Simulation, andererseits können über Strukturanalysen auch weitere Kenntnisse über die grundlegende Art der Interaktion zwischen Peptid und HA (z.B. Beteiligung einzelner Aminosäuren) gewonnen werden. Bei der CD-Spektroskopie werden in Abhängigkeit von der Wellenlänge Elliptizitätsspektren erhalten. Diese können iterativ mit Spektren bekannter Sekundärstrukturen abgeglichen werden, um so strukturelle Ähnlichkeiten festzustellen.

Zunächst wurde das CD-Spektrum des Peptids in PBS-Puffer (pH 7.4) aufgenommen. Unter diesen Bedingungen wird ein „Nullspektrum“ ohne ausgeprägte Minima oder Maxima erhalten. Ein derartiges Verhalten ist untypisch, da auch ein „random coil“, also eine ungeordnete Proteinstruktur ein signifikantes CD-Spektrum aufweist<sup>155</sup>. Möglicherweise liegt das Peptid in mehreren Strukturvarianten vor, welche verschiedene CD-Spektren ergeben und sich in der sichtbaren Überlagerungen wechselseitig aufheben. Auch eine vollständige Aggregation des Peptids könnte ein solches Spektrum verursachen. Dies wurde durch begleitende Lichtstreuungs-Experimente (Dynamic Light Scattering, DLS) ausgeschlossen, da keine Partikel größer 1.5 nm beobachtet wurden.

Weitergehend wurde die Änderung des CD-Spektrums in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und des pH-Wertes untersucht. Bei Änderung der Salzkonzentration zwischen 0 und 500 mM NaCl ergibt sich keine Änderung des CD-Spektrums, sie beeinflusst die Sekundärstruktur des Peptids nicht.

Bei Variation des pH-Wertes um den isoelektrischen Punkt des Peptids (pI = 3.9) kann jedoch ein definiertes Spektrum beobachtet werden (Abbildung 22).

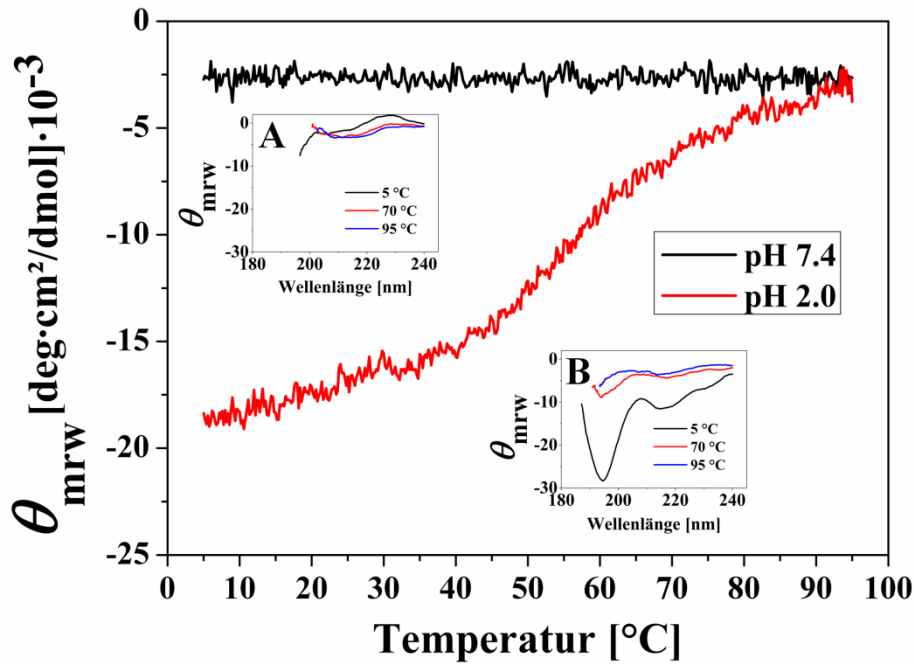
## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 22: CD-Spektren des Peptids PeB.** Das Peptid wurde zu 100  $\mu\text{g/ml}$  in wässrigen Acetat-Puffern (10 mM) verschiedener pH-Werte gelöst, die Spektren wurden bei einer konstanten Temperatur von 20  $^{\circ}\text{C}$  aufgenommen. Bei niedrigen pH-Werten sind Minima bei 212 nm und 195 nm zu beobachten.

Es zeigen sich zwei ausgeprägte Minima unterhalb von pH 5, bei 212 nm und 195 nm. Die Intensität der Minima steigt mit sinkendem pH-Wert. So verringert sich die Elliptizität bei 212 nm von -10 auf  $-20 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot 10^{-3}$ , bei 192 nm sinkt sie von -15 auf  $-75 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot 10^{-3}$ . Dies bedeutet, dass bei sinkendem pH-Wert eine zunehmende Anzahl an Peptiden in einer definierten Sekundärstruktur vorliegt. Eine Übereinstimmung des beobachteten Kurvenverlaufs mit bekannten Spektren konnte nicht festgestellt werden<sup>155</sup>. Trotz sorgfältiger Recherche konnte weiterhin keine Quelle gefunden werden, in welcher schon einmal derart stark negative Elliptizitäten beobachtet wurden.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde außerdem eine Schmelzkurve des Peptids bei pH 7.4 (in PBS) und bei pH 2 (in Acetat-Puffer) aufgenommen (Abbildung 23).



**Abbildung 23: CD-Schmelzkurven des Peptids PeB.** Ausgehend von 5 °C wurde die Temperatur in Schritten von 0.2 K bis auf 95 °C erhöht. Es wurde kontinuierlich die Elliptizität bei 206 nm (pH 7.4) bzw. 200 nm (pH 2.0) gemessen. Zusätzlich wurden bei 5 °C, 70 °C und 95 °C vollständige CD-Spektren aufgenommen (Insets, A - pH 7.4, B - pH 2.0), um alle Signaländerungen zu erfassen.

Bei pH 7.4 wird keine Änderung des Spektrums beobachtet, daher kann eine definierte Sekundärstruktur des Peptids bei diesem pH-Wert ausgeschlossen werden. Bei pH 2.0 zeigt sich eine typische Schmelzkurve mit einer Übergangstemperatur  $T_M$  von ca. 59 °C. Hier wird die Sekundärstruktur des Peptids durch Erhitzen aufgelöst. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten bei Vorhandensein einer peptidischen Sekundärstruktur, welche typischerweise eine Schmelztemperatur zwischen 40 °C und 70 °C aufweist<sup>156</sup>.

Die tatsächliche Sekundärstruktur des Peptids, welche das beobachtete Spektrum hervorruft, bleibt somit unklar. Sicher scheint, dass das Peptid auch bei niedrigem pH-Wert keine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur ausbildet (vgl. 4.1.1 „Molekulardynamik-Simulation“). Jedoch könnte es sich bei der Peptid-Virus-Bindung um eine Interaktion mittels induced fit handeln, bei dem eine Sekundärstruktur erst durch die Bindung des Peptids an das Protein hervorgerufen wird<sup>157</sup>. Weiterhin sind die Bindungsexperimente und die CD-Messungen nicht vollständig vergleichbar, da aufgrund der methodenbedingten Anforderungen unterschiedliche Puffersubstanzen (PBS - Acetat - Hepes) verwendet wurden.

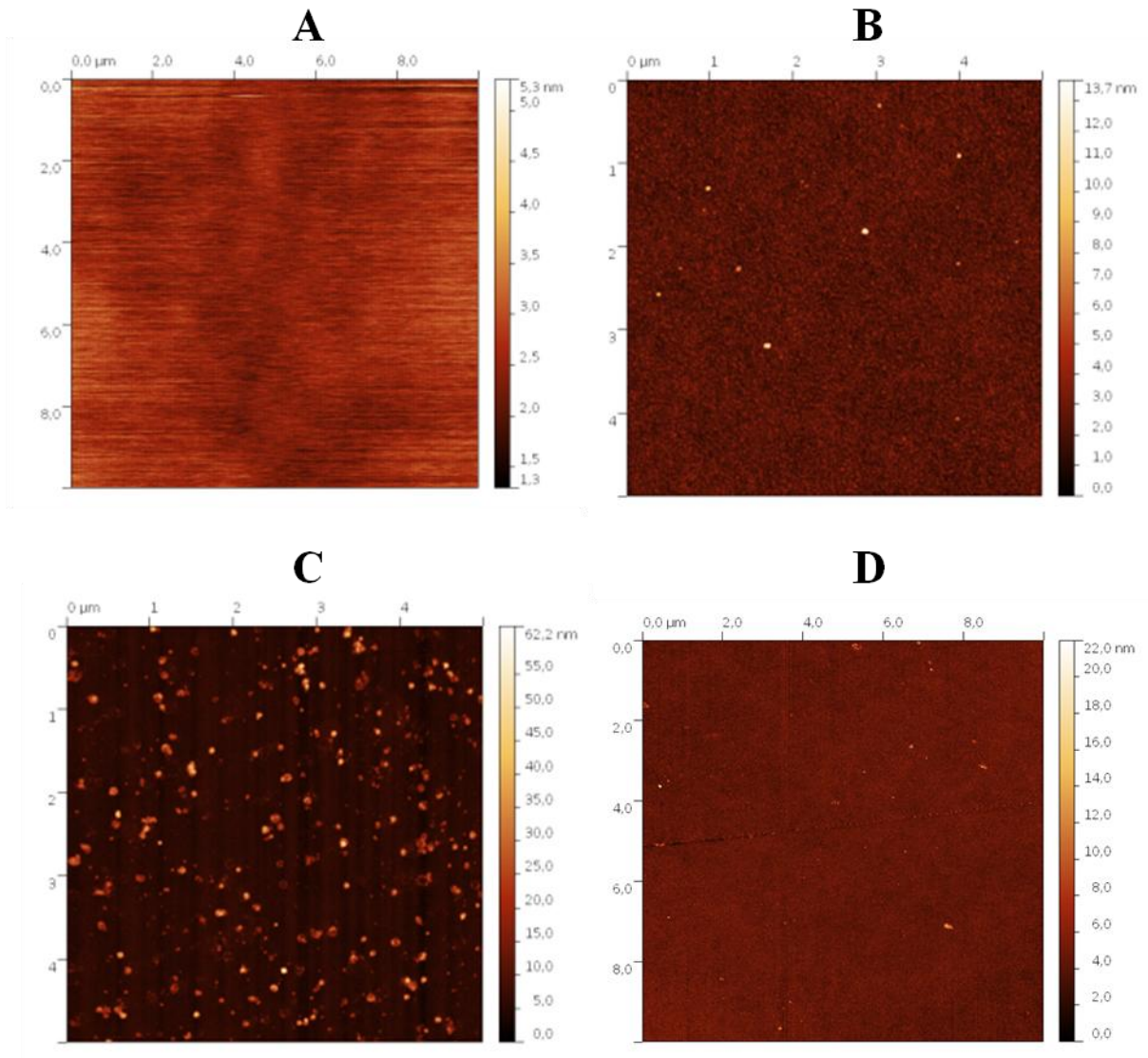
## 4 Ergebnisse und Diskussion

Eine weitere Aufklärung könnte durch weitere Untersuchungen, z.B. mittels zweidimensionaler Kernmagnetresonanzspektrometrie (2D-NMR) oder Kristallstrukturanalyse erfolgen. Hierbei wäre insbesondere ein Vergleich der Sekundärstruktur vor und nach Bindung des Peptids an Hämagglutinin interessant, um weitere Aufschlüsse über die Art der Wechselwirkung zu erhalten und insbesondere den Kontakt einzelner AS sichtbar zu machen.

### 4.1.7 Charakterisierung gebundener Viren mittels AFM

In den bisherigen Experimenten konnte die Bindung der Influenzaviren an verschiedene Oberflächen mittels spektroskopischer Methoden gezeigt werden. Zur Ergänzung dieser Ergebnisse wurden nun rasterkraftmikroskopische Untersuchungen (*atomic force microscopy*, AFM) durchgeführt. Diese ermöglichen eine mikroskopische Überprüfung der Anlagerung der Viruspartikel und können zusätzliche Informationen über die Morphologie der gebundenen Viren an der Sensoroberfläche liefern. Zur Durchführung der Experimente wurde analog zu den SPR-Experimenten zunächst das Peptid PeB auf einem carboxymethylierten Dextranchip immobilisiert. Anschließend wurde mit Virus inkubiert und mehrfach gewaschen. Die AFM-Untersuchung erfolgte im Tapping-Modus, bei dem nur kurzzeitiger Kontakt der Mikroskopspitze mit der Chipoberfläche besteht. Diese Methode ermöglicht eine schonende Behandlung der weichen Polymer- und Virenoberfläche bei hinreichender lateraler Auflösung.

Die Veränderung der Chipoberfläche bei jedem Immobilisierungsschritt und nach Virusanbindung konnte mittels AFM verfolgt werden (Abbildung 24).



**Abbildung 24: AFM-Aufnahmen: Falschfarbendarstellung der Oberflächentopographie.**  
 A: un behandelter carboxymethylierter Dextranchip (10x10 µm); B: Chipoberfläche nach Immobilisierung des Peptids PeB (5x5 µm); C: dieselbe Chipoberfläche nach Inkubation mit Influenzaviren und anschließendem Waschen (5x5 µm); D: unmodifizierte Chipoberfläche nach Virusinkubation (10x10 µm).

Die reine Chipoberfläche (mit carboxymethyliertem Dextran) ist vollkommen homogen und weist eine mittlere Oberflächenrauigkeit  $R_a$  von  $0.36 \pm 0.03$  nm ( $n = 5$ ) auf. Nach Immobilisierung des Peptids steigt die Rauigkeit leicht auf  $0.44 \pm 0.06$  nm ( $n = 5$ ) und es sind vereinzelte Körner erkennbar. Diese stammen mutmaßlich von Verunreinigungen aus den verwendeten Immobilisierungsreagenzien. Nach Virusanbindung ist eine Vielzahl verschiedenartiger Partikel sichtbar, die der Anbindung der Viren zuzuordnen sind. Wurde die Oberfläche nicht mit Peptid modifiziert, gleicht die Oberfläche einem unmodifizierten Chip. Dies bestätigt die spezifische Interaktion der Viren mit dem immobilisierten Peptid PeB.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die gebundenen Partikel (Abbildung 24C) sind sehr heterogen (Tabelle 11) und stark separiert. Die Chipoberfläche ist unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht vollständig belegt.

**Tabelle 11: Klassifizierung mittels AFM detektierter Partikel auf einer PeB-modifizierten Chipoberfläche.** Die Einteilung der Kategorien wurde nach Sichtung mehrerer AFM-Bilder vorgenommen und stellt nur eine grobe Beschreibung aller sichtbaren Veränderungen der Chipoberfläche nach Inkubation mit Influenzaviren dar. Die Auswertung der Partikeldurchmesser und -höhe erfolgte durch Erstellung der zugehörigen Höhenprofile.

	<b>d [nm]</b>	<b>h<sub>max</sub> [nm]</b>
virusähnliche Partikel (n=27)	112 ± 16	36 ± 5
flache Partikel	~150	~20
offene Ringe	~150	<10
kleine Partikel	~50	~15

Alle Partikel weisen einen Durchmesser von <200 nm auf, größere Aggregate werden nur sehr selten beobachtet. Eine Vielzahl der beobachteten Partikel wird als virusähnlich klassifiziert, da der Durchmesser sowie die Partikelhöhe mit den Erwartungen für intakte Influenzaviren übereinstimmen. Der gemittelte Durchmesser von 112 nm stimmt sehr gut mit literaturbekannten Daten überein und liegt in der für Influenzaviren typischen Größenordnung (siehe 2.2 „Das Influenzavirus als diagnostisches Zielmolekül“). Die Höhe der virusähnlichen Partikel liegt bei 36 nm. Es handelt sich also nicht um vollständige kugelförmige, sondern scheibenartigen Strukturen. Die geringe Höhe könnte zum einen daraus resultieren, dass die Viren durch die Bindung an die Oberfläche gestreckt wurden. So wurde es bereits in anderen Studien und auch bei anderen Viren beobachtet<sup>158,159</sup>. Des Weiteren könnte die Virusstruktur durch den Trocknungsvorgang verändert worden sein.

Neben den virusähnlichen Partikeln werden weitere Strukturen beobachtet (Tabelle 11), insbesondere flache Partikel mit einem Durchmesser ab 150 nm, offene Ringe mit einer geringen Höhe und einer Größe von ebenfalls 150 nm sowie kleinere Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm und einer Höhe von etwa 15 nm. Diese können sowohl von der ursprünglichen Virussuspension selber stammen oder durch o.g. Präparationsschritte hervorgerufen worden sein. Die beobachtete Heterogenität ist auch unter Berücksichtigung der einfachen Aufreinigung der Viren nach deren Zucht aus bebrüteten Hühnereiern verständlich. Durch die durchgeführte Ultrazentrifugation kann eine homogene Suspension von Viren nur einer einzelnen Größe nicht erwartet werden, da diese nur wenig gröbenselektiv wirkt. Dies kann außerdem zum Aufbrechen und erneuten Zusammenlagern

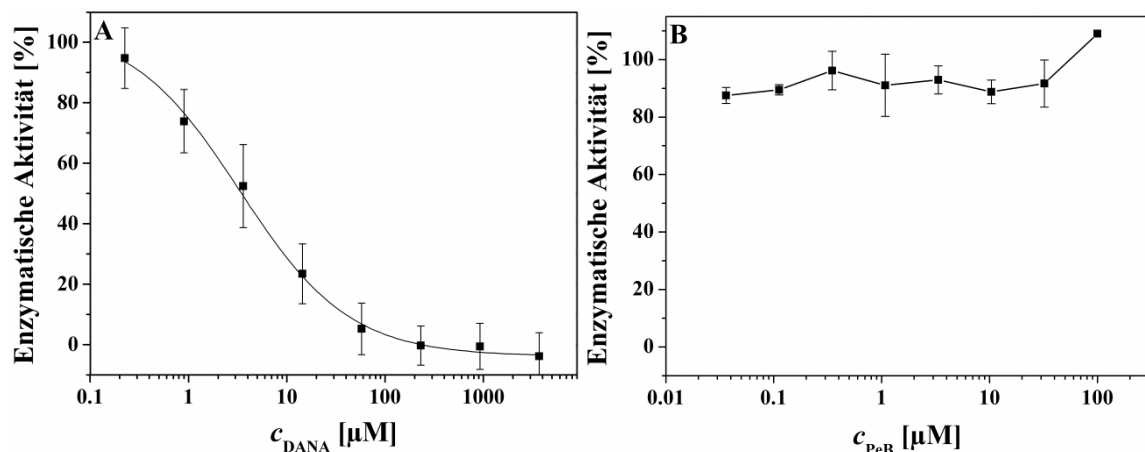


von Virusbruchstücken führen, was auch die beobachtete heterogene Partikelverteilung zur Folge hätte. Eine genauere Charakterisierung der unterschiedlichen Strukturen ist mittels AFM allein nicht möglich. Zur Identifizierung viraler Proteine könnte gegebenenfalls eine weitere Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgen.

Die AFM-Aufnahmen bestätigen die vorangegangenen Beobachtungen. Virusähnliche Partikel werden nur auf peptidmodifizierten Oberflächen beobachtet, an welche sie spezifisch binden. Wie bereits in den SPR-Experimenten gezeigt, können auf der nichtmodifizierten Kontrolloberfläche keine Viren gebunden werden. Es ergibt sich ein heterogenes Bild verschiedener partikulärer Strukturen, die unter Berücksichtigung der Virusgewinnung und Probenpräparation den tatsächlichen Influenzaviren zugeordnet werden konnten.

#### 4.1.8 Einfluss der Peptide auf die Neuraminidaseaktivität der Influenzaviren

Das Peptid PeB wechselwirkt spezifisch mit der RBS des Influenzavirus und stellt dementsprechend ein funktionales Mimetikum des natürlichen Rezeptors (Sialylglykane) dar. Die Sialinsäurereste dieser natürlichen Rezeptoren werden im Infektionszyklus durch die viruseigene Neuraminidase (NA) abgespalten, um eine Loslösung des Virus von der Zelloberfläche nach Assemblierung aller viralen Bestandteile zu ermöglichen. Aufgrund der beobachteten kompetitiven Inhibition von PeB mit den Rezeptoren, liegt die Vermutung einer Interaktion mit der viralen Neuraminidase nahe. Diese Vermutung wird nun experimentell überprüft. Dazu wurde ein literaturbekannter Test<sup>130</sup> zur Messung der enzymatischen NA-Aktivität etabliert und auf das Peptid PeB übertragen (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Messung der Neuraminidase-Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors DANA (A) und PeB (B).** Die Aktivität wurde durch Umsatz des Substrates MUNANA in das fluoreszierende MBF in Lösung detektiert und gegen den Substratumsatz ohne Inhibitor normiert (100%). In A repräsentiert die Linie einen sigmoidalen Fit des Kurvenverlaufs, während in B die Linie nur die Messpunkte direkt miteinander verbindet.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Bei der Verwendung von DANA als bekannten NA-Inhibitor wird eine Inhibitionskurve und ein  $IC_{50}$ -Wert von  $3.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$  erhalten. Dies ist das erwartete Verhalten und stimmt gut mit der Literatur überein ( $IC_{50} = 6.7 \mu\text{M}$ )<sup>160</sup>. Für das Peptid PeB ist keine Änderung der NA-Aktivität detektierbar. Das Signal schwankt im verwendeten Konzentrationsbereich zwischen 90% und 110%. Dementsprechend findet keine Interaktion des Peptids mit für die Enzymaktivität relevanten Bereichen der Neuraminidase statt. Die kompetitive Rezeptorinhibition des Peptids ist somit auf das HA beschränkt.

Dies bedeutet einerseits, dass das Peptid PeB einen funktionalen, jedoch keinen dezidiert strukturellen HA-Inhibitor darstellt. Da die Peptide die Neuraminidase nicht beeinflussen ermöglicht diese Selektivität andererseits, dass ein Virusnachweis nach Bindung an die Peptide über die enzymatische NA-Aktivität durchgeführt werden könnte.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass das Peptid PeB sensitiv und spezifisch mit Viren des Influenzaserotyps X31 interagiert, wobei diese Interaktion maßgeblich von verschiedenen physikalischen Umgebungseigenschaften beeinflusst wird. Um die Eigenschaften des Peptids selbst zu untersuchen, verbesserte Peptidvarianten zu generieren sowie die Bindung weiterer Influenzaserotypen zu ermöglichen, werden nun die Beiträge einzelner Aminosäuren und deren Position im Peptid charakterisiert. Anschließend wird die Primärsequenz zur Generierung verbesserter Bindungseigenschaften des Peptids modifiziert.

## 4.2 Variation der Peptidsequenz PeB zur Bindung aktueller HA-Varianten

### 4.2.1 Determinierung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung des Peptids PeB gegenüber Influzaviren verschiedener Serotypen

Das identifizierte Peptid PeB (ARDFYD~~Y~~DV~~F~~YAMD) wurde im Bereich der mittleren acht, für die Bindung des Virus verantwortlichen Aminosäuren, hinsichtlich der Beziehung zwischen Primärstruktur und der Peptidaktivität untersucht. Dazu wurde eine Microarray-basierte Substitutionsanalyse durchgeführt.

Aus den Fluoreszenzsignalen der Virusbindungen wurde der Kontrast berechnet und relativ zur Positivkontrolle (Fetuin) ausgedrückt, um eine einfache Vergleichbarkeit verschiedener Datensätze herzustellen (Abbildung 26).

	F	Y	D	Y	D	V	F	Y
A	-15	-18	-3	-1	-25	-4	-18	-32
C	5	5	18	1	-27	27	19	-11
D	-29	3	0	19	0	78	140	49
E	-16	0	27	-24	-17	0	-25	-13
F	0	-9	64	-18	-46	-24	0	-30
G	16	-7	54	-6	-41	-11	20	-34
H	13	6	23	-5	-23	-32	-33	-33
I	12	9	23	25	-52	-2	-29	-35
K	10	18	35	-11	-51	-14	-12	-6
L	11	10	35	-15	-44	-32	-28	-14
M	10	-5	39	-16	-28	-31	-26	2
N	20	-1	14	-48	-51	-12	-8	31
P	-4	24	55	-17	-31	9	-2	27
Q	6	26	30	-30	-14	-7	-23	-18
R	-13	18	25	-7	-24	-3	-34	-19
S	-10	2	22	-52	-23	-11	2	19
T	-3	3	34	-55	-53	-34	17	0
V	-21	5	3	4	-26	0	-17	11
W	-5	10	26	-57	-35	-22	-9	13
Y	-9	0	17	0	-37	-15	-11	0

	F	Y	D	Y	D	V	F	Y
A	-17	33	7	59	-6	25	41	59
C	0	46	25	44	-41	25	51	95
D	33	70	0	59	0	51	63	101
E	20	74	18	61	-5	51	35	96
F	0	40	41	11	-3	41	0	83
G	25	48	43	29	11	43	32	79
H	-2	39	17	42	17	39	29	53
I	35	42	22	47	16	15	27	84
K	29	42	14	27	14	6	20	62
L	38	56	33	64	20	21	33	86
M	25	52	21	100	5	34	36	93
N	26	25	19	47	29	32	39	65
P	30	46	29	80	14	48	54	105
Q	12	36	26	43	-11	38	42	49
R	35	27	3	44	10	35	39	50
S	22	41	14	50	-5	31	42	53
T	4	33	19	44	27	36	42	71
V	-13	12	10	51	9	0	43	73
W	-4	31	34	35	17	36	37	75
Y	-6	0	29	0	-5	17	0	0

**Abbildung 26: Ergebnisse des Peptidmicroarrays zur Substitutionsanalyse bei Inkubation von Virusmaterial der Stämme X31 (Abbildung links, A/Aichi/2/1968) und NY (Abbildung rechts, A/NewYork/55/2004).** Dargestellt ist der Mittelwert des Kontrasts ( $n = 3$ ) in Prozent relativ zur Positivkontrolle Fetuin (Originalsequenz FYDYDVFY = 0%). Werte kleiner oder gleich Null sind weiß, Werte oberhalb der 90%-Quantile sind dunkelgrau hinterlegt. Im Bereich dazwischen ist der Farbübergang fließend.

Die Ergebnisse zur Substitution ausgewählter Aminosäuren sollen nun vergleichend mit den Ergebnissen der Molekulardynamik-Simulation dargestellt werden (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse der Substitutionsanalyse mit den theoretischen Vorhersagen der Molekulardynamik-Simulation der Peptid-Virus-Interaktion für X31.** Dargestellt ist die berechnete Freie Energie aus der MD-Simulation sowie die Zuordnung von signalverstärkenden bzw. -abschwächenden Substitutionen aus der Microarray-basierten Substitutionsanalyse.

AS	G [kcal/mol]	Microarray	
		Einfluss auf Bindungssignal	
		Verstärkung	Abschwächung
F1	-0.8	G, N	D, E
Y2	-0.1	K, P, Q, R	-
D3	+0.8	mehrere verschiedenartige AS	-
Y4	-1.7	D, I	verbleibende AS
D5	+2.3	-	alle AS
V6	-0.2	D	-
F7	-2.1	D, G, T	-
Y8	-0.1	D, N, P, S	-

Auffallend ist zunächst die Rolle der Asparaginsäuren. Ein Austausch von D3 führt bei fast jeder Substitution (außer Alanin) zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Besonders starke Signale sind bei Austausch gegen G, F und P zu beobachten. D3 weist laut Molekulardynamik-Simulation mit +0.8 kcal/mol eine repulsive Wechselwirkung mit dem HA auf. Dies wird durch die Substitutionsanalyse bestätigt. Der Austausch gegen fast jede andere Aminosäure führt zu einem verbesserten Bindungsverhalten. Dies ist von besonderem Interesse, da ein Austausch von D3 zur Aufhebung des YDY-Bindemotivs führt, welches für Lektine bereits mehrfach beobachtet wurde<sup>161</sup>. Für die Interaktion des Lektins HA mit dem Peptid PeB scheint die Existenz dieses dezidierten Motivs unerheblich zu sein.

Keine Übereinstimmung zwischen Modellierung und Substitutionsanalyse wurde für die Rolle der Aminosäure D5 gefunden. Die theoretische Kalkulation ergab für D5 den stärksten repulsiven Beitrag (+2.3 kcal/mol). Die Substitutionsanalyse zeigt jedoch, dass jeder Austausch dieser Aminosäure zu einer Verringerung der Bindefähigkeit des Peptids führt. Diese ist demnach essentiell. Die Diskrepanz zwischen Modellierung und Experiment könnte mit Einflüssen dieser Aminosäure auf die Sekundärstruktur des Peptids bzw. allgemeiner auf die Anordnung benachbarter Aminosäuren zurückzuführen sein. Derartige Einflüsse konnten bei der Molekulardynamik-Simulation nicht berücksichtigt werden, da hier nur die Originalsequenz und keine weiteren Peptidvarianten untersucht wurden.

Der Austausch vorhandener Aminosäuren gegen Asparaginsäure spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle. Der Austausch der Aminosäuren Y4, V6, F7 und Y8 gegen D erhöht das erhaltene Fluoreszenzsignal signifikant, während eine Substitution von F1 gegen D zur Auslöschung des Bindungssignals führt.

Wie schon für D3 beschrieben, stimmen die Ergebnisse der Substitutionsanalyse zumeist mit den theoretischen Kalkulationen überein. Die Substitution der Aminosäure F1 führt in vielen Fällen zu keiner signifikanten Änderung des Fluoreszenzsignals. Wie bereits beschrieben, bewirkt die Substitution durch negativ geladene Aminosäuren (D, E) eine Verringerung des Signals. Der molekularen Modellierung folgend, trägt F1 mit -0.8 kcal/mol zur Bindung bei. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der Substitutionsanalyse, da keine maßgeblichen Verstärkungen (geringe Zunahme bei G, N) des Bindungssignals durch den Austausch gegen eine einzelne bzw. eine Gruppe von Aminosäuren beobachtet werden konnte.

Für Y4 wurden erhöhte Bindungssignale nur bei Austausch gegen D und I beobachtet. Laut MD-Simulation trägt diese Aminosäure mit -1.7 kcal/mol attraktiv zur Wechselwirkung bei. Ähnliches gilt für V6, F7 und Y8, die ebenfalls attraktiv zur Bindung beitragen und bei denen nur bei einzelnen Aminosäuren eine verstärkte Bindung beobachtet wird.

Insgesamt ergibt sich außer für D5 eine hohe Konsistenz zwischen der experimentellen Substitutionsanalyse und den Vorhersagen der Molekulardynamik-Simulation. Die Substitutionsanalyse stellt außerdem die Basis zur Entwicklung optimierter Varianten des Peptids PeB dar, um eine verbesserte Bindung der Influenzaviren zu ermöglichen. Dies gilt insbesondere für die Entwicklung von Peptiden, welche andere Serotypen des Influenzavirus binden sollen. Das Peptid PeB interagiert, der Molekulardynamik-Simulation sowie der Kristallstrukturanalyse des Fab-HA-Komplexes<sup>106</sup> folgend, mit der konservierten Rezeptorbindungsstelle im HA. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Peptid PeB weitere Influenzastämme binden kann. Zur Überprüfung wurde die Substitutionsanalyse auf weitere Influenzastämme angewendet. Neben weiteren H3N2-Viren (NY - A/NewYork/55/2004, VIC - A/Victoria/210/2009) wurde dazu auch Hämagglutinin eines H1N1-Stammes (A/California/7/2009) mit der gleichen Peptidbibliothek untersucht.

Für die verwendeten Virenstämme wurden weitere Substitutionen ermittelt, welche allgemein eine höhere Affinität zum Hämagglutinin aufweisen oder spezifisch mit dem HA eines Stammes interagieren. Für NY führen vor allem Substitutionen von Y4 und Y8 zu höheren Bindungssignalen. Das Gleiche gilt auch für den Stamm VIC, wobei hier zusätzlich

## 4 Ergebnisse und Diskussion

verschiedene Substitutionen von Y2 ( $\rightarrow$  C, D, E, P, Q), V6 ( $\rightarrow$  D, E, P) und F7 (D, E, P, Q) zu höheren Fluoreszenzsignalen führen.

Die Signale bei Inkubation mit H1N1-Material unterscheiden sich weniger deutlich von denen mit X31-Viren (siehe Anhang III). Hier führen vor allem die Substitutionen D3  $\rightarrow$  F, W; V6  $\rightarrow$  D sowie F7  $\rightarrow$  D zu erhöhten Fluoreszenzsignalen.

Allen Substitutionsanalysen war die Verringerung der Signale bei Substitution von D5 gemein, welche somit stammübergreifend für die Etablierung der Peptid-Virus-Interaktion essentiell ist. Dennoch war für jeden Influenzastamm ein anderes Bindungsmuster zu beobachten. Dies könnte genutzt werden, um eine Microarray-basierte Serotypisierung von Virusproben durchzuführen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

Aus den Ergebnissen der Microarray-basierten Substitutionsanalyse wurden nun 12 Permutationen (unter Berücksichtigung der verschiedenen Influenzastämme, der absoluten Fluoreszenzsignale und der Reproduzierbarkeit) ausgewählt, um verbesserte Peptidvarianten zu generieren.

### **4.2.2 Entwicklung substituierter Peptidvarianten mit verbesserten Bindungseigenschaften**

Die Resultate der Substitutionsanalyse offenbaren stammspezifische Peptidvarianten mit verbesserten Eigenschaften. Aus der 153 Peptide umfassenden Bibliothek wurden nun 12 Varianten ausgewählt, die mittels SPR näher auf ihr Bindungsverhalten gegenüber den verschiedenen Influenzastämmen untersucht wurden (Abbildung 27).

Für den Stamm X31 zeigt nur die Sequenz FYYYDVFY ein höheres Bindungssignal als das Originalpeptid (FYDYDVFY). Diese Variante zeigt auch bei Verwendung des zweiten getesteten H3N2-Stammes NY ein höheres Signal. Weitere starke Intensitäten für NY sind für die Peptide FYDYDQFY sowie FYDYDVFE (66% bzw. 73% gegenüber Originalpeptid) zu beobachten.

Virusmaterial des H1N1-Subtyps zeigt die größten Verstärkungen in der Signalintensität bei Austausch einzelner Aminosäuren. Hier wurde bei der Peptidvariante FYYYDVFY ein 11-fach höheres Signal als beim Originalpeptid beobachtet. Auch das Peptid FYDYDVFE zeigte ein, gegenüber dem Original, erhöhtes Bindungssignal (2.5-fach).

Insgesamt muss konstatiert werden, dass die Übereinstimmung zwischen den Resultaten der Peptidmicroarrays und der SPR-Studien gering war. Die Peptidvarianten, welche besonders starke Signale im SPR-Experiment zeigten, führten im Microarray nur zu geringfügigen Erhöhungen der Fluoreszenzintensitäten. Hierfür können insbesondere Unterschiede in der Art der Immobilisierung verantwortlich sein. Im kommerziellen Microarray wurden die Volllängenpeptide (15 AS) über einen unbekanntem Linker auf einer funktionalisierten Glasoberfläche immobilisiert. Demgegenüber wurde für die SPR-Experimente auf die kurzen Peptidvarianten (8 AS) und eine Immobilisierung über einen Oligolysin-Linker auf die Dextran-modifizierte Goldoberfläche zurückgegriffen, welche für das Originalpeptid bereits zu sehr guten Bindungseigenschaften führte (siehe 4.1.4.1 „Variation der Kopplungsstrategien“). Dies resultiert unweigerlich in oberflächenbedingten Abweichungen in den Bindungseigenschaften der Peptide, welche experimentell nicht vollständig erfasst werden können. Die Verwendung von einheitlichen Oberflächenmodifikationen für die verschiedenen Trägermaterialien könnte den Einfluss dieses Faktors verringern, was aufgrund der unterschiedlichen physikochemischen Oberflächeneigenschaften jedoch schwierig ist. Desweiteren ist die Ligandendichte im Microarray nicht kontrollierbar, während im SPR-Experiment versucht wurde, eine möglichst einheitliche Ligandendichte herbeizuführen (Variation zwischen 550 und 1230 RU immobilisiertem Peptid über gesamte Bibliothek). Die Reinheit der Peptide für das SPR-Screening variierte zwischen 75% und 95%, während für den Microarray auch hier keine Werte angegeben werden können, da die Reinheit jedes einzelnen Peptids der Bibliothek vom Hersteller nicht überprüft wurde. Diese Einflussfaktoren führen dazu, dass das Peptidscreening mittels Arrays zwar schnell und einfach durchführbar ist, jedoch nur als Indiz für eine weitere Eingrenzung auf einzelne Varianten angesehen werden kann.

Trotz der beschriebenen Einschränkungen können für alle Influenzastämme verbesserte Peptidvarianten identifiziert werden. Die Kombination der einzelnen Aminosäuresubstitutionen zu Peptiden mit zwei ausgetauschten Aminosäuren führt wiederum zu einer weiteren Erhöhung der Bindungssignale (Abbildung 27).





Dextranchips immobilisiert und anschließend die Bindung des Influzamaterials konzentrationsabhängig gemessen. Aus diesen Bindungsdaten wurden die jeweiligen Nachweisgrenzen (vgl. Gleichung 1) ermittelt (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Nachweisgrenzen in [ng/ml] verschiedener HA-Serotypen.**

Ligand	X31	NY	WSN	CAL	VIET	MSW
	H3N2/1968	H3N2/2004	H1N1/1933	H1N1/2009	H5N1/2004	H7N1/2013
<b>PeB</b>	98.0	1100	313	6400	n.b.	190
<b>PeB<sup>GF</sup></b>	98.0	285	313	380	14.6	390
<b>PeB<sup>P</sup></b>	12500	36500	313	k.B.	n.b.	780
<b>Fetuin</b>	760	n. b.	n. b.	10000	117	n.b.
<b>SL6b</b>	1520	49	n. b.	k.B.	k.B.	n.b.

n.b. = nicht bestimmt, k.B. = keine Bindung beobachtet

Für den Virus X31 werden für die Peptide PeB und PeB<sup>GF</sup> identische Nachweisgrenzen von 98 ng/ml beobachtet. Das Negativkontrollpeptid PeB<sup>P</sup> zeigt nur eine schwache Bindung, was sich in der hohen Nachweisgrenze von 12.5 µg/ml widerspiegelt.

Alle untersuchten Viren binden sowohl an das Peptid PeB als auch an PeB<sup>GF</sup>, allerdings unterschiedlich stark und mit variierenden Nachweisgrenzen. Die Stämme NY sowie CAL zeigen die höchsten Nachweisgrenzen und können mit dem Peptid PeB nicht sensitiv detektiert werden. In allen Fällen außer MSW (H7N1) bindet das Virusmaterial an das Peptid PeB<sup>GF</sup> mit der geringsten Nachweisgrenze. Diese Peptidvariante stellt somit einen stamm- und serotypenübergreifenden Rezeptor dar.

Für die H3N2-Viren (X31, NY) zeigt PeB<sup>P</sup> nur eine schwache Bindung mit hoher Nachweisgrenze, HA-Material vom Stamm CAL wird gar nicht gebunden. Dieses Peptid interagiert somit sehr selektiv und nicht mit jedem untersuchten Influzastamm und -serotyp.

Im Allgemeinen lagen die Nachweisgrenzen bei Verwendung der PeB-Varianten niedriger als bei Verwendung von Fetuin oder biotinylierter 2,6'-Sialyllaktose (SL6b) als Liganden. Nur für den Stamm NY wird bei Bindung an SL6b mit 49 ng/ml die niedrigste Nachweisgrenze unter allen Rezeptoren erreicht.

Zur Interpretation der gefundenen Nachweisgrenzen wurde ein Sequenzalignment aller verwendeten HA-Stämme durchgeführt (Abbildung 28).

Abk.	Serotyp	Nummer <sup>a</sup>	158 V	159 S	160 S	161 A	... ...	214 A	215 E	216 Q	217 T	218 S	219 L	220 Y
<b>X31</b>	H3N2/1968	CAA2426	G	.	N	.	...	Q	.	.	.	.	.	.
<b>NY</b>	H3N2/2004	ABO3754	T	.	.	S	...	N	<b>D</b>	.	I	R	.	.
<b>WSN</b>	H1N1/1933	ABF47955	.	<b>T</b>	<b>V</b>	S	...	D	.	.	Q	.	.	.
<b>CAL</b>	H1N1/2009	ACP44189	.	<b>T</b>	<b>A</b>	.	...	.	<b>D</b>	.	Q	.	.	.
<b>VIET</b>	H5N1/2004	ABP51976	.	.	.	.	...	.	.	.	.	K	.	.
<b>MSW</b>	H7N1/2006		A	<b>T</b>	.	.	...	T	.	.	.	K	.	.

**Abbildung 28: Sequenzalignment der verwendeten HA-Stämme.** In der ersten Zeile steht die Nummer der Aminosäuren im Hämagglutinin, die zweite Zeile stellt die Konsensussequenz dar. Grau hinterlegt sind die Aminosäuren, welche mittels Molekulardynamik-Simulation als entscheidend für die Peptid-Virus-Interaktion ermittelt wurden. <sup>a</sup>Die Nummer bezieht sich auf die Influenzavirendatenbank IVR<sup>162</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>, Zugriff am 02.04.2014); Punkt (.) - AS entspricht der Konsensussequenz.

Alle HAs enthalten die konservierte Aminosäure L219. Die Position 159 ist ebenfalls stark konserviert, bei allen Stämmen befindet sich hier ein Serin (X31, NY, VIET) bzw. das strukturell verwandte Threonin (WSN, CAL, MSW), beide Aminosäuren tragen Hydroxylreste. Diese Aminosäure trägt den größten attraktiven Anteil zur Peptid-HA-Interaktion bei (siehe 4.1.1 „Molekulardynamik-Simulation“), wodurch die Bindefähigkeit der Peptide PeB und PeB<sup>GF</sup> an alle HA-Stämme ermöglicht wird.

Auch die für repulsive Wechselwirkungen verantwortliche AS 215 ist funktional konserviert. Hier befindet sich entweder eine Glutaminsäure (X31, WSN, VIET, MSW) oder eine Asparaginsäure (NY, CAL), die beide über einen Carboxylrest verfügen. Dieser Unterschied könnte ein Grund für die geringe Affinität der Stämme NY und CAL gegenüber PeB und PeB<sup>P</sup> sein.

Dezidierte funktionelle Unterschiede ergeben sich für die Position 160. Während die Stämme NY, VIET und MSW hier ein hydroxylterminiertes Serin aufweisen, befindet sich bei X31 ein hydrophiles Glutamin, bei WSN ein Valin (hydrophob) und bei CAL ein Alanin. Allerdings lassen sich aus diesen Substitutionen keine systematischen Zusammenhänge zur Bindefähigkeit der Peptidvarianten ableiten, da alle Stämme neben dieser Substitution mindestens einen weiteren Unterschied innerhalb der diskutierten vier Aminosäuren aufweisen. Die Unterschiede im Verhalten der Bindungsfähigkeit gegen verschiedene Peptidvarianten ist aufgrund der Sequenzunterschiede der HA-Stämme verständlich, kann aber nicht zur direkten Herleitung eines quantitativen Zusammenhangs zwischen dem Vorhandensein bestimmter Aminosäuren und der damit verbundenen Bindung an verschiedene PeB-Varianten genutzt werden. Dazu wäre eine umfangreiche Studie mit sowohl einer größeren Anzahl von HA-Stämmen verschiedener Serotypen als auch einer größeren

PeptidAuswahl notwendig. Anschließend wäre aus diesen Daten unter Umständen auch die Vorhersage bindender Peptidvarianten mit Hämagglutininen, welche eine bestimmte Sequenzvariation aufweisen, möglich.

Die Fähigkeit der Peptidvarianten zur sensitiven Detektion von HA verschiedener Influenzastämme und -serotypen konnte somit gezeigt werden. Besonders interessant erscheint die stammübergreifend bindende zweifach substituierte Peptidvariante PeB<sup>GF</sup>.

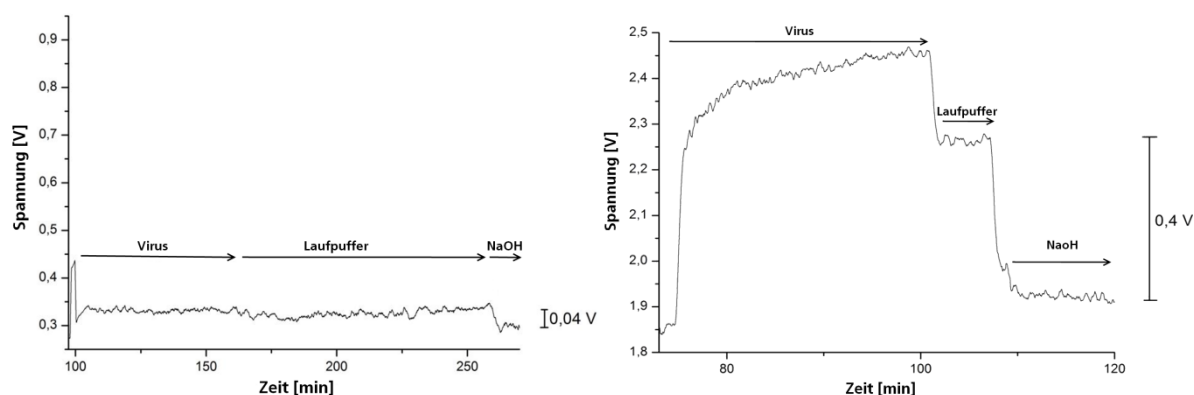
### 4.3 Übertragung des PeB-Virus-Bindungssystems auf biosensorische Testsysteme

Die bisher beschriebenen Methoden zur Charakterisierung der Peptid-Virus-Interaktion (SPR, Microarrays) sind besonders gut für die Ligandentwicklung geeignet. Eine sensitive und spezifische Virusdetektion mittels immobilisierter PeB-Varianten konnte damit gezeigt werden. Nun wird das gefundene Nachweissystem auf weitere anwendungsnahe biosensorische Testsysteme übertragen.

#### 4.3.1 Fluoreszenzbasierter faseroptischer Sensor

Zunächst wird das Peptid-Virus-Bindersystem auf einen praxistauglichen faseroptischen Sensor übertragen, welcher analog zu den SPR-Experimenten die Beobachtung der Bindung der Viren in Echtzeit erlaubt.

Zur Detektion der Virusbindung wurden diese fluoreszenzmarkiert und für 25-50 min über die Glasfaser geleitet. Anschließend wurde mit Laufpuffer gespült und die Faser analog zu den SPR-Experimenten mit 50 mM NaOH regeneriert (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Sensorgramme der Bindung von X31-Viren an eine unmodifizierte (links) und peptidmodifizierte Glasfaser (rechts).** Fluoreszenzmarkierte X31-Viren wurden in einer Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  in Laufpuffer (HBSP) über die Oberfläche geleitet. Anschließend wurde mittels 50 mM NaOH regeneriert. Die Pfeile zeigen jeweils den Zeitraum der Injektion der verschiedenen Lösungen an.

Auf der unmodifizierten Faser kann kein zeitabhängiger Anstieg des Fluoreszenzsignals während der Virusinjektion beobachtet werden. Durch Injektion der Analytlösung wird jedoch ein Signal von +0,04 V gegenüber der Basislinie des Laufpuffers (nach Regeneration) detektiert. Auf der peptidmodifizierten Faser ergibt sich ein zeitabhängiger Anstieg des Fluoreszenzsignals, wobei bei einer Viruskonzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  nach einer Injektionszeit von 25 min noch kein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Nach Injektionsstopp der Viruslösung kann ein schnelles Absinken des Signals beobachtet werden,

welches vermutlich durch Abwaschen schwach adsorbierter Viren verursacht wird. In der Dissoziationsphase kann keine weitere signifikante Verringerung des Signals beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der SPR-Studien (siehe 4.1.2 „Charakterisierung der Peptid-Virus-Interaktion mittels SPR“), in denen ebenfalls nur sehr geringe Dissoziationsraten erhalten wurden. Nach Regeneration sinkt das Signal auf das Niveau vor der Virusinjektion ab. Es wird ein Gesamtsignal von 0.4 V für die fest an der Faser gebundenen Viren erhalten.

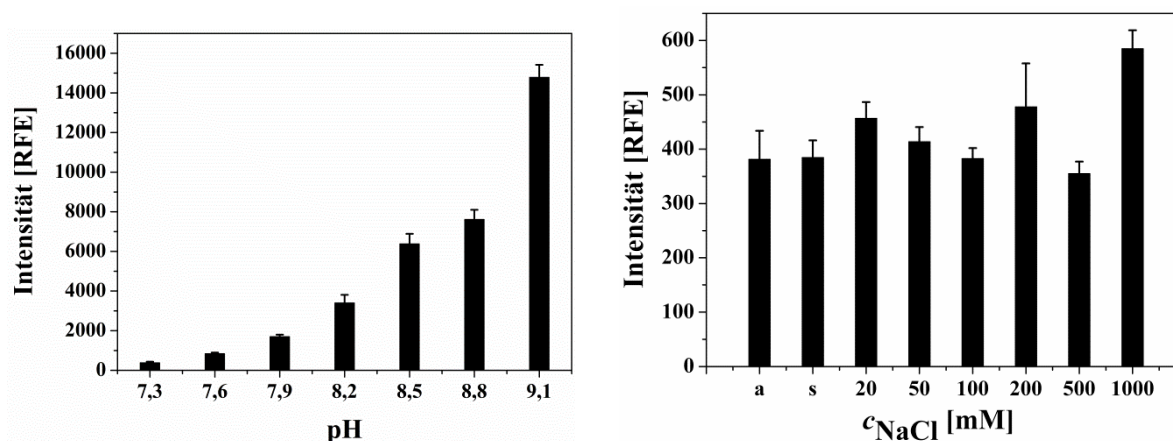
Ein spezifischer Nachweis der Viren unter Verwendung des Peptids PeB ist demnach auch mit diesem bereits kommerzialisierten faseroptischen Sensor unter definierten Laborbedingungen möglich. Zur tatsächlichen Verwendung als diagnostisches System in der Praxis ist eine Fluoreszenzmarkierung der Viren möglich, jedoch unpraktikabel. Um dies zu vermeiden, kann der Bindungsnachweis allerdings mit unmarkierten Proben in einem kompetitiven Inhibitionsassay erfolgen.

### **4.3.2 PDA-basierter kolorimetrischer Virussensor**

Im Folgenden wird die Übertragbarkeit des Bindungssystems bestehend aus dem Peptid PeB und X31-Viren auf ein vollintegriertes Sensorsystem dargestellt. Ausgangspunkt dafür ist das farbige Polymer Polydiacetylen (PDA). Das funktionsbestimmende Strukturelement dieses Polymers ist das en-in konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem (siehe 3.7.2 „Virusnachweis mittels PDA-modifizierter Oberflächen“), welches die chromogenen Eigenschaften des Polymers bestimmt.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden PDA-Filme auf einem Glasobjektträger genutzt. (PolyAn GmbH, Berlin). Zur Generierung peptidmodifizierter PDA-Filme wurden die PCDA-Monomere mittels Carbodiimid-Chemie mit dem Peptid PeB (KKKK-FYDYDVFY) über seinen Oligolysin-Linker gekoppelt. Anschließend wurden peptidmodifizierte und unmodifizierte PCDA-Monomere in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, auf Glasobjektträgern immobilisiert und mittels UV-Licht auspolymerisiert. Zunächst wurde das Schaltverhalten der PDA-Filme gegenüber verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen getestet (Abbildung 30).

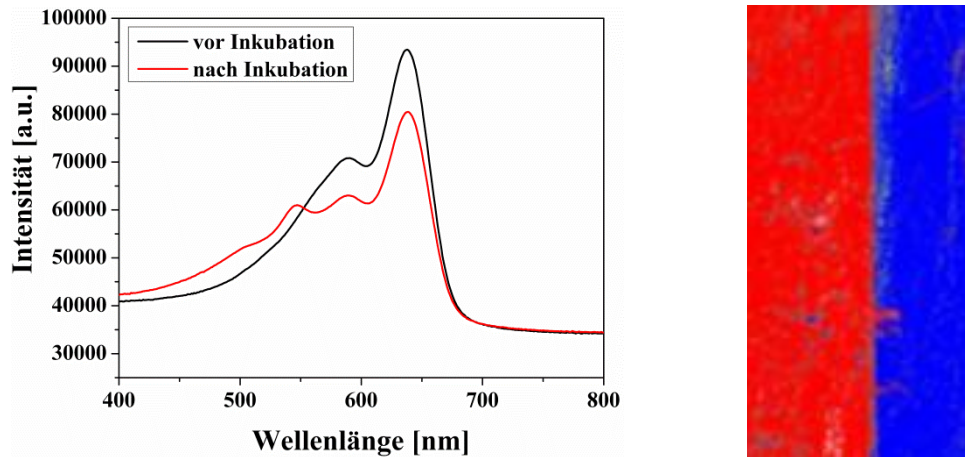
## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 30: Fluoreszenzverhalten von PDA-Filmen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Salzkonzentration (NaCl).** Die Variation des pH-Wertes und der Salzkonzentration wurden auf PDA-Filmen mit 10% peptidmodifizierten und 90% unmodifizierten Monomeren in 50 mM Tris-Puffer im Spotformat durchgeführt. Die Fluoreszenz des roten Zustandes der Polymerfilme wurde mittels Laserscanner bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm detektiert. Es sind die Mittelwerte von 25 Spots dargestellt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

In Übereinstimmung mit der Literatur kann das Schaltverhalten der PDA-Filme durch Änderung des pH-Wertes in den basischen Bereich ausgelöst werden. Während bei pH 7.3 nur ein niedriges Hintergrundsignal erkennbar ist, steigt die Fluoreszenzintensität bis pH 9.1 kontinuierlich an. Dies stimmt mit bekannten Daten überein, bei denen ebenfalls ein signifikantes Schalten von Vesikeln aus Carboxyl-terminiertem PDA zwischen pH 9 und 10 beobachtet wurde<sup>163</sup>. Bei Variation der Salzkonzentration wird kein Farbübergang im Polymer beobachtet. Die Fluoreszenz bleibt konzentrationsunabhängig auf dem niedrigen Hintergrundniveau des blauen Zustandes.

Anschließend wurde das Schaltverhalten bei Zugabe von X31-Influenzaviren beobachtet. Dazu wurde zunächst für 4 h mit Viren inkubiert und anschließend mehrfach mit Puffer gewaschen. Auf diese Art konnte das Schaltverhalten zwischen nichtfluoreszierendem blauen und fluoreszierendem roten Zustand des Polymers ausgelöst werden (Abbildung 31).

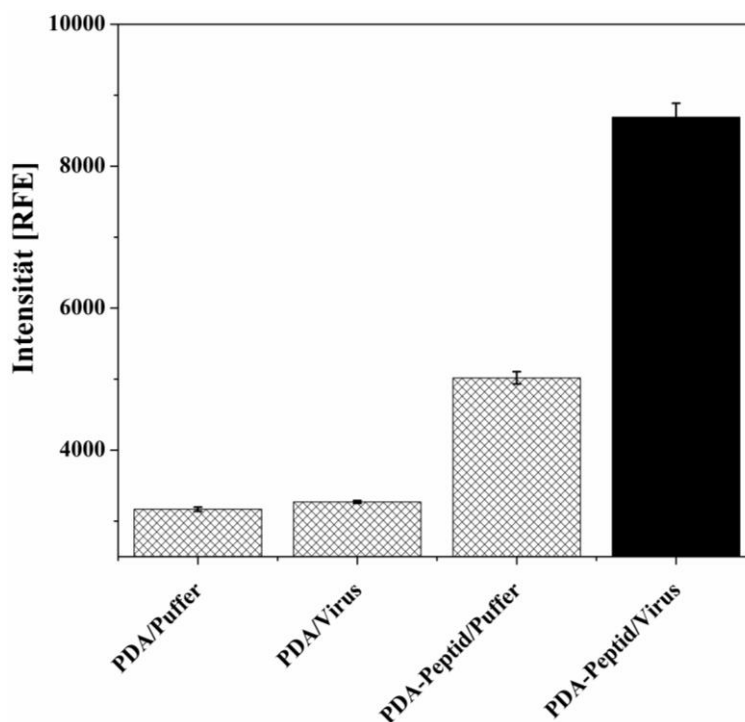


**Abbildung 31: Schaltverhalten von peptidmodifizierten PDA-Filmen bei Zugabe von X31-Viren.** Links: UV-Vis Absorptionsspektren vor und nach Virusinkubation. Rechts: Falschfarbendarstellung eines Fluoreszenzbildes bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 532 nm. Im roten fluoreszierenden Bereich wurde mit Influenzaviren (X31) inkubiert (links im Bild), im nicht-fluoreszierenden blauen Bereich wurde nur gewaschen (rechts im Bild).

Das Erscheinen der Fluoreszenz im, mit Viren inkubierten, Chipbereich zeigt das induzierte Schalten des PDA-Films besonders deutlich an. Im roten Bereich wird eine mittlere Fluoreszenz von  $34000 \pm 6000$  RFE während im umgebenden nichtinkubierten blauen Bereich eine Fluoreszenz von  $10100 \pm 200$  RFE gemessen. Das Absorptionsspektrum des PDA-Films bestätigt diese Beobachtung: während vor der Inkubation das typische Spektrum des blauen PDA-Films mit Absorptionsmaxima bei 638 nm und 590 nm beobachtet wird, erscheinen nach der Inkubation neue Peaks bei 547 nm und 495 nm (Schulter), die dem roten Zustand des PDA-Films zuzuordnen ist<sup>164</sup>. Im UV-Vis Spektrum wird außerdem deutlich, dass durch die Inkubation mit Influenzaviren kein vollständiges Schalten herbeigeführt werden kann, da weiterhin die charakteristischen Absorptionsmaxima des blauen Polymerzustandes beobachtet werden können.

Die Spezifität des Schaltverhaltens wurde außerdem mittels verschiedener Negativkontrollen überprüft (Abbildung 32).

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 32: Spezifität des Virus-induzierten Schaltverhaltens eines PDA-Films.** Als Negativkontrollen wurden unmodifizierte PDA-Chips mit Puffer und Virus (PDA/Puffer, PDA/Virus) sowie peptidmodifizierte PDA-Chips mit Puffer (PDA-Peptid/Puffer) inkubiert. Das spezifische Signal wird bei Inkubation von peptidmodifizierten PDA-Chips mit Virus erhalten (schwarze Säule). Es ist die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 532 nm dargestellt (Säulen entsprechen dem Mittelwert ( $n = 25$ ), Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler).

Die gemessene Fluoreszenzintensität der drei Negativkontrollen (PDA/Puffer, PDA/Virus, PDA-Peptid/Puffer) unterscheidet sich signifikant von der Intensität des Messchips (PDA-Peptid/Virus). Das spezifische Signal des Virus auf der peptidmodifizierten PDA-Oberfläche beträgt in diesem Experiment  $8700 \pm 200$  RFE, das unspezifische Signal des Puffers liegt bei  $5000 \pm 100$  RFE. Damit ist ein spezifischer Nachweis des Virus mithilfe des vollintegrierten peptidmodifizierten PDA-Biosensors prinzipiell möglich.

Durch weitere Optimierung der Assaybedingungen (Inkubationszeit, Pufferzusammensetzung) und der Oberflächenmodifikation muss die Differenz zwischen spezifischem und unspezifischem Signal weiter erhöht werden, um einen sensitiven Nachweis von Viren zu ermöglichen. In der vorliegenden Untersuchung wird mit einer Viruskonzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  gearbeitet. Dies liegt etwa zwei Größenordnungen oberhalb des diagnostisch relevanten Bereiches zum Nachweis von Influenzaviren aus Realproben ( $20\text{-}100 \mu\text{g/ml}$ ). Die prinzipielle Nutzbarkeit dieses Systems als diagnostischer Biosensor konnte hiermit gezeigt werden. Die Sensitivität des Gesamtsystems unabhängig von der



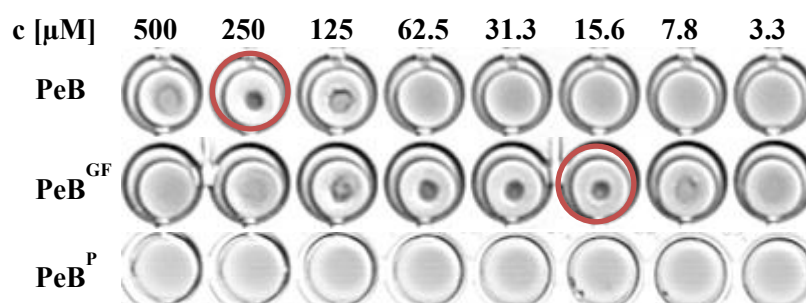
Ligand-Analyt-Interaktion muss durch weitere Entwicklungen jedoch noch verbessert werden, um diagnostisch relevante Viruskonzentrationen zu adressieren.

#### 4.4 PeB und seine Varianten als potentielle Wirkstoffe - Kompetitive Inhibition der Influenzabindung und –infektion *in vitro*

In den vorangegangenen Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass das Peptid PeB als Sensormolekül für die Detektion von Influenzaviren geeignet ist. Des Weiteren wurde im Rahmen der Spezifitätsuntersuchungen beobachtet, dass das Peptid die Bindung von Influenzaviren an seine natürlichen Rezeptoren kompetitiv inhibiert (siehe 4.1.3.1 „Kompetitive Inhibition der viralen Bindung“). Damit stellt PeB einen potentiellen Wirkstoff dar, der die Anbindung des Virus an seine Zielzellen verhindert. Des Weiteren zeigte sich, dass die verbesserte Peptidvariante PeB<sup>GF</sup> eine höhere Affinität gegenüber den X31-Viren besitzt als PeB. Bei Inhibition der Virusbindung an Fetuin wurde für PeB ein  $IC_{50}$ -Wert von 89  $\mu$ M, für PeB<sup>GF</sup> von 13  $\mu$ M erhalten. Um diese Eigenschaft der Peptide näher zu untersuchen, wurden in Kooperation mit der HU Berlin (AG Prof. A. Herrmann) weiterführende Infektionsinhibitionsuntersuchungen vorgenommen. Dazu wurden etablierte Tests zur Agglutination von roten Blutzellen sowie Infektionsexperimente *in vitro* unter Verwendung von MDCK II Zellen durchgeführt.

##### 4.4.1 Hämagglutinationsinhibition

Die Fähigkeit von Influenzaviren zur Hämagglutination von roten Blutzellen beruht auf ihrer Bindung an Zuckerstrukturen auf der Blutzelloberfläche. Dieses Experiment ist geeignet für die Charakterisierung der spezifischen Bindungsinhibition von Influenzaviren und somit qualitativ vergleichbar mit den SPR-Untersuchungen (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Hämagglutinationsinhibition von X31-Viren mittels PeB, PeB<sup>GF</sup> und PeB<sup>P</sup>.** Die Peptide wurden ausgehend von 500  $\mu$ M seriell verdünnt und mit X31-Viren vorinkubiert. Anschließend wurde eine Erythrozytenlösung hinzugegeben und erneut inkubiert. In den Wells, bei denen sich ein sichtbarer dunkler Punkt in der Mitte ausgebildet hat, wird die Hämagglutination inhibiert. Die roten Kreise zeigen jeweils das Well mit niedrigster Inhibitorkonzentration und gleichzeitig vollständiger Hämagglutinationsinhibition.

Für die Peptide PeB (ARDFYDYDVFFYYAMD) und PeB<sup>GF</sup> (ARDFYGYDVFFYYAMD) konnte eine Inhibition beobachtet werden, nicht jedoch für PeB<sup>P</sup> (ARDFYDPDVFFYYAMD), welches analog zu den SPR-Experimenten die Negativkontrolle darstellte.

Bei hohen Peptidkonzentrationen wird mit den Peptiden PeB (bei 500  $\mu\text{M}$ ) und PeB<sup>GF</sup> (bei 500 und 250  $\mu\text{M}$ ) keine reguläre Agglutination und auch keine Agglutinationsinhibition beobachtet. Vielmehr scheinen die Blutzellen im Puffer auszutrocknen. Mittels mikroskopischer Kontrolluntersuchungen wurde festgestellt, dass die Blutzellen bei den betreffenden Peptidkonzentrationen lysieren. Offenbar wirken die Peptide bei diesen hohen Konzentrationen zellpermeierend oder erhöhen den osmotischen Druck so sehr, dass die Zellen aufbrechen. In diesen Fällen kann keine Aussage über das Bindevverhalten der Viren an die Erythrozyten getroffen werden. Bei mittleren Konzentrationen zeigen beide Peptide konzentrationsabhängige Agglutinationsinhibition. Eine vollständige Inhibition kann bei PeB bis 235  $\mu\text{M}$  (Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten) und bei PeB<sup>GF</sup> bis 32  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Quantitative Auswertung der HAI-Experimente mit verschiedenen Bindungsinhibitoren.** Die Sequenzen der weiteren Peptide wurden der Literatur entnommen (vgl. Tabelle 1).

Inhibitor	Name/Sequenz	$IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	SD
SL6	2,6'-Sialyllaktose	25000	n/d
S2	ARLPRTMVHPNGAQP	3800	n/d
L-P1	NDFRSKT	7500	n/d
P1	HAWDPIPARDPF	5000	2.5
PeB	ARDFYDYDVFFYYAMD	163	41.7
PeB <sup>GF</sup>	ARDFYGYDVFFYYAMD	18	5.9
EB	RRKKAVALLPVLLALLAP	0.98	0.29

Es ergaben sich  $IC_{50}$ -Werte von 163 bzw. 18  $\mu\text{M}$ , während das Kontrollpeptid PeB<sup>P</sup> über den gesamten Konzentrationsbereich keine Hämagglutinationsinhibition zeigt. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen damit in der gleichen Größenordnung wie bei den SPR-Experimenten.

Diese Werte wurden mit dem inhibitorischen Verhalten anderer literaturbekannter Inhibitoren verglichen. Besonders aussagekräftig ist der Vergleich zur 2,6'-Sialyllaktose (SL6), da diese den natürlichen Rezeptor des Virus direkt imitiert.

Wie bereits bei den SPR-Experimenten kann eine deutliche Verringerung des  $IC_{50}$ -wertes um 2-3 Größenordnungen durch Verwendung der Peptide gegenüber der 2,6'-Sialyllaktose

## 4 Ergebnisse und Diskussion

( $IC_{50} = 25 \text{ mM}$ ) erreicht werden. Außerdem zeigte die verbesserte Peptidvariante PeB<sup>GF</sup> gegenüber PeB eine 9-mal niedrigere Inhibitionskonstante (Vergleich SPR: 7-mal niedriger). Dies ist qualitativ vergleichbar mit den Ergebnissen der vorherigen SPR-Experimente und bestätigt die verbesserten Bindungseigenschaften dieser Peptidvariante.

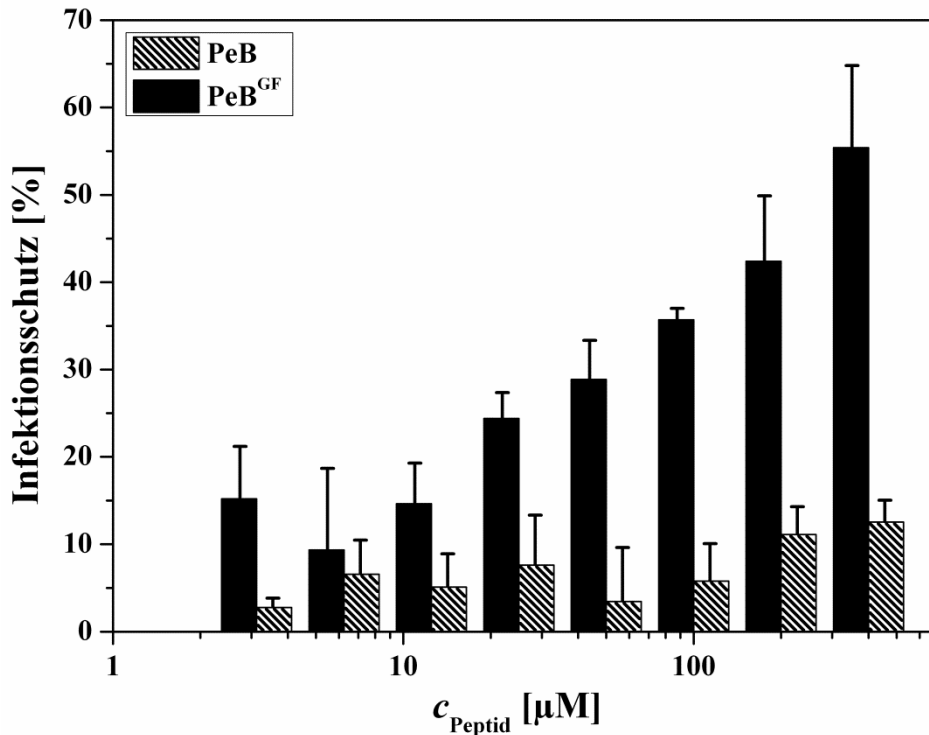
Außerdem zeigen die PeB-Peptide niedrigere  $IC_{50}$ -Werte als die bekannten HA-bindenden Peptide S2, L-P1 und P1. Das Peptid S2 wurde mittels Phagen-Display unter kompetitiver Elution mit der schwach bindenden Sialyllaktose gewonnen<sup>112</sup>. Dadurch ist eine effektive Elution stark bindender Phagen nur schwer möglich, was wahrscheinlich zur vergleichsweise niedrigen Inhibitionseffektivität dieses Peptids führte. Auch die Peptide L-P1 und P1 weisen höhere  $IC_{50}$ -Werte auf, als die PeB-Peptide. Sie wurden allerdings auch gegen andere Influenzaserotypen selektiert (L-P1: H9N2, P1: H5N1). Das stark amphiphile Peptid EB zeigte als einziges Vergleichs-peptid einen deutlichen niedrigeren  $IC_{50}$ -Wert. In vergleichenden SPR-Messungen konnte festgestellt werden, dass dieses Peptid wahrscheinlich Mizellen ausbildet. Dies würde eine multivalente Interaktion des Peptids mit dem Virus ermöglichen, was schließlich zu einer verbesserten inhibitorischen Fähigkeit führen würde.

Der erbrachte Nachweis der funktionalen Bindungsinhibition der PeB-Peptide ist die Voraussetzung für eine mögliche Infektionsinhibition lebender Zellen, welche im Folgenden beleuchtet werden soll.

### 4.4.2 Infektionsinhibition *in vitro*

Influenzaviren können unter geeigneten Bedingungen Zellen *in vitro* infizieren. MDCK II Zellen wurden zur Charakterisierung der Zellinfektion als Modell für den Influenzavirus entwickelt<sup>165,166</sup>. Die Zellen sterben bei erfolgter Infektion zu einem hohen Prozentsatz nach Kontakt mit den Influenzaviren ab. Der Zelltod wurde mit Hilfe eines Farbstoffs nachgewiesen (siehe 3.9.2 „Zellbasierte Infektionsinhibition“). Die Infektionsinhibitionsexperimente wurden unter Laborbedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 von D. Lauster an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Das Peptid PeB<sup>GF</sup> schützt vor einem durch Influenzainfektion hervorgerufenen Zelltod bei bis zu 60% der infizierten Zellen (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Zelltest zur *in vitro* Infektionsinhibition.** X31-Viren und Peptide unterschiedlicher Konzentration wurden zusammengegeben und vorinkubiert. Diese Lösung wurde schließlich auf MDCK II Zellen gegeben und weiterinkubiert (Infektion). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 24 h weiterkultiviert. Der Tod der Zellen wurde mit Hilfe eines MTS-Reagenzes nachgewiesen. Der Schutz vor Infektion in Prozent ist die relative Anzahl überlebender Zellen im Vergleich zur Kontrollprobe mit einfacher Infektion (ohne Inhibitor). Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens 4 unabhängigen Experimenten sowie der Standardfehler.

Der Infektionsschutz durch PeB<sup>GF</sup> zeigt außerdem ein konzentrationsabhängiges Verhalten. Bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  ist ein linearer Anstieg der Anzahl geschützter Zellen zu beobachten. Ein vollständiger Infektionsschutz konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht erreicht werden, obwohl eine vollständige Bindungsinhibition in vorhergehenden Experimenten (HAI, SPR) beobachtet wurde. Dafür können mehrere testspezifische Effekte verantwortlich sein. Einerseits könnte eine Wechselwirkung des Peptids mit den Zellen eine Verringerung der apparenten Peptidkonzentration zur Folge haben, was zu den vergleichsweise hohen notwendigen Peptidkonzentrationen führen würde. Desweiteren werden im Infektionstest weitaus höhere Viruskonzentrationen eingesetzt. Selbst wenn nur wenige HA-Moleküle nicht mit Peptid belegt sind, könnte noch eine Anbindung des Virus an die Zellmembran stattfinden, weshalb für eine vollständige Bindungsinhibition mehr Peptid benötigt wird, als in vorangegangenen Assays.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Das Peptid PeB ist im Gegensatz zur verbesserten Variante PeB<sup>GF</sup> nicht in der Lage einen signifikanten Schutz vor der Influenzainfektion zu gewährleisten. Ausschlaggebend für dieses Verhalten ist vermutlich die im Vergleich zu PeB<sup>GF</sup> geringere Affinität des Peptids. Da bereits bei PeB<sup>GF</sup> vergleichsweise höhere Konzentrationen zur Herbeiführung des Inhibitionseffekts notwendig sind als in den anderen Testformaten, sind die für PeB erreichbaren Peptidkonzentrationen daher nicht mehr ausreichend.

Ein Effekt der Peptide allein auf die MDCK II Zellen konnte selbst bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen nicht beobachtet werden. Deshalb wird nicht von einer generell zellschädigenden Eigenschaft der Peptide ausgegangen, auch wenn diese zur Lyse der Erythrozyten im vorhergehenden HAI-Test führten. Dies ist besonders im Hinblick auf eine Verwendung der Peptide als mögliche Wirkstoffe von Bedeutung.

Um die Verwendung als Wirkstoff zu ermöglichen ist auch eine weitere Erhöhung der Affinität der Peptide nötig. Typische Wirkstoffe besitzen Affinitäten beziehungsweise Inhibitionskonstanten im niedrigen nM-Bereich. Eine deutliche Affinitätsverbesserung der Peptide kann durch deren Kopplung an multivalente Substrukturen erfolgen<sup>38</sup>. Hierfür kämen insbesondere dendritische Makromoleküle sowie Nanopartikel in Frage<sup>87</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Aus PatientInnensicht aber auch aus sozioökonomischen Betrachtungen besteht ein hoher Bedarf an neuen Methoden zur schnellen, flächendeckenden Diagnostik von Influenzaerkrankungen sowie an Wirkstoffen, die eine zielgerichtete Therapie und schnelle Genesung ermöglichen. Die Verwendung von Peptiden als Rezeptoren in Biosensoren für die Pathogendiagnostik und auch als Wirkstoffe gegen verschiedene Krankheitserreger stellt zunehmend einen Schwerpunkt biotechnologischer Forschung dar. Diese bieten attraktive Vorteile gegenüber bisher verwendeten molekularen Bausteinen. Das Ziel dieser Arbeit war die Generierung bindender Peptide für den spezifischen Nachweis verschiedener Influenzaserotypen und die Charakterisierung und Weiterentwicklung dieser Peptide zum Einsatz in biosensorischen Systemen.

**Generierung und Charakterisierung bindender Peptide.** Bindende Peptide konnten aus der Paratopregion des influenzaspezifischen Antikörpers HC19 abgeleitet werden. Zwei von drei der aus den CDRs generierten Peptidsequenzen wurden als immobilisierte Liganden zum spezifischen Nachweis von Inflenzaviren des Subtyps X31 (H3N2, A/Aichi/2/1968) eingesetzt. Das Peptid PeB aus der HCDR3 des Antikörpers wurde aufgrund seiner prognostizierten Bindung an die konservierte Rezeptorbindungsstelle des Oberflächenproteins Hämagglutinin des Inflenzavirus weiterentwickelt. Das Peptid wurde mittels verschiedener Spacereinheiten und unterschiedlicher Linkerfunktionen an Carboxyl-, Epoxy-, Neutravidin- und Maleimid-funktionalisierte Oberflächen gebunden und die Funktionalität mithilfe mehrerer analytischer Methoden bewertet. Als besonders geeignet erwies sich die Kopplung des Peptids über N-terminale Oligolysin-Linker. Die Interaktion der Viren mit dem immobilisierten Peptid wurde als entropiegetrieben und maßgeblich durch hydrophobe Wechselwirkungen determiniert charakterisiert. Die Spezifität der Virusinteraktion wurde mittels Variation der bindenden Aminosäuresequenz im Peptid, über Kontrollexperimente mit verschiedenen Peptiden definierter Eigenschaften sowie der kompetitiven Inhibition der Virusbindung an seinen natürlichen Rezeptor nachgewiesen. Die Bindung der intakten Viruspartikel wurde begleitend mittels rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen belegt. Neben Partikeln mit für Inflenzaviren typischen Dimensionen wurden auch kleinere Strukturen identifiziert, die ebenfalls viralen Ursprungs sind. Die AFM-Untersuchungen

belegten weiterhin die durch die Peptidmodifikation hervorgerufene Sensibilisierung der Sensoroberfläche.

**Variation der peptidischen Primärsequenz.** Aus einer vollständigen Substitutionsanalyse der Peptidsequenz wurden über Beobachtung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wertvolle Informationen über Bedingungen für dessen Funktionalität gewonnen. Dadurch wurden in der Primärsequenz variierende Peptidvarianten mit neuen Eigenschaften generiert. Zum einen wurde die Affinität des Peptids gegen verschiedene Influenzaserotypen z.T. drastisch erhöht. So konnten auch weitere Peptidvarianten gefunden werden, die nicht nur den Referenzvirus vom Typ H3N2 aus dem Infektionsjahr 1968 binden. Es wurden Peptidvarianten zur Bindung neuerer humaner H3N2-, H1N1- sowie aviärer H5N1- und H7N1-Stämme gefunden. Zum anderen wurde eine Peptidvariante gefunden, die in der Lage ist, die Influenzainfektion von Zellen einzudämmen. Der für die Peptidfindung und -optimierung etablierte Arbeitsweg ist von allgemeiner Bedeutung und könnte auf weitere Bindungssysteme übertragen werden.

**Übertragung des Bindersystems auf biosensorische Testsysteme.** Desweiteren wurde das Bindersystem aus Peptid und Virus in zwei anwendungsnahe Sensorsysteme übertragen. Hier wird der Vorteil der Verwendung von Peptiden gegenüber größeren Rezeptormolekülen besonders deutlich. So war es möglich kurze Peptidsequenzen in einen dünnen PDA-Film einzubringen und diesen damit zur spezifischen Detektion von Influenzaviren einzusetzen. Der dadurch ausgelöste Farbumschlag im Polymer konnte spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Rezeptorbindung und die Signalgebung sind dabei in einem Makromolekül integriert. Eine weitere Optimierung des Systems ist noch notwendig, um eine geringere Nachweisgrenze zu erreichen und den Farbumschlag mit bloßem Auge sichtbar zu machen.

**Infektionsinhibition *in vitro*.** Schließlich wurden die inhibitorischen Eigenschaften der gefundenen Peptide näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass die in ihrer Affinität verbesserte Peptidvariante PeB<sup>GF</sup> in der Lage ist, Säugerzellen mit bis zu 60% vor einer Influenzainfektion zu schützen.

In einem rationalen Ansatz wurden ausgehend von der Struktur eines Fab-HA Komplexes erfolgreich bindende Peptide generiert und in ihren Bindungseigenschaften charakterisiert und weiterentwickelt. Das daraus gewonnene Peptid PeB und seine Varianten stellt einen Ausgangspunkt für die Herstellung vollintegrierter Biosensoren für die Influenzadiagnostik als auch für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zur spezifischen Therapie der Grippe dar.



## 6 Ausblick

Die gewonnenen und charakterisierten influenzabindenden Peptide bilden die Grundlage für die weitere Entwicklung integrierter Biosensoren zum Nachweis des Influenzaviruses sowie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung der Influenzainfektion.

Die Peptide selbst können in ihren Bindungseigenschaften noch weiter verbessert werden. So könnte insbesondere eine Implementierung der Peptide in definierte multivalente Gerüststrukturen erfolgen, um die Avidität gegenüber dem Virus weiter zu steigern und dadurch einen sensitiveren Nachweis zu ermöglichen. Dies ist insbesondere für die Verwendung als Wirkstoff entscheidend, da die momentane Inhibition der Virusbindung im  $\mu\text{M}$ -Bereich nicht für eine effektive Therapie genügt. Eine weitere Komplikation, die bei der Verwendung von Peptiden als Wirkstoffe auftritt, ist der schnelle enzymatische Abbau im Organismus. Dies könnte durch Ersetzen der L-Proteine durch ihre spiegelmeren D-Varianten verhindert werden.

Neben der Integration der Peptide in PDA-basierte Testsysteme kommen insbesondere responsive Hydrogele für die Entwicklung integrierter Biosensoren in Frage. Diese vereinen vergleichbar mit PDA-Polymeren die molekulare Erkennung des Pathogens und die direkte sichtbare Signalgebung. Durch Anbindung des Analyten können Hydrogele zwischen einem expandierten und einem kollabierten Zustand schalten, was direkt durch Eintrübung des Hydrogels sichtbar ist. Daneben eröffnen Hydrogele weitere Möglichkeiten der Signalgenerierung, z.B. durch Einbringen von Fluoreszenzfarbstoffen und Quencher. Des Weiteren führt der Kollaps des Gels zur Verdrängung des Lösemittels (z.B. Wasser), welches wiederum mittels feuchtigkeitssensitiver Farbstoffe nachgewiesen werden könnte. Diese Ansätze sollen schließlich zu influenzadetektierenden Schnelltests weiterentwickelt werden, die ein auch vom Laien identifizierbares Signal generieren, flächendeckend eingesetzt werden können und kostengünstig sind.

Als weitere Möglichkeit zur Signalgenerierung könnte nach erfolgter Bindung des Virus an eine peptidmodifizierte Oberfläche der Nachweis des Virus über seine Neuraminidase-Aktivität erfolgen. Der etablierte Assay zur allgemeinen enzymatischen Charakterisierung der Neuraminidase beinhaltet den Umsatz des spezifischen Substrates MUNANA zu Methylumbelliferon, welches schließlich über seine Fluoreszenz nachzuweisen ist. Dadurch

## 6 Ausblick

wäre in einem biosensorischen System, neben der spezifischen Ankopplung des Virus an ein Rezeptormolekül, ein weiterer influenzaspezifischer Analyseschritt möglich.

Aufgrund der unterschiedlichen Interaktion verschiedener Influenzastämme und -serotypen mit verschiedenen Varianten des Peptids PeB, können stammdifferenzierende Microarrays entwickelt werden. Durch Kombination mehrerer Peptide, die je nach Stamm stark differierende Signalintensitäten erzeugen, könnte so ein Serotypisierungstest entwickelt werden, der im Gegensatz zur bisherigen molekularbiologischen Serotypisierung direkt die Oberflächenproteine des Virus adressiert. Durch Integration des Tests in automatische Diagnostikplattformen mit anschließender selbstständiger Datenauswertung könnte auf diese Art in wenigen Minuten eine patientennahe Serotypisierung erfolgen. Dies wäre sowohl für eine Therapieentscheidung wichtig, als auch dafür, ob ein Patient wegen der Erkrankung an einen hochinfektösen Stamm isoliert werden muss.

Die gefundenen Peptide stellen damit einen Ausgangspunkt für verschiedene Anwendungen in der Influenzadiagnostik und -therapie dar, was mit der Hoffnung verbunden ist letztendlich die Behandlungsoptionen einer Influenzaerkrankung zu verbessern.

**Literaturverzeichnis**

1. Grienke, U. *et al.* Influenza neuraminidase: a druggable target for natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29, 11–36 (2012).
2. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 15–22 (2006).
3. Gao, R. *et al.* Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N. Engl. J. Med.* 368, 1888–1897 (2013).
4. Dawood, F. S. *et al.* Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 2605–2615 (2009).
5. Wang, T. T. & Palese, P. Unraveling the mystery of swine influenza virus. *Cell* 137, 983–985 (2009).
6. Yang, S. *et al.* Avian-origin influenza A(H7N9) infection in influenza A(H7N9)-affected areas of China: a serological study. *J. Infect. Dis.* 209, 265–269 (2014).
7. Jefferson, T. *et al.* Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD008965 (2014).
8. Chartrand, C., Leeflang, M. M. G., Minion, J., Brewer, T. & Pai, M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* 156, 500–511 (2012).
9. Buchholz, U., Buda, S., Grüber, A. & Schweiger, B. Abschlussbericht der Influenzasaison 2008/09 (2009).
10. Ngom, B., Guo, Y., Wang, X. & Bi, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1113–1135 (2010).
11. Pavan, S. & Berti, F. Short peptides as biosensor transducers. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 3055–3070 (2012).
12. Mammen, M., Choi, S.-K. & Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 2754–2794 (1998).
13. A.D., M. & A., W. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the 'Gold Book')*. (Blackwell Scientific Publications, 1997).
14. Skerra, A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 295–304 (2007).
15. Cai, D. *et al.* A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins. *Nat. Nanotechnol.* 5, 597–601 (2010).
16. Shi, H., Tsai, W. B., Garrison, M. D., Ferrari, S. & Ratner, B. D. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature* 398, 593–597 (1999).
17. Wang, Y. *et al.* Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sens. Actuators B Chem.* 146, 381–387 (2010).
18. Dechtrirat, D., Jetzschmann, K. J., Stöcklein, W. F. M., Scheller, F. W. & Gajovic-Eichelmann, N. Protein Rebinding to a Surface-Confined Imprint. *Adv. Funct. Mater.* 22, 5231–5237 (2012).
19. Kent, S. B. H. Total chemical synthesis of proteins. *Chem. Soc. Rev.* 38, 338 (2009).
20. Lieberman, M. *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013).

21. Petty, S. A. & Decatur, S. M. Experimental Evidence for the Reorganization of  $\beta$ -Strands within Aggregates of the A $\beta$ (16–22) Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 13488–13489 (2005).
22. Berg, J. M., Tymoczko & Stryer. *Stryer Biochemie*. (Spektrum, 2012).
23. Janeway, C., Murphy, Kenneth P. *Janeway Immunologie*. (Spektrum, Akad. Verl., 2009).
24. Chen, X., Plasencia, C., Hou, Y. & Neamati, N. Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric RGD Peptide–Paclitaxel Conjugate as a Model for Integrin-Targeted Drug Delivery. *J. Med. Chem.* 48, 1098–1106 (2005).
25. Gordon, Y. J., Romanowski, E. G. & McDermott, A. M. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Curr. Eye Res.* 30, 505–515 (2005).
26. Hamman, J. H., Enslin, G. M. & Kotz, A. F. Oral Delivery of Peptide Drugs: Barriers and Developments. *BioDrugs* 19, 165–177 (2005).
27. Bruns, J. B. *et al.* Epithelial Na<sup>+</sup> Channels Are Fully Activated by Furin- and Prostatin-dependent Release of an Inhibitory Peptide from the  $\alpha$ -Subunit. *J. Biol. Chem.* 282, 6153–6160 (2006).
28. Drucker, D. J. & Nauck, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* 368, 1696–1705 (2006).
29. Han, Y. & Forde, G. Single step purification of plasmid DNA using peptide ligand affinity chromatography. *J. Chromatogr. B* 874, 21–26 (2008).
30. Yang, H., Gurgel, P. V. & Carbonell, R. G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* 1216, 910–918 (2009).
31. Bianying, F. *et al.* A Graphene Oxide-Based Fluorescent Biosensor for the Analysis of Peptide–Receptor Interactions and Imaging in Somatostatin Receptor Subtype 2 Overexpressed Tumor Cells. *Anal. Chem.* 85, 7732–7737 (2013).
32. Li, R. *et al.* Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. *Electrochimica Acta* 109, 233–237 (2013).
33. Pizzoni, D. *et al.* Selection of peptide ligands for piezoelectric peptide based gas sensors arrays using a virtual screening approach. *Biosens. Bioelectron.* 52, 247–254 (2014).
34. Lodish, H. F. *Molecular cell biology*. (W.H. Freeman, 2000).
35. Schalley, C. A. *Analytical methods in supramolecular chemistry*. (Wiley-VCH, 2007).
36. Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. & Poljak, R. J. The structural basis of antigen-antibody recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16, 139–159 (1987).
37. Moreau, V., Granier, C., Villard, S., Laune, D. & Molina, F. Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. *Bioinformatics* 22, 1088–1095 (2006).
38. Fasting, C. *et al.* Multivalency as a chemical organization and action principle. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 10472–10498 (2012).
39. Valiokas, R. *et al.* Differential Protein Assembly on Micropatterned Surfaces with Tailored Molecular and Surface Multivalency. *ChemBioChem* 7, 1325–1329 (2006).
40. Ponader, D. *et al.* Carbohydrate-Lectin Recognition of Sequence-Defined Heteromultivalent Glycooligomers. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 2008–2016 (2014).

41. Krishnamurthy, V. M., Bohall, B. R., Semetey, V. & Whitesides, G. M. The Paradoxical Thermodynamic Basis for the Interaction of Ethylene Glycol, Glycine, and Sarcosine Chains with Bovine Carbonic Anhydrase II: An Unexpected Manifestation of Enthalpy/Entropy Compensation. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5802–5812 (2006).
42. Rusmini, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* 8, 1775–1789 (2007).
43. Ratner, B. D. & Bryant, S. J. BIOMATERIALS: Where We Have Been and Where We are Going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6, 41–75 (2004).
44. Hutsell, S. Q., Kimple, R. J., Siderovski, D. P., Willard, F. S. & Kimple, A. J. High-affinity immobilization of proteins using biotin- and GST-based coupling strategies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 627, 75–90 (2010).
45. Costa, F., Carvalho, I. F., Montelaro, R. C., Gomes, P. & Martins, M. C. L. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* 7, 1431–1440 (2011).
46. Bagheri, M., Beyermann, M. & Dathe, M. Immobilization Reduces the Activity of Surface-Bound Cationic Antimicrobial Peptides with No Influence upon the Activity Spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1132–1141 (2009).
47. Reineke, U., Hoffmueller, U. & Schneider-Mergener, J. Preparation and identification of polytopic peptide, useful e.g. therapeutically and for detecting antigens or antibodies, by linking fragments of a protein and testing for specific binding. *Patent DE 19831429 A1* (2000).
48. Chauhan, A. K. & Varma. *A textbook of molecular biotechnology*. (I.K. International Pub. House, 2009).
49. Ardjomandi, N. *et al.* Indirect coating of RGD peptides using a poly-L-lysine spacer enhances jaw periosteal cell adhesion, proliferation, and differentiation into osteogenic tissue. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 2034–2044 (2012).
50. Alois, J. A peptide with an affinity for clotting factor viii. *Patent WO1999014232 A1* (1999).
51. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315–1317 (1985).
52. Brissette, R. & Goldstein, N. I. The use of phage display peptide libraries for basic and translational research. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 383, 203–213 (2007).
53. Vanlandschoot, P. *et al.* Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral Res.* 92, 389–407 (2011).
54. Stech, M. *et al.* Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system. *J. Biotechnol.* 164, 220–231 (2012).
55. Chaikuad, A. *et al.* Structure of cyclin G-associated kinase (GAK) trapped in different conformations using nanobodies. *Biochem. J.* 459, 59–69 (2014).
56. Laune, D. *et al.* Systematic exploration of the antigen binding activity of synthetic peptides isolated from the variable regions of immunoglobulins. *J. Biol. Chem.* 272, 30937–30944 (1997).
57. Laune, D. *et al.* Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunol. Methods* 267, 53–70 (2002).

58. Timmerman, P. *et al.* A Combinatorial Approach for the Design of Complementarity-determining Region-derived Peptidomimetics with in Vitro Anti-tumoral Activity. *J. Biol. Chem.* 284, 34126–34134 (2009).
59. Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217–9232 (1992).
60. Katz, C. *et al.* Studying protein–protein interactions using peptide arrays. *Chem. Soc. Rev.* 40, 2131 (2011).
61. Andersson, L. *et al.* Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* 55, 227–250 (2000).
62. McAlpine, M. C. & Mannoor, M. S. Use and making of biosensors utilizing antimicrobial peptides for highly sensitive biological monitoring. (2012).
63. Wang, J. *et al.* Rapid Detection of Pathogenic Bacteria and Screening of Phage-Derived Peptides Using Microcantilevers. *Anal. Chem.* 86, 1671–1678 (2014).
64. Kulagina, N. V., Lassman, M. E., Ligler, F. S. & Taitt, C. R. Antimicrobial Peptides for Detection of Bacteria in Biosensor Assays. *Anal. Chem.* 77, 6504–6508 (2005).
65. Bier, F. F., Reiss, E. & Stöcklein, W. F. M. Signal-emitting binding molecules, devices and method for the use thereof. (2011).
66. Ruigrok, R. W., Andree, P. J., Hooft van Huysduynen, R. A. & Mellema, J. E. Characterization of three highly purified influenza virus strains by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 65 ( Pt 4), 799–802 (1984).
67. Luo, M. Influenza virus entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 726, 201–221 (2012).
68. Wiley, D. C. & Skehel, J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 365–394 (1987).
69. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 56, 152–179 (1992).
70. Nelson, M. I. & Holmes, E. C. The evolution of epidemic influenza. *Nat. Rev. Genet.* 8, 196–205 (2007).
71. Corti, D. & Lanzavecchia, A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 705–742 (2013).
72. Laursen, N. S. & Wilson, I. A. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses. *Antiviral Res.* 98, 476–483 (2013).
73. Knossow, M. & Skehel, J. J. Variation and infectivity neutralization in influenza. *Immunology* 119, 1–7 (2006).
74. Wilson, I. A. & Cox, N. J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 737–771 (1990).
75. Yen, H.-L. & Webster, R. G. Pandemic influenza as a current threat. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 333, 3–24 (2009).
76. Smith, W., Andrewes, C. & Laidlaw, P. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 66–68 (1933).
77. Amano, Y. & Cheng, Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 156–164 (2005).
78. Hiroshi, O., Mitsuo, S., Seiya, S., Kyoko, H. & Seihachiro, N. Single radial complement fixation test using NP-containing plates: a simple and sensitive method for the detection of influenza infection. *J. Virol. Methods* 15, 151–158 (1987).

79. Rimmelzwaan, G. F., Baars, M., Claas, E. C. & Osterhaus, A. D. Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication in vitro. *J. Virol. Methods* 74, 57–66 (1998).
80. Donald, H. B. & Isaacs, A. Counts of influenza virus particles. *J. Gen. Microbiol.* 10, 457–464 (1954).
81. Kang, K. *et al.* Development of Rapid Immunochromatographic Test for Hemagglutinin Antigen of H7 Subtype in Patients Infected with Novel Avian Influenza A (H7N9) Virus. *PLoS ONE* 9, e92306 (2014).
82. CLIAwaived. BinaxNOW® Influenza A&B Test Kit. Kit Product Instructions. at <[http://www.cliawaived.com/web/items/pdf/INV-416-110-Influenza\\_Flu\\_Binaxnow\\_Testing~565file1.pdf](http://www.cliawaived.com/web/items/pdf/INV-416-110-Influenza_Flu_Binaxnow_Testing~565file1.pdf)>
83. Gamblin, S. J. & Skehel, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 285, 28403–28409 (2010).
84. Mair, C. M., Ludwig, K., Herrmann, A. & Sieben, C. Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1153–1168 (2014).
85. Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569 (2000).
86. Imai, M., Mizuno, T. & Kawasaki, K. Membrane Fusion by Single Influenza Hemagglutinin Trimers: Kinetic Evidence from Image Analysis of Hemagglutinin-Reconstituted Vesicles. *J. Biol. Chem.* 281, 12729–12735 (2006).
87. Papp, I. *et al.* Inhibition of Influenza Virus Infection by Multivalent Sialic-Acid-Functionalized Gold Nanoparticles. *Small* 6, 2900–2906 (2010).
88. Cross, K. J., Langley, W. A., Russell, R. J., Skehel, J. J. & Steinhauer, D. A. Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein Pept. Lett.* 16, 766–778 (2009).
89. Tong, S. *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 4269–4274 (2012).
90. Tong, S. *et al.* New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* 9, e1003657 (2013).
91. Puzelli, S. *et al.* Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 863–865 (2010).
92. Yasugi, M. *et al.* Frequency of D222G and Q223R Hemagglutinin Mutants of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus in Japan between 2009 and 2010. *PLoS ONE* 7, e30946 (2012).
93. Eckert, D. M. & Kay, M. S. Stalking influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13563–13564 (2010).
94. Gamblin, S. J. *et al.* The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* 303, 1838–1842 (2004).
95. Martín, J. *et al.* Studies of the binding properties of influenza hemagglutinin receptor-site mutants. *Virology* 241, 101–111 (1998).
96. Xiong, X. *et al.* Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. *Nature* 497, 392–396 (2013).

97. Corti, D. *et al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850–856 (2011).
98. Wiley, D. C., Wilson, I. A. & Skehel, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289, 373–378 (1981).
99. Ndifon, W., Wingreen, N. S. & Levin, S. A. Differential neutralization efficiency of hemagglutinin epitopes, antibody interference, and the design of influenza vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8701–8706 (2009).
100. Edinger, T. O., Pohl, M. O. & Stertz, S. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *J. Gen. Virol.* 95, 263–277 (2014).
101. Vanderlinden, E. & Naesens, L. Emerging antiviral strategies to interfere with influenza virus entry. *Med. Res. Rev.* 34, 301–339 (2014).
102. Whittle, J. R. R. *et al.* Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14216–14221 (2011).
103. Ekiert, D. C. *et al.* Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature* 489, 526–532 (2012).
104. Yoshida, R. *et al.* Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 5, e1000350 (2009).
105. Bizebard, T. *et al.* Refined three-dimensional structure of the Fab fragment of a murine IgG1,lambda antibody. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 768–777 (1994).
106. Fleury, D., Wharton, S. A., Skehel, J. J., Knossow, M. & Bizebard, T. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat. Struct. Biol.* 5, 119–123 (1998).
107. Hultberg, A. *et al.* Llama-Derived Single Domain Antibodies to Build Multivalent, Superpotent and Broadened Neutralizing Anti-Viral Molecules. *PLoS ONE* 6, e17665 (2011).
108. Van Eijk, M. *et al.* Introduction of N-linked glycans in the lectin domain of surfactant protein D: impact on interactions with influenza A viruses. *J. Biol. Chem.* 286, 20137–20151 (2011).
109. Hartshorn, K. L. *et al.* Distinctive anti-influenza properties of recombinant collectin 43. *Biochem. J.* 366, 87–96 (2002).
110. Fleishman, S. J. *et al.* Computational Design of Proteins Targeting the Conserved Stem Region of Influenza Hemagglutinin. *Science* 332, 816–821 (2011).
111. Terabayashi, T., Morita, M., Ueno, M., Nakamura, T. & Urashima, T. Inhibition of influenza-virus-induced cytopathy by sialylglycoconjugates. *Carbohydr. Res.* 341, 2246–2253 (2006).
112. Matsubara, T. *et al.* Sialic Acid-Mimic Peptides As Hemagglutinin Inhibitors for Anti-Influenza Therapy. *J. Med. Chem.* 53, 4441–4449 (2010).
113. Jones, J. C., Turpin, E. A., Bultmann, H., Brandt, C. R. & Schultz-Cherry, S. Inhibition of Influenza Virus Infection by a Novel Antiviral Peptide That Targets Viral Attachment to Cells. *J. Virol.* 80, 11960–11967 (2006).
114. Rajik, M. *et al.* Identification and characterisation of a novel anti-viral peptide against avian influenza virus H9N2. *Virol. J.* 6, 74 (2009).



115. Wu, D., Li, G., Qin, C. & Ren, X. Phage displayed peptides to avian H5N1 virus distinguished the virus from other viruses. *PLoS One* 6, e23058 (2011).
116. Jeon, S. H., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T. & Arnon, R. A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 279, 48410–48419 (2004).
117. Gopinath, S. C. B., Kawasaki, K. & Kumar, P. K. R. Selection of RNA-aptamer against human influenza B virus. *Nucleic Acids Symp. Ser. 2004* 85–86 (2005).
118. Suenaga, E. & Kumar, P. K. R. An aptamer that binds efficiently to the hemagglutinins of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1 and H7N7) and inhibits hemagglutinin–glycan interactions. *Acta Biomater.* 10, 1314–1323 (2014).
119. Li, Q. *et al.* Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides* 32, 1518–1525 (2011).
120. López-Martínez, R., Ramírez-Salinas, G. L., Correa-Basurto, J. & Barrón, B. L. Inhibition of influenza A virus infection in vitro by peptides designed in silico. *PLoS One* 8, e76876 (2013).
121. Schaasfort, R. B. M., Tudos A. J. *Handbook of surface plasmon resonance.* (RSC Pub, 2008).
122. Karlsson, R., Fägerstam, L., Nilshans, H. & Persson, B. Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *J. Immunol. Methods* 166, 75–84 (1993).
123. Wijaya, E. *et al.* Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 15, 208–224 (2011).
124. Zhang, X. *et al.* A new strategy for the preparation of maleimide-functionalised gold surfaces. *Electrochem. Commun.* 12, 1403–1406 (2010).
125. Chehimi, M. M. *Aryl diazonium salts new coupling agents in polymer and surface science.* (Wiley-VCH, 2012).
126. Zhang, X. *et al.* Electrochemical functionalization of gold and silicon surfaces by a maleimide group as a biosensor for immunological application. *Acta Biomater.* 9, 5838–5844 (2013).
127. Azebara, H. *et al.* Fixation and Systematic Dilution of Rotaxane Molecules on Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* 19, 2115–2123 (2003).
128. Tencer, M., Nie, H.-Y. & Berini, P. A contact angle and ToF-SIMS study of SAM–thiol interactions on polycrystalline gold. *Appl. Surf. Sci.* 257, 4038–4043 (2011).
129. Gubareva, L. V., Webster, R. G. & Hayden, F. G. Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Res.* 53, 47–61 (2002).
130. Potier, M., Mameli, L., Bélisle, M., Dallaire, L. & Melançon, S. B. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal. Biochem.* 94, 287–296 (1979).
131. Andresen, H. & Grotzinger, C. Deciphering the Antibodyome - Peptide Arrays for Serum Antibody Biomarker Diagnostics. *Curr. Proteomics* 6, 1–12 (2009).

132. Foong, Y. M., Fu, J., Yao, S. Q. & Uttamchandani, M. Current advances in peptide and small molecule microarray technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 234–242 (2012).
133. Brunner, M. Spektroskopische Eigenschaften kovalent an Glas gebundener Fluoreszenzfarbstoffe und farbstoffmarkierter Peptide. *Dissertation*, Universität Heidelberg (2002).
134. Carpick, R. W., Sasaki, D. Y., Marcus, M. S., Eriksson, M. A. & Burns, A. R. Polydiacetylene films: a review of recent investigations into chromogenic transitions and nanomechanical properties. *J. Phys. Condens. Matter* 16, R679–R697 (2004).
135. Jung, Y. K., Kim, T. W., Jung, C., Cho, D.-Y. & Park, H. G. A Polydiacetylene Microchip Based on a Biotin-Streptavidin Interaction for the Diagnosis of Pathogen Infections. *Small* 4, 1778–1784 (2008).
136. Park, H. K. *et al.* Mixed self-assembly of polydiacetylenes for highly specific and sensitive strip biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 24, 480–484 (2008).
137. Geiger, E., Hug, P. & Keller, B. A. Chromatic Transitions in Polydiacetylene Langmuir-Blodgett Films due to Molecular Recognition at the Film Surface Studied by Spectroscopic Methods and Surface Analysis. *Macromol. Chem. Phys.* 203, 2422–2431 (2002).
138. Bizebard, T. *et al.* Refined three-dimensional structure of the Fab fragment of a murine IgG1,lambda antibody. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 768–777 (1994).
139. Wimley, W. C. & White, S. H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* 3, 842–848 (1996).
140. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit. JMR* 21, 355–400 (2008).
141. Takemoto, D. K., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. A Surface Plasmon Resonance Assay for the Binding of Influenza Virus Hemagglutinin to Its Sialic Acid Receptor. *Virology* 217, 452–458 (1996).
142. Schofield, D. J. & Dimmock, N. J. Determination of affinities of a panel of IgGs and Fabs for whole enveloped (influenza A) virions using surface plasmon resonance. *J. Virol. Methods* 62, 33–42 (1996).
143. Cordier, F. & Grzesiek, S. Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by high-resolution NMR. *J. Mol. Biol.* 317, 739–752 (2002).
144. Dougherty, R. C. Temperature and pressure dependence of hydrogen bond strength: A perturbation molecular orbital approach. *J. Chem. Phys.* 109, 7372 (1998).
145. Nag, A., Chakraborty, D. & Chandra, A. Effects of ion concentration on the hydrogen bonded structure of water in the vicinity of ions in aqueous NaCl solutions. *J. Chem. Sci.* 120, 71–77 (2008).
146. Tobias, D. J. & Hemminger, J. C. CHEMISTRY: Getting Specific About Specific Ion Effects. *Science* 319, 1197–1198 (2008).
147. Guarnaccia, T. *et al.* Antigenic drift of the pandemic 2009 A(H1N1) influenza virus in A ferret model. *PLoS Pathog.* 9, e1003354 (2013).
148. Sauter, N. K. *et al.* Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and x-ray crystallography. *Biochemistry (Mosc.)* 31, 9609–9621 (1992).

149. Umemura, M. *et al.* One-step synthesis of efficient binding-inhibitor for influenza virus through multiple addition of sialyloligosaccharides on chitosan. *Carbohydr. Polym.* 81, 330–334 (2010).
150. Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S. & Van Halbeek, H. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 263, 18253–18268 (1988).
151. Thaysen-Andersen, M., Mysling, S. & Højrup, P. Site-Specific Glycoprofiling of N-Linked Glycopeptides Using MALDI-TOF MS: Strong Correlation between Signal Strength and Glycoform Quantities. *Anal. Chem.* 81, 3933–3943 (2009).
152. Meng, B., Marriott, A. C. & Dimmock, N. J. The receptor preference of influenza viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 4, 147–153 (2010).
153. Perera, S., Uddin, M. & Hayes, J. A. Salivary lysozyme: A noninvasive marker for the study of the effects of stress on natural immunity. *Int. J. Behav. Med.* 4, 170–178 (1997).
154. Böttcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., van Heel, M. & Stark, H. Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett.* 463, 255–259 (1999).
155. Reed, J. & Reed, T. A. A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 254, 36–40 (1997).
156. Cox, J. A. *et al.* Calcium and Magnesium Binding to Human Centrin 3 and Interaction with Target Peptides †. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 840–850 (2005).
157. Bosshard, H. R. Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 16, 171–173 (2001).
158. Li, S., Eghiaian, F., Sieben, C., Herrmann, A. & Schaap, I. A. T. Bending and Puncturing the Influenza Lipid Envelope. *Biophys. J.* 100, 637–645 (2011).
159. Mulder, A. M. *et al.* Toolbox for Non-Intrusive Structural and Functional Analysis of Recombinant VLP Based Vaccines: A Case Study with Hepatitis B Vaccine. *PLoS ONE* 7, e33235 (2012).
160. Woods, J. M. *et al.* 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1473–1479 (1993).
161. Arnusch, C. J. *et al.* Interference of the galactose-dependent binding of lectins by novel pentapeptide ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1437–1440 (2004).
162. Bao, Y. *et al.* The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information. *J. Virol.* 82, 596–601 (2008).
163. Kew, S. J. & Hall, E. A. H. pH Response of Carboxy-Terminated Colorimetric Polydiacetylene Vesicles. *Anal. Chem.* 78, 2231–2238 (2006).
164. Chen, X., Zhou, G., Peng, X. & Yoon, J. Biosensors and chemosensors based on the optical responses of polydiacetylenes. *Chem. Soc. Rev.* 41, 4610 (2012).
165. Govorkova, E. A., Kodihalli, S., Alymova, I. V., Fanget, B. & Webster, R. G. Growth and immunogenicity of influenza viruses cultivated in Vero or MDCK cells and in embryonated chicken eggs. *Dev. Biol. Stand.* 98, 39–51; discussion 73–74 (1999).

## Literaturverzeichnis

166. Gaush, C. R. & Smith, T. F. Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Appl. Microbiol.* 16, 588–594 (1968).
167. Messerschmidt, K. Strukturelle und kinetische Charakterisierung des dual-spezifischen Antikörpers B13-DE1. *Dissertation*, Universität Potsdam (2007).

## Anhang

### I Peptidvarianten für die SPR-Analyse

**Tabelle 15: Peptide für die Entwicklung substituierter Peptidvarianten (4.2.2).**

<b>Peptid</b>	<b>Ligandendichte [pmol/mm<sup>2</sup>]</b>	<b>Reinheit [%]</b>
KKKKFYDYDVFY	1.17	80
KKKKFYYYDVFY	0.70	70
KKKKFYD <b>P</b> DVFY	0.56	80
KKKKFYDY <b>P</b> VFY	0.92	85
KKKKFYDYD <b>P</b> FY	0.51	80
KKKKFYDYD <b>Q</b> FY	0.36	80
KKKKFYDYD <b>R</b> FY	0.44	95
KKKKFYDYD <b>V</b> PY	0.35	85
KKKKFYDYD <b>V</b> F <b>P</b>	1.12	85
KKKKFYDYD <b>V</b> F <b>F</b>	0.61	75
KKKKFYDYD <b>V</b> F <b>T</b>	0.40	80
KKKKFYDYD <b>V</b> F <b>N</b>	0.35	85
KKKKFY <b>G</b> YDVFY	0.48	75
KKKKFY <b>G</b> YDV <b>F</b> F	0.78	70
KKKKFYYYD <b>V</b> F <b>F</b>	1.73	60
KKKKFY <b>G</b> YD <b>Q</b> FY	0.41	85
KKKKFYYYD <b>Q</b> FY	0.59	75

## II Peptide der Substitutionsanalyse

**Tabelle 16: Peptide der Substitutionsanalyse.** Dargestellt sind alle Peptidsequenzen im Einbuchstabencode, die bei der Microarray-basierten Substitutionsanalyse verwendet wurden.

Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz	Nr.	Sequenz
1	ARDAYDYDVFFYYAMD	53	ARDFYRYDVFFYYAMD	105	ARDFYDYDKFFYYAMD
2	ARDCYDYDVFFYYAMD	54	ARDFYSYDVFFYYAMD	106	ARDFYDYDLFFYYAMD
3	ARDDYDYDVFFYYAMD	55	ARDFYTYDVFFYYAMD	107	ARDFYDYDMFFYYAMD
4	ARDEYDYDVFFYYAMD	56	ARDFVYDVFFYYAMD	108	ARDFYDYDNFFYYAMD
5	ARDFYDYDVFFYYAMD	57	ARDFYWDVFFYYAMD	109	ARDFYDYDPFFYYAMD
6	ARDGYDYDVFFYYAMD	58	ARDFYYYDVFFYYAMD	110	ARDFYDYDQFFYYAMD
7	ARDHYDYDVFFYYAMD	59	ARDFYDADVFFYYAMD	111	ARDFYDYDRFFYYAMD
8	ARDIYDYDVFFYYAMD	60	ARDFYDCDVFFYYAMD	112	ARDFYDYDSFFYYAMD
9	ARDKYDYDVFFYYAMD	61	ARDFYDDDVFYYAMD	113	ARDFYDYDTFFYYAMD
10	ARDLYDYDVFFYYAMD	62	ARDFYDEDVFYYAMD	114	ARDFYDYDWFYYAMD
11	ARDMYDYDVFFYYAMD	63	ARDFYDFDVFFYYAMD	115	ARDFYDYDYFFYYAMD
12	ARDNYDYDVFFYYAMD	64	ARDFYDGDVFYYAMD	116	ARDFYDYDVAFFYYAMD
13	ARDPYDYDVFFYYAMD	65	ARDFYDHDVFYYAMD	117	ARDFYDYDVCFFYYAMD
14	ARDQYDYDVFFYYAMD	66	ARDFYDIDVFYYAMD	118	ARDFYDYDVDFFYYAMD
15	ARDRYDYDVFFYYAMD	67	ARDFYDKDVFFYYAMD	119	ARDFYDYDVEFFYYAMD
16	ARDSYDYDVFFYYAMD	68	ARDFYDLDVFFYYAMD	120	ARDFYDYDVGFFYYAMD
17	ARDTYDYDVFFYYAMD	69	ARDFYDMDVFYYAMD	121	ARDFYDYDVHFFYYAMD
18	ARDVYDYDVFFYYAMD	70	ARDFYDNDVFYYAMD	122	ARDFYDYDVIFFYYAMD
19	ARDWYDYDVFFYYAMD	71	ARDFYDNDVFYYAMD	123	ARDFYDYDVKFFYYAMD
20	ARDYYDYDVFFYYAMD	72	ARDFYDQDVFFYYAMD	124	ARDFYDYDVLFFYYAMD
21	ARDFADYDVFFYYAMD	73	ARDFYDRDVFFYYAMD	125	ARDFYDYDVMFFYYAMD
22	ARDFCDYDVFFYYAMD	74	ARDFYDSDVFFYYAMD	126	ARDFYDYDVNFFYYAMD
23	ARDFDDYDVFFYYAMD	75	ARDFYDTDVFYYAMD	127	ARDFYDYDVPFFYYAMD
24	ARDFEDYDVFFYYAMD	76	ARDFYDVDVFYYAMD	128	ARDFYDYDVQFFYYAMD
25	ARDFFDYDVFFYYAMD	77	ARDFYDWDVFYYAMD	129	ARDFYDYDVRFFYYAMD
26	ARDFGDYDVFFYYAMD	78	ARDFYDYAVFFYYAMD	130	ARDFYDYDVSFFYYAMD
27	ARDFHDYDVFFYYAMD	79	ARDFYDYCVFFYYAMD	131	ARDFYDYDVTFFYYAMD
28	ARDFIDYDVFFYYAMD	80	ARDFYDYEVFYYAMD	132	ARDFYDYDVVFFYYAMD
29	ARDFKYDVFFYYAMD	81	ARDFYDYFVFYYAMD	133	ARDFYDYDVWFFYYAMD
30	ARDFLDYDVFFYYAMD	82	ARDFYDYGVFFYYAMD	134	ARDFYDYDVYFFYYAMD
31	ARDFMDYDVFFYYAMD	83	ARDFYDYHVFYYAMD	135	ARDFYDYDVFAFFYYAMD
32	ARDFNDYDVFFYYAMD	84	ARDFYDYIVFFYYAMD	136	ARDFYDYDVFCFFYYAMD
33	ARDFPDYDVFFYYAMD	85	ARDFYDYKVFYYAMD	137	ARDFYDYDVFDFYYAMD
34	ARDFQDYDVFFYYAMD	86	ARDFYDYLVFFYYAMD	138	ARDFYDYDVFEFFYYAMD
35	ARDFRDYDVFFYYAMD	87	ARDFYDYMVFFYYAMD	139	ARDFYDYDVFFFFYYAMD
36	ARDFSDYDVFFYYAMD	88	ARDFYDYNVFYYAMD	140	ARDFYDYDVFGFFYYAMD
37	ARDFTDYDVFFYYAMD	89	ARDFYDYPVFYYAMD	141	ARDFYDYDVFHFFYYAMD
38	ARDFVDYDVFFYYAMD	90	ARDFYDYQVFYYAMD	142	ARDFYDYDVFIFFYYAMD
39	ARDFWDYDVFFYYAMD	91	ARDFYDYRVFFYYAMD	143	ARDFYDYDVFKFFYYAMD
40	ARDFYAYDVFFYYAMD	92	ARDFYDYSVFYYAMD	144	ARDFYDYDVFLFFYYAMD
41	ARDFYCYDVFFYYAMD	93	ARDFYDYTVFFYYAMD	145	ARDFYDYDVFMFFYYAMD
42	ARDFYEYDVFFYYAMD	94	ARDFYDYVVFYYAMD	146	ARDFYDYDVFNFFYYAMD
43	ARDFYFYDVFFYYAMD	95	ARDFYDYWVFYYAMD	147	ARDFYDYDVFPFFYYAMD
44	ARDFYGYDVFFYYAMD	96	ARDFYDYXVFYYAMD	148	ARDFYDYDVFQFFYYAMD
45	ARDFYHYDVFFYYAMD	97	ARDFYDYDAFFYYAMD	149	ARDFYDYDVFRFFYYAMD
46	ARDFYIYDVFFYYAMD	98	ARDFYDYDCFYYAMD	150	ARDFYDYDVFSFFYYAMD
47	ARDFYKYDVFFYYAMD	99	ARDFYDYDDFFYYAMD	151	ARDFYDYDVFTFFYYAMD
48	ARDFYLYDVFFYYAMD	100	ARDFYDYDEFYYAMD	152	ARDFYDYDVFFVFFYYAMD
49	ARDFYMYDVFFYYAMD	101	ARDFYDYDFFFYYAMD	153	ARDFYDYDVFWFFYYAMD
50	ARDFYNYDVFFYYAMD	102	ARDFYDYDGFYYAMD		
51	ARDFYPYDVFFYYAMD	103	ARDFYDYDHFYYAMD		
52	ARDFYQYDVFFYYAMD	104	ARDFYDYDIFYYAMD		

## III weitere Ergebnisse der Substitutionsanalyse

	F	Y	D	Y	D	V	F	Y
A	-60	-15	6	10	-54	-47	-49	-25
C	-10	-8	-4	15	-24	-10	3	-59
D	3	-7	0	-1	0	34	61	-11
E	-14	-9	-5	-76	-48	-6	-36	-70
F	0	-10	25	-62	-60	-51	0	-52
G	-14	-29	20	-39	-48	-14	-9	-25
H	11	-18	6	-72	-34	-41	-70	-69
I	10	-19	3	-29	-62	-77	-78	-26
K	7	-10	13	-39	-56	8	-31	-48
L	6	-20	9	-36	-36	-73	-54	-54
M	-14	-16	-5	-54	-67	-58	-73	-25
N	-11	-5	10	-67	-70	-33	-13	20
P	-2	10	4	-46	-65	4	13	1
Q	1	9	20	-38	-41	-31	-26	-19
R	-11	2	12	-54	-65	15	-38	-17
S	-18	-14	4	-71	-60	-6	-21	-35
T	-4	-11	20	-74	-73	-44	-24	-37
V	3	1	10	-68	-46	0	-54	-31
W	17	2	33	-49	-31	-38	-13	2
Y	3	0	9	0	-48	-48	-54	0

	F	Y	D	Y	D	V	F	Y
A	2	30	-12	31	-44	-17	17	51
C	24	53	6	33	-64	-6	20	90
D	39	63	0	41	0	32	61	100
E	30	65	9	51	-13	47	50	102
F	0	14	6	8	-21	-1	0	60
G	14	24	16	18	-47	7	18	66
H	-5	16	8	19	-47	-16	-18	25
I	3	22	13	22	-32	-3	-3	77
K	25	29	7	9	-43	-27	-38	39
L	17	27	22	31	-21	4	9	82
M	8	30	1	68	-41	-6	9	73
N	2	17	10	19	-31	-5	28	42
P	12	39	16	75	-18	52	50	100
Q	8	32	-7	3	-31	21	40	44
R	3	6	-4	3	-37	1	-17	46
S	2	30	-5	27	-56	1	9	56
T	-11	21	15	34	-48	8	16	67
V	-10	12	-4	44	-43	0	14	45
W	9	23	4	16	-42	11	-8	59
Y	-21	0	2	0	-60	-37	-34	0

**Abbildung 35: Ergebnisse des Peptidmicroarrays zur Substitutionsanalyse bei Inkubation von Virusmaterial der Stämme H1N1 (Abbildung links, A/California/07/2009) und VIC (Abbildung rechts, A/Victoria/210/2009).** Dargestellt ist der Mittelwert des Kontrasts ( $n = 3$ ) in Prozent relativ zur Positivkontrolle Fetuin (Originalsequenz FYDYDFY = 0%). Werte kleiner oder gleich Null sind weiß, Werte oberhalb der 90%-Quantile sind dunkelgrau hinterlegt. Im Bereich dazwischen ist der Farbübergang fließend.

#### **IV Neuartige Oberflächen für die SPR-Spektroskopie**

Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie wird üblicherweise auf Gold durchgeführt, da dieses sehr gute plasmonische Eigenschaften aufweist sowie oxidationsbeständig ist. Die direkte Funktionalisierung der Goldoberfläche mit Rezeptoren führt zu verschiedenen Nachteilen für die nachfolgende Analyse (insbesondere unspezifisches Bindungsverhalten, Instabilität der Rezeptoren auf der Oberfläche). Daher wurden für die Immobilisierung verschiedener Rezeptormoleküle (Proteine (insbesondere Antikörper), Nukleotide) ausgereifte Oberflächenmodifikationen entwickelt (z.B. dextranbasiert). Diese garantieren ein niedriges Hintergrundsignal (unspezifische Bindung), einfache chemische Zugänglichkeit funktioneller Gruppen zur orthogonalen Ligandimmobilisierung sowie gegebenenfalls hohe Ligandendichten. Allerdings weisen die kommerziell verfügbaren Oberflächenmodifikationen eine vergleichsweise niedrige Beladungskapazität für Peptidliganden auf, weshalb bereits speziell für die Immobilisierung kleiner Liganden weiterentwickelte Dextranchips angeboten werden (z.B. CM7, GE Healthcare). Des Weiteren werden Dextranmodifizierungen nur speziell für SPR-Analysen auf Gold genutzt. Die Verwendung nur einer einzelnen Modifikation auf verschiedenen Trägermaterialien (z.B. Metalle, Halbmetalle) und für verschiedene Detektionsmethoden (elektrochemisch, optisch) würde allerdings eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener oberflächenabhängiger Analysemethoden erlauben. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Auswahl neuartiger Oberflächenmodifikationen zunächst für die Anwendung zur Charakterisierung von Peptid-Interaktionen auf Goldoberflächen untersucht.

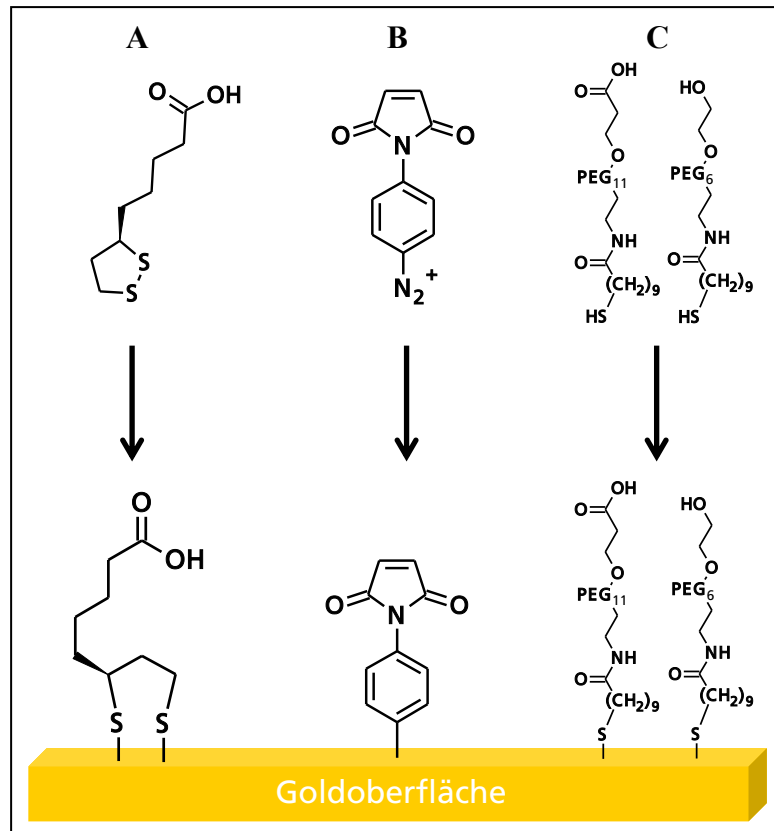
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere, bisher nicht für die SPR-Analytik bzw. nicht für die Charakterisierung von Peptid-Interaktionen verwendete Oberflächenfunktionalisierungen charakterisiert:

- (1) *para*-Maleimidophenyl (*p*-MP)
- (2) gemischte alkylierte Polyethylenglykole (Alkyl-PEGs, mit Carboxyl- bzw. Hydroxylterminus)
- (3) Liponsäure (LS)

Liponsäure-Modifikationen wurden bereits für die Protein-Protein-Analytik mittels SPR verwendet, jedoch nicht für die Charakterisierung von Peptid-Interaktionen. Alkyl-PEGs stellen eine neue Klasse hochstabiler biokompatibler Oberflächenmodifikationen dar (siehe 3.3.1.2). Die *para*-Maleimidophenyl Funktionalisierung unterscheidet sich grundsätzlich von bestehenden schwefelbasierten Chemisorptionsverfahren (Abbildung 36)



und kann auf verschiedenen Trägermaterialien verwendet werden<sup>126</sup>. Sowohl Alkyl-PEGs als auch *p*-MP Modifikationen wurden bisher nicht für die Verwendung in SPR-Experimenten charakterisiert.



**Abbildung 36: Neuartige Oberflächenmodifikationen für SPR.** A: Liponsäure (LS), B: *para*-Maleimidophenyl (*p*-MP), C: Alkylierte Polyethylenglykole (Alkyl-PEGs, (PEG)<sub>x</sub> = (CH<sub>2</sub>O)<sub>x</sub>).

Die Alkyl-PEGs und Liponsäure werden klassisch aus ethanolischer Lösung an Gold gebunden, wodurch selbstorganisierte Monolagen ausgebildet werden. Der Nachweis der Modifikation kann mittels Kontaktwinkelmessungen erbracht werden. Die reine Goldoberflächen besitzt einen Kontaktwinkel (H<sub>2</sub>O) von 88.3±0.6°. Für die Alkyl-PEGs (1:1 Mischung Alkyl-PEG-OH:Alkyl-PEG-COOH) funktionalisierten Goldoberflächen beträgt der Kontaktwinkel 35±2.0°.

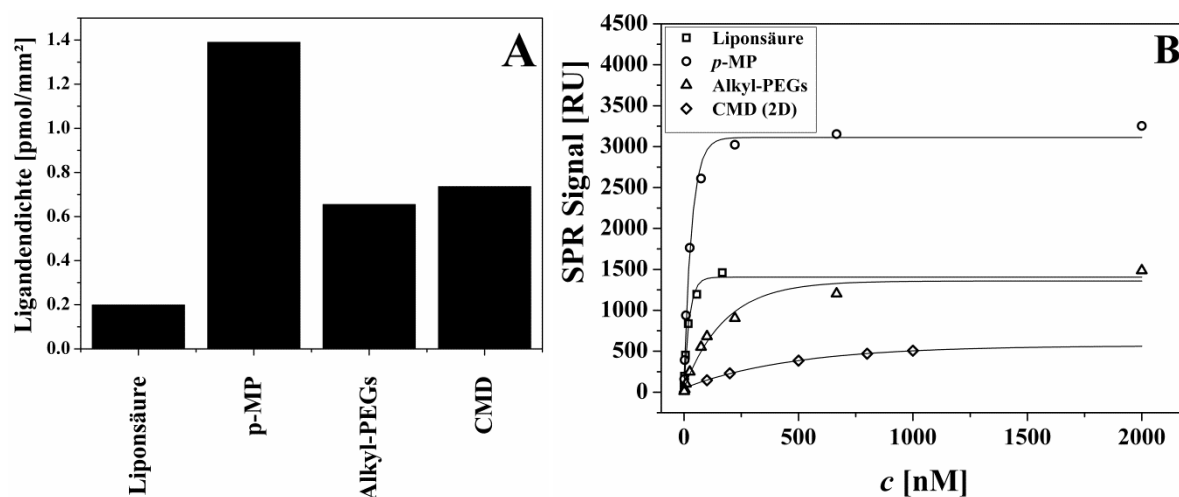
Die *p*-MP-Modifikation wird hingegen durch elektrochemisches Abscheiden unter Ausbildung einer kovalenten Kohlenstoff-Gold-Bindung generiert (Tabelle 17). Die Abscheidung der Ausgangssubstanz *p*-MPDT kann direkt mittels zyklischer Voltammetrie verfolgt werden<sup>124</sup>. Alle verwendeten Oberflächen außer *p*-MP müssen zur Immobilisierung von Liganden voraktiviert werden, sodass eine Kopplungsreaktion aus 3-4 Schritten besteht: i) Aktivierung, ii) Gegebenenfalls Modifizierung, iii) Ligandkopplung, iv) Absättigung/Deaktivierung. Bei *p*-MP sind nur die Schritte iii) und iv) notwendig, da die

Doppelbindung im Maleimid-Rückgrat direkt mit thiol- oder aminhaltigen Verbindungen reagiert.

**Tabelle 17: Eigenschaften der verwendeten neuartigen Oberflächenmodifikationen für SPR.**

	Liponsäure	<i>p</i> -Maleimido-phenyl	Alkyl-PEGs	carboxymethyliertes Dextran
<b>Funktionalisierung</b>	Chemisorption	Elektrochemische Abscheidung	Chemisorption	Chemisorption
<b>Goldbindung</b>	S-Au	C-Au	S-Au	S-Au
<b>Hydrophobizität</b>	-	+/-	-	-
<b>Ladung</b>	negativ	keine	negativ	negativ
<b>Peptidkopplung</b>	Aminkopplung/Thiolkopplung			
	3-4 Schritte	2 Schritte	3-4 Schritte	3-4 Schritte
<b>elektr. Leitfähigkeit</b>	-	vorhanden	-	-

Diese Oberflächen wurden insbesondere im Hinblick auf die Fähigkeit zur funktionalen Immobilisierung von Peptiden an einem Modellsystem getestet. Dieses besteht aus einem Mimotoppeptid MP1 (GPPGMVGDWWDW) und dem bindenden Antikörper Anti-FITC. Der Antikörper bindet das Peptid mit nanomolarer Affinität<sup>54,167</sup>, während die Bindung spezifisch mit dem eigentlichen Antigen Fluoreszein kompetitiv inhibiert werden kann.



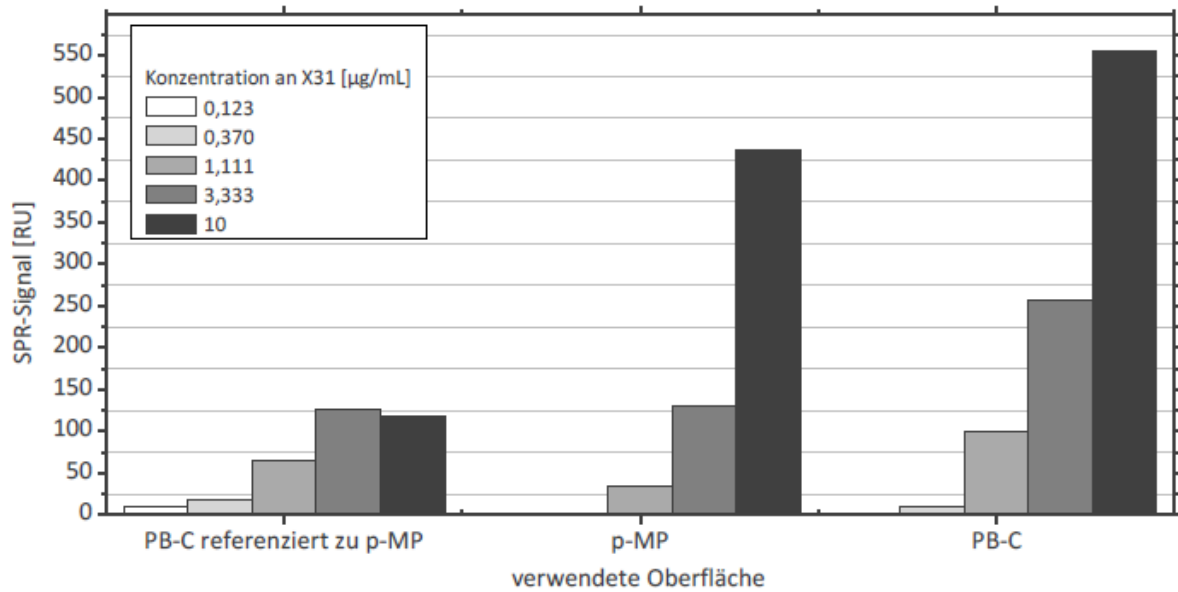
**Abbildung 37: Charakterisierung der Oberflächenmodifikationen anhand des Modellsystems MP1/Anti-FITC.** A: Maximale Ligandkapazität der Oberflächen. B: Konzentrationsabhängige SPR-Signale von Anti-FITC bei jeweils maximaler Ligandendichte.

Für die Immobilisierung mittels Aminkopplung wurde das Peptid Lys-MP1, für Thiolkopplungen Cys-MP1 (

Tabelle 3) eingesetzt. Die höchste Ligandendichte von  $1.39 \text{ pmol/mm}^2$  wird bei *p*-MP beobachtet (Abbildung 37A). Diese liegt etwa doppelt so hoch wie bei einem vergleichbaren kommerziellen carboxymethylierten Dextranchips (CMDP, Xantec bioanalytics). Weiterhin wird bei *p*-MP modifizierten Chips das höchste Bindungssignal beobachtet (Abbildung 37B). Liponsäure- und Alkyl-PEG-modifizierte Oberflächen zeigen ein um den Faktor 2.2 geringeres Maximalsignal, bei CMD liegt es 6.4-fach niedriger als auf *p*-MP. Betrachtet man die Anzahl immobilisierter Peptide pro gebundenem Liganden, so kann eine Aussage über die Ligandaktivität getroffen werden. Für LS wird der im Vergleich niedrigste Wert beobachtet; 19 Peptide pro gebundenem Antikörper. Bei den Alkyl-PEGs sind statistisch gesehen 65, bei *p*-MP 70 und bei CMDP 153 Peptide für die Bindung eines Antikörpers notwendig. Dies zeigt, dass die Präsentation der Peptide auf Liponsäure-modifizierten Chips am besten für die Bindung des bivalenten Antikörpers geeignet war. Bei den weiteren Chips ist offenbar ein größerer Anteil der immobilisierten Peptide nicht im Bindungsereignis involviert beziehungsweise wird innerhalb der primären Oberflächenfunktionalisierung „vergraben“ oder steht durch Interaktion mit der Funktionalisierung nicht mehr für die Bindung des Antikörpers zur Verfügung.

Die *para*-Maleimidophenyl-funktionalisierte Oberfläche wird aufgrund ihres Potentials zur Verwendung mehrerer Auslesemethoden (optisch, elektrochemisch) nun auch für die Detektion der Peptid-Virus-Interaktion verwendet.

Aufgrund der festgestellten positiven Eigenschaften der *para*-Maleimidophenyl-funktionalisierten Oberflächen wurden diese zusätzlich für die Detektion von Influenzaviren genutzt. Analog zu den Experimenten auf kommerziellen Oberflächen (s. 4.1.2) wurde das Peptid PeB (C-SGSG-FYDYDVFY) auf *p*-MP Chips immobilisiert und anschließend das konzentrationsabhängige Bindungssignal von X31-Viren detektiert (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Bindung von X31 Viren an immobilisiertes Peptid PeB auf *para*-Maleimidophenyl-funktionalisierten SPR-Oberflächen.**

Die Interaktion des Virus mit der peptidmodifizierten Oberfläche wird ab einer Konzentration von 123 ng/ml detektiert. Somit wird bei Verwendung dieser Oberflächenmodifikation eine vergleichbare Nachweisgrenze wie auf kommerziellen dextranbasierten Chips beobachtet. Das SPR-Signal steigt konzentrationsabhängig an, wobei bereits bei 10 µg/ml die Sättigung erreicht ist. Bei der Virus-Peptid-Interaktion wird trotz Absättigung der Oberfläche mit Cystein und BSA ein hohes unspezifisches Signal (30-75%) auf der nichtmodifizierten Referenzfließzelle detektiert. Dies hängt wahrscheinlich mit dem eher hydrophoben Charakter der zugrundeliegenden *p*-MP Modifikation zusammen. Hier besteht weiterer Modifizierungsbedarf des Phenylrückgrats des *p*-MP (z.B. Hydroxilierung), um bessere Antifoulingeneigenschaften zu generieren.

## Publikationen und Patente

Manuskripte erschienen oder in Druck:

M. Hovestädt\*, **H. Memczak\***, D. Pleiner, X. Zhang, J. Rappich, F.F. Bier, W.F.M. Stöcklein. Characterization of a new maleimido functionalization of gold for surface plasmon resonance spectroscopy. *Journal of Molecular Recognition* 2014, *in Druck*.

Manuskripte in Vorbereitung:

**H. Memczak\***, D. Lauster\*, P. Kar\*, V. Knecht, W.F.M. Stöcklein, E. Ehrentreich-Förster, A. Herrmann, F.F. Bier. Anti-hemagglutinin antibody derived peptides for influenza virus binding and inhibition. *Nanomedicine*, *in Vorbereitung*.

**H. Memczak**, W.F.M. Stöcklein, E. Ehrentreich-Förster, F.F. Bier, D. Lauster, A. Herrmann. Peptides for binding influenza viruses and inhibition of influenza virus infection. Internationale Patentanmeldung (PCT), *in Vorbereitung*.

\*gleichermaßen beigetragen



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Frank Bier für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Doktorarbeit, seine Unterstützung und Interesse danken.

Frau Dr. Eva Ehrentreich-Förster danke ich für die Begleitung meiner Arbeit und ihre administrativen Verdienste, die einen reibungslosen Ablauf des Projekts ermöglichten, und die immer ein offenes Ohr für eigene Vorstellungen hatte und Hilfe bei Problemen jeglicher Art zur Verfügung stellte.

Besondere Dankbarkeit möchte ich Herrn Dr. Walter Stöcklein ausdrücken. Für seine Ideen, seine Motivation, seine Leistungen als Lehrender, seine Unterstützung in allen praktischen Belangen und vor allem für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt meinen Kooperationspartnern, ohne die die Umsetzung des Projektes schlicht unmöglich gewesen wäre. Danken möchte ich im Besonderen Prof. Dr. Andreas Herrmann, Dr. Christian Sieben und Daniel Lauster von der Humboldt-Universität zu Berlin für die Durchführung der Infektionsexperimente, die Bereitstellung der Influenzaviren sowie die zahlreichen interessanten und anregenden Gespräche. Mein Dank gilt auch Dr. Volker Knecht und Dr. Parimal Kar für die Ausführung der Molekulardynamik-Simulationen und die Sensibilisierung für theoretische Interaktionsanalysen. Ich danke Dr. Christian Heise von der PolyAn GmbH für die immer offene Zusammenarbeit zur Umsetzung gemeinsamer Ideen und interessante Diskussionen.

Besonderer Dank gilt Qi Zhang, Dennis Pleiner und Juliane Naumann, welche in ihren Abschlussarbeiten und Forschungspraktika das Projekt tatkräftig unterstützt und mit großem eigenen Einsatz vorangebracht haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. F.W. Herberg von der Universität Kassel und Frau Prof. Dr. K. Arndt von der Universität Potsdam für die Gutachten dieser Arbeit.

Herrn Dr. Marc Hovestädt danke ich für eine sehr anregende Zeit, viele neue Ideen und der beharrlichen Auseinandersetzung mit der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt Alexander Christmann für die Durchführung der AFM-Aufnahmen, Michaela Schellhase und Dirk Michel für das Spotten der Microarrays, Erik Rümpel für die Messungen am faseroptischen Sensor, Katja Pratsch für die Hilfe am Biacore FlexChip, Jörg Henkel und Christian Warnt für den Peptidsynthese-Service, Dr. Nadin Jahnke (Universität Potsdam) für die Unterstützung der CD-Messungen, Dr. K. Zierenberg (GlaxoSmithKline, Dresden) und dem Team von der BAD Gesundheitsvorsorge Potsdam für die Bereitstellung von Impfstoffmaterialien sowie Melanie Riedel und Dr. Maria Samalikova für die massenspektrometrischen Messungen.

Den jetzigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in Potsdam-Golm Matthias Gießner, Kai Wunderlich, Katja Uhlig,

## Danksagung

Beate Morgenstern und Robert Wellhausen danke ich für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IBMT für die sehr schöne Zeit, Hilfsbereitschaft und den guten Kontakt.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für die immerwährende Unterstützung, das Verständnis und den wichtigen Rückhalt.

Meinen Kindern danke ich für die stete Lebensfreude und Begeisterungsfähigkeit, das Lachen und Trösten und den Zusammenhalt.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau Anna. Für alles.

*Die vorliegende Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Initiative „Spitzenforschung und Innovation in den neuen Ländern“ im Projekt „Taschentuchlabor - Impulszentrum für integrierte Bioanalyse“ (FKZ 03 IS2201 A) gefördert.*



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Ich habe mich auch früher um keine Promotion bemüht. Ferner versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Potsdam, 24. Juni 2014

Henry Memczak