

3. Ergebnisse

3. 1 Umwandlung antigener CB4-1 Peptidepitope durch schrittweisen Austausch

Der monoklonale murine Antikörper CB4-1 (Grunow et al., 1990; Höhne et al., 1993) kann mehrere sequentiell unterschiedliche Peptidantigene erkennen (Kramer et al., 1997). Ähnlich wie das originale Epitop GATPQDLNTML (aus dem p24-Capsidprotein von HIV-1) bindet das verwandte Peptid GATPEDLNQKL (homologes Peptid oder **h-pep**) in einer gestreckten Gesamtkonformation in der Bindungstasche der hypervariablen Regionen der leichten und der schweren Kette des Igg2Aκ-Antikörpers (siehe Abb. 15). Zwei weitere, sequentiell völlig unterschiedliche Epitope wurden mittels Positions-Scanning Bibliotheken aufgefunden. Von dem Peptid GLYEWGGARIT (unhomologes Peptid 1 oder **u1-pep**), das mit einer um eine Größenordnung niedrigeren Affinität an den Antikörper bindet, wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse (Keitel et al., 1997) gefunden, daß es im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Peptiden in einer ausgeprägten Loop-Konformation im Komplex vorliegt und andere Kontakte die Bindungsspezifität bestimmen (siehe Abb. 15). Von dem zweiten unhomologen Peptid FDKEWNLIEQN (**u2-pep**) ist es bisher noch nicht gelungen, Ko-Kristalle mit CB4-1 zu gewinnen und eine Struktur zu bestimmen.

Der Antikörper CB4-1 ist offensichtlich in der Lage, mehrere sequentiell und strukturell unterschiedliche Epitope zu erkennen: Er ist polyspezifisch. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß sich diese verschiedenen, für jeweils ein Peptid typischen Spezifitäten schrittweise (d. h. durch Austausch jeweils nur einer Aminosäure) so ineinander umwandeln lassen, daß die Bindung zum Antikörper bei jedem Schritt erhalten bleibt (Hoffmüller et al., 2000). Der Sequenzraum zwischen dem h-pep GATPEDLNQKL und dem u1-pep DGLYEWGGARI (das N-terminale Asp wurde zur Längenkorrektur eingeführt und hat keinen Einfluß auf die Bindung wie auch das C-terminale Abschneiden des Thr) besteht aus $2^{10} = 1024$ unterschiedlichen Peptiden (Position 5 identisch, zwei Möglichkeiten für jede der restlichen 10 Positionen). Um durch schrittweisen Austausch jeweils einer Aminosäure vom h-pep zum u1-pep zu gelangen, gibt es theoretisch $10! = 3\,628\,800$ verschiedene Wege. Eine große Anzahl der möglichen Transitions-Peptide bindet jedoch nicht an CB4-1, so daß die Mehrzahl der Austauschwege uninteressant ist. Durch Analyse aller möglichen Wege konnte ein optimaler Substitutionspfad gefunden, d. h. derjenige, bei dem nach jedem Schritt eine größtmögliche Bindung zum Antikörper beobachtet werden kann (Abb. 3). Bei zunehmender

Substituierung des Ausgangspeptides sinkt die Bindungsaffinität der Mutanten, bis sie bei ca. 10^{-4} M ein Minimum durchschreitet und mit zunehmender Sequenzähnlichkeit mit dem jeweiligen Endpeptid wieder zunimmt. Identische Beobachtungen konnten für die Umwandlung von h-pep in u2-pep sowie von u1-pep in u2-pep gemacht werden, mit dem Unterschied, daß es hier Zwischenstadien gibt, die eine geringfügig höhere Bindungsaffinität aufweisen als ein oder beide Zielpeptide.

In Abb. 2 sind die kompletten Substitutionsanalysen aller Übergangspeptide der drei Umwandlungswege dargestellt. Aus ihnen ergibt sich unmittelbar die Wichtigkeit jeder einzelnen Aminosäure für die Bindung des gesamten Peptids an den Antikörper durch ihre Austauschbarkeit durch physikochemisch ähnliche oder unähnliche Residuen bzw. durch Exklusivität an dieser Position. Beim h-pep ist z. B. Leucin 7 absolut essentiell für die Gesamtbindung, denn es kann durch keine andere Aminosäure ausgetauscht werden, ohne daß die Affinität verschwindet. Leucin 11 kann unter geringem Verlust von Bindungsaffinität durch Isoleucin ersetzt werden; Alanin 2, Aspartat 6 und Asparagin 8 können durch einige ähnliche Aminosäuren ausgetauscht werden. Bei den nachfolgenden fünf Austauschschritten des Umwandlungsweges ist dieses generelle Muster gleichfalls erkennbar, auch wenn die Empfindlichkeit der Austauschbarkeit allgemein zunimmt, besonders bei Prolin 4, das zu einer „harten“ Schlüsselaminosäure wird. Beim Austausch des sehr wichtigen Leucin 7 gegen Glycin im Schritt 6 ändert sich das Substitutionsmuster schlagartig. Jetzt besteht eine starke Präferenz für Isoleucin an Position 11 und die aufeinander folgenden Glycine 7 und 8 werden bindungswichtig, während der N-terminale Bereich in weiten Teilen Austausche toleriert. Dieses Muster bleibt bis zur Umwandlung in das Zielpeptid u1-pep gleich, hinzu kommen noch Leucin 3, Tryptophan 6 und Arginin 10 als Schlüsselreste.

Ein ähnliches, schlagartiges „Umkippen“ des Substitutionsmusters ist auch bei den Umwandlungen h-pep \leftrightarrow u2-pep (Abb. 2) und u1-pep \leftrightarrow u2-pep (Hoffmüller et al., 2000) zu beobachten. Auch hier bleibt das Muster der Schlüsselaminosäuren zunächst über mehrere Austauschschritte ähnlich, um dann plötzlich bei einem Schritt, der mit dem Bindungsaffinitäts-Minimum des Umwandlungsweges korreliert, in ein anderes Substitutionsmuster umzuschlagen. Bei der Umwandlung h-pep \leftrightarrow u2-pep ist dies der Schritt 7, bei dem ein Austausch von Asparagin 8 gegen Isoleucin stattfindet, bei der Konversion u1-pep \leftrightarrow u2-pep der Schritt 6, wo an Position 6 statt Glycin Asparagin eingeführt wird. In jedem der drei Fälle findet an dem Punkt, wo sich die Muster der Substitutionsanalysen schlagartig ändern, ein Austausch einer Aminosäure, die im Ausgangspeptid Schlüsselresidue war, gegen eine andere, die wiederum im Zielpeptid essentiell ist, statt.

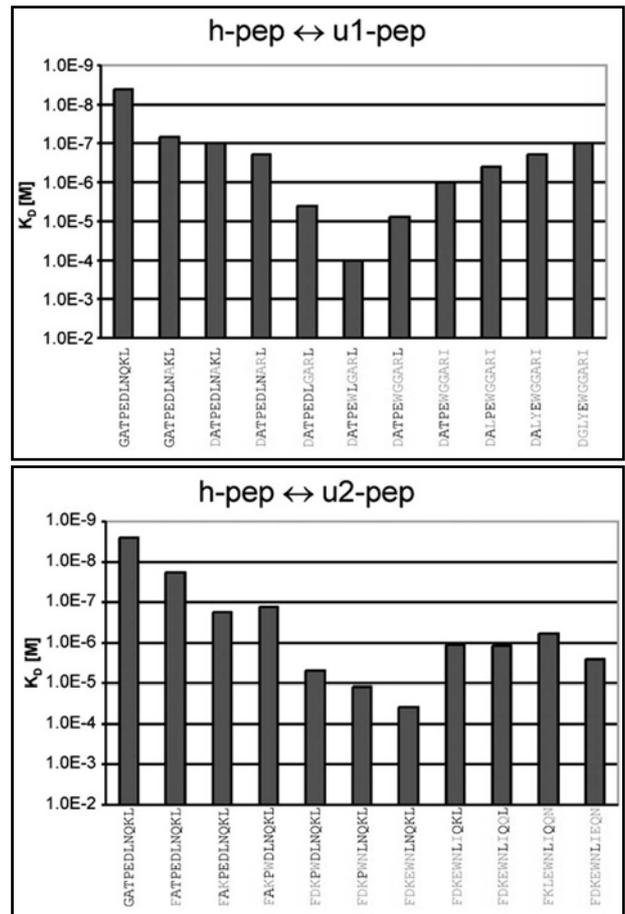
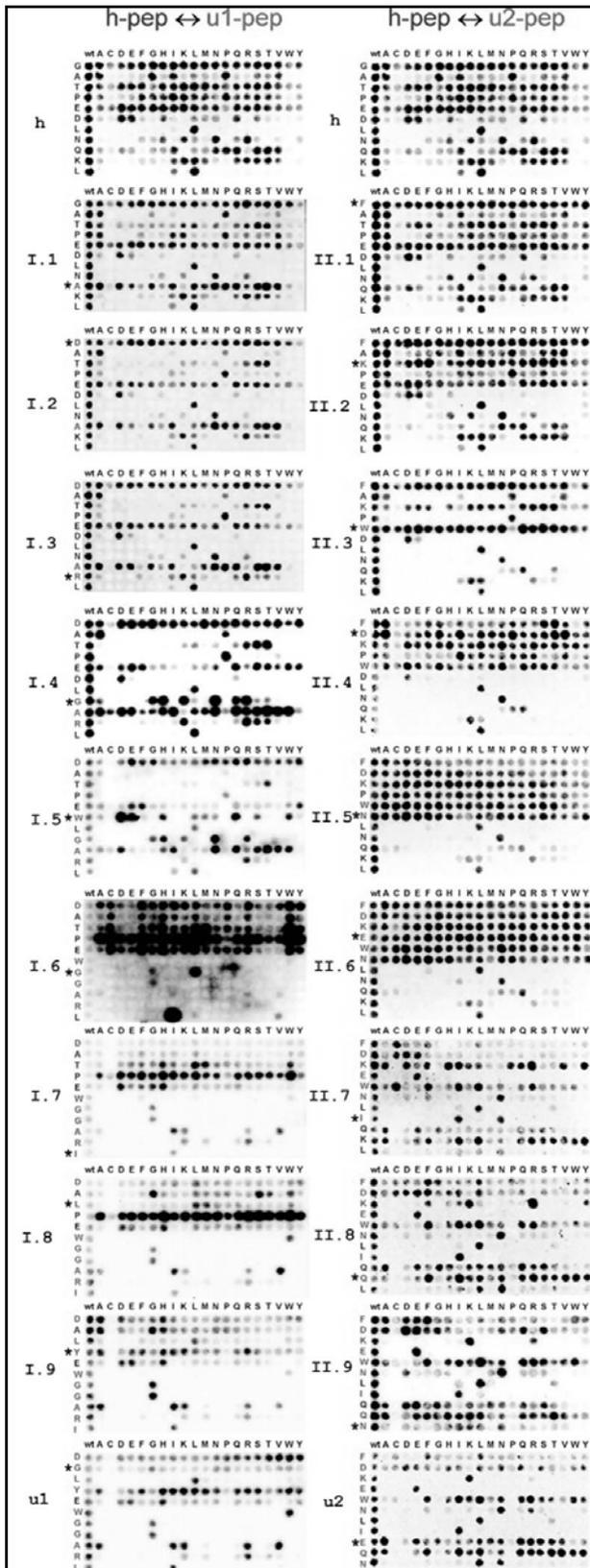


Abb. 3 (rechts). Bindungskonstanten der CB4-1 bindenden Peptide aus den Transformationswegen h-pep↔u1-pep (oben) und h-pep↔u2-pep (unten). Die Bindungsdaten wurden mittel kompetitiven ELISA gegen das p24 Capsid-Protein von HIV-1 ermittelt.

Abb. 2 (links). Substitutionsanalysen der CB4-1 bindenden Peptide aus den Transformationswegen h-pep↔u1-pep (I) und h-pep↔u2-pep (II). Die jeweils zum Vorgängerpeptid ausgetauschten Positionen sind durch * gekennzeichnet. In allen Reihen der Substitutionsanalysen ist die jeweils links notierte Position durch die jeweils oben genannten natürlichen L-Aminosäuren ausgetauscht, während der Rest der Peptidsequenz unverändert ist. Die Schwärzung eines Peptidpunktes korrespondiert innerhalb einer Substitutionsanalyse mit der Bindungsaffinität an den Antikörper. Die jeweils linke Spalte (wt) beinhaltet ausschließlich die nichtsubstituierten Sequenzen.

Im folgenden werden Zwischenpeptide der Umwandlung h-pep \leftrightarrow u1-pep mit **pepI.X** bezeichnet (z. B. ist pepI.4 der vierte Einzelaustausch auf dem Weg vom h-pep zum u1-pep, d. h. DATPEDLGARL) und die der Umwandlung h-pep \leftrightarrow u2-pep mit **pepII.X**.

3. 2 Konformationsraum

Im Prinzip ist es bereits für ein kleines Peptid wegen der großen Anzahl an Freiheitsgraden nicht möglich, den vollständigen Konformationsraum graphisch abzubilden. Zur Darstellung des abgesuchten Konformationsraumes wurden deshalb Analysen der Varianz der ϕ - ψ -Winkelpaare während der Simulation entlang dreier Hauptachsen durchgeführt, die den drei größten Eigenwerten der Distanzmatrix der Referenzstrukturen entsprechen (siehe Material und Methoden). Als Referenzstrukturen wurden möglichst unähnliche Konformationen niedriger Energie gewählt, damit der Konformationsraum entsprechend groß aufgespannt wird. Die Auswahl dafür umfaßte solche Konformationen, die für die Sekundärstruktur motive α -Helix, 3_{10} -Helix (γ -Helix), π -Helix, isolierte β -Brücke und β -Faltblatt jeweils die größte Anzahl der in den einzelnen Motiven einbezogenen Aminosäuren aufwiesen. Dann wurden für jede Konformation entlang der Trajektorie die Koordinaten auf den Hauptachsen in Bezug auf diese fünf Referenzstrukturen bestimmt. Im Prinzip handelt es sich um eine Koordinatentransformation von einem 22-dimensionalen Raum (ϕ - ψ -Paare der 11 Residuen) auf drei Dimensionen. Die erste Hauptachse repräsentiert die Variation entlang des größten Eigenvektors der Referenzdistanzen, die zweite die zweitgrößte usw.

Das Absuchen des Konformationsraumes war in allen Fällen hinreichend vollständig und gleichmäßig (Abb. 5); die Punktwolken, die die einzelnen Konformationen im Raum der Hauptachsen abbilden, sind mit großer Homogenität zwischen den Extrema der Konformationen mit am deutlichsten ausgeprägten Sekundärstrukturelementen verteilt. Die übergroße Anzahl der Konformationen einer Trajektorie sind dabei „random coil“-Strukturen bzw. Strukturen mit Turn-Motiven, deren Spezifika im nächsten Abschnitt detailliert dargestellt werden.

3. 3 Konformationsanalyse der Peptide aus den Transformationswegen h-pep↔u1-pep und h-pep↔u2-pep

Zunächst wurde das konformationelle Verhalten der freien Peptide aus den beiden Transformationswegen untersucht. Für jedes der Peptide wurden sechs unabhängige, jeweils von Zufallskonformationen ausgehende globale stochastische Optimierungsberechnungen durchgeführt. Die globale stochastische Optimierung mit optimalem Bias (siehe Einleitung bzw. Material und Methoden) erlaubt es, Vorzugskonformationen auf schnellstmöglichem Wege zu identifizieren; da jedoch kein kanonisches Ensemble für ein einzelnes lokales Minimum erzeugt wird, ist keine unmittelbare Aussage über die Populationszeiten einer einzelnen Konformation möglich. Für jede der Simulationen wurde eine Höchstanzahl von 40 Millionen Funktionsaufrufen (Monte-Carlo-Schritte und lokale Minimierung nach jedem Zufallsschritt) erlaubt. Die Konvergenz in energetischer Hinsicht war für alle Simulationen zufriedenstellend (Tab. 1). Sehr unterschiedlich war dagegen die minimale Anzahl von Optimierungsschritten zur Erreichung der niedrigsten Energie (bei GATPEDLNQKL z. B. schwankte sie zwischen 5,6 Mill. bis 23 Mill. Schritte, siehe Abb. 4). Zur Darstellung des

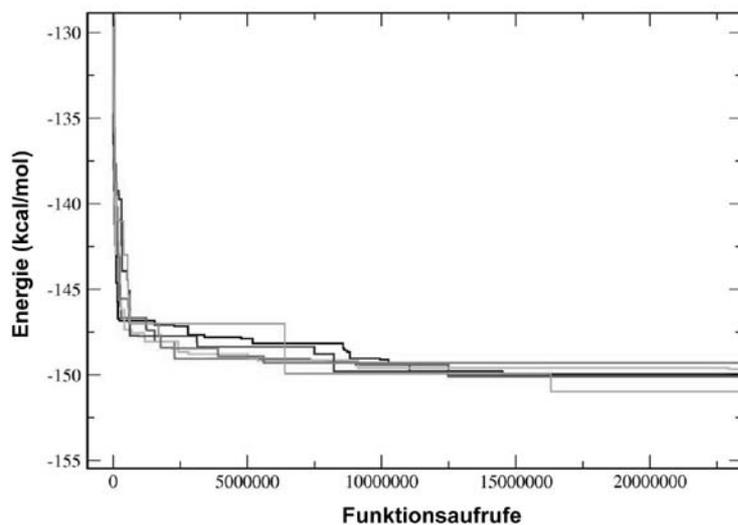


Abb. 4. Energieprofile für 6 unabhängige, jeweils von Zufallskonformationen ausgehende stochastische globale Optimierungssimulationen für das h-pep GATPEDLNQKL. Die Funktionsaufrufe sind Monte-Carlo Schritte und Minimierungsschritte.

Konformationsraumes und zur Untersuchung des konformationellen Verhaltens wurde für jedes Peptid die vollständige Trajektorie einer Simulation aufgezeichnet. Die Analyse der Vorzugskonformationen erfolgte nach Zusammenführung und Clustern der Konformationsstapel aller sechs Durchläufe für ein Peptid, die resultierenden Niedrigenergie-Konformationen wurden danach statistisch gewichtet für Raumtemperatur (298 K).

3. 3. 1 Transformationsweg h-pep↔u1-pep

In Abb. 5 sind für alle Peptide des Transformationsweges die Projektionen des Konformationsraumes und die statistisch gewichteten C_{α} -Atomabstände dargestellt, in Abb. 6 das nach den einzelnen Residuen aufgelöste Vorkommen von Sekundärstrukturstrukturelementen der während der Simulationen akzeptierten Lösungen. Die Strukturen der mit einem statistischen Gewicht von >5% auftretenden Konformationen sind in Abb. 7 abgebildet.

GATPEDLNQKL (h-pep)

Eine deutliche Präferenz für helicale Konformationen ist für das h-pep zu beobachten. Nahezu alle energietiefen Strukturen liegen bei der Projektion des Konformationsraumes im Bereich zwischen α -Helix, π -Helix und 3_{10} -Helix. Während der Simulation wird aber ein großer Teil des gesamten Konformationsraumes mit genügender Dichte abgesucht, wie Abb. 5 zeigt. Die Bevorzugung helicaler Strukturen spiegelt sich in der statistisch gemittelten Abstandsmatrix

	Minimale Energie (kcal/mol)	Max. Energiediff. (kcal/mol)	Mittl. Akzeptanzrate
GATPEDLNQKL	-150,96	1,67	0,44
GATPEDLNAKL	-135,42	1,89	0,39
DATPEDLNAKL	-152,79	2,01	0,40
DATPEDLNARL	-169,90	0,64	0,42
DATPEDLGARL	-156,70	1,99	0,38
DATPEWLGARL	-154,66	2,20	0,37
DATPEWGGARL	-153,19	0,74	0,35
DATPEWGGARI	-149,65	1,12	0,35
DALPEWGGARI	-145,54	1,53	0,34
DALYEWGGARI	-156,97	1,04	0,34
DGLYEWGGARI	-159,38	0,94	0,35

Tab. 1. Konvergenz der jeweils 6 Simulationen der Peptide des Übergangsweges h-pep↔u1-pep. Die max. Energiedifferenz bezieht sich auf den größten Unterschied zwischen den jeweiligen energietiefsten Strukturen der Simulationen. Die mittlere Akzeptanzrate bezeichnet den Durchschnittsanteil der während einer Simulation angenommenen Strukturen.

der C_{α} -Atome wieder. Der Abstand der einzelnen Residuen korreliert qualitativ mit dem sequentiellen Abstand zueinander, was für helicale und gestreckte Konformationen spricht. Bis auf eine Konformation bilden alle energietiefen Konformationen (mit >5% statistischem Gewicht) eine α -Helix zwischen Glutamat 5 und Lysin 10 aus, diese Residuen sind auch bei 45-60% aller während der Simulation akzeptierten Strukturen in Helixbildung involviert (mit einem kleinen Anteil von bis zu 5% π -Helix), wobei es kaum zu Kontakten zwischen ihren polaren Seitenketten kommt. Allerdings liegen die aliphatischen Seitengruppen von Prolin 4, Leucin 7, Lysin 10 und Leucin 11 auf einer Seite der Helix und bilden zusammen mit Glycin 1 eine hydrophobe Fläche. Auf der gegenüberliegenden Fläche der Helix liegen dagegen

ausschließlich hydrophile Aminosäuren (Glutamat 5, Aspartat 6, Asparagin 8 und Glutamin 9), so daß das h-pep einen ausgesprochen amphiphilen Charakter aufweist. Die hydrophobe Fläche von Leucin 7, Arginin 10 und Leucin 11 tritt auch bei der turnartigen Struktur (5,6% statistisches Gewicht bei 298 K) auf. Bei dieser Struktur wird zwischen Leucin 7 und Lysin 10 ein β -Turn vom Typ IV beobachtet.

GATPEDLNAKL (pepI.1)

Der Austausch von Glutamin zu Alanin an Position 9 scheint auf den ersten Blick wenig zu ändern. Die energetisch begünstigsten Strukturen sind noch gehäuft im helicalen Bereich des Konformationsraumes zu finden, obwohl die Clusterung nicht mehr so deutlich ausgeprägt ist. Das Gesamtbild der Verteilung der Strukturelemente bei den einzelnen Aminosäuren im Verlauf der Simulation ist unverändert, jedoch haben sich die relativen Häufigkeiten deutlich geändert. Während die Tendenz zur Turn-Bildung um 5 bis 15% zunimmt, verringert sich die Neigung zur Helixbildung im Bereich Glutamat 5 bis Lysin 10 um bis zu 23%. Im statistischen Mittel der Trajektorie überwiegt jetzt der Gehalt an Turn-Strukturen die Helicität. Obwohl Alanin *per se* eine hohe Helixbildungsneigung hat, liegt die Seitenkette von Alanin 9 in den helicalen Tiefstenergiestrukturen, die nahezu identisch zu denen des h-pep sind, auf der hydrophilen Seite der amphiphilen Helix und wirkt sich so störend auf die Solvatationsenergie aus. In den Turn-haltigen Tiefstenergie-Strukturen dagegen bildet Alanin 9 zusammen mit den beiden Leucinen ein hydrophobes Cluster, während die hydrophilen Seitenketten überwiegend die gegenüberliegende Fläche bilden. Die statistisch wahrscheinlichsten Strukturen sind aber denen des h-pep sehr ähnlich und weisen alle einen helicalen Abschnitt nach Prolin 4 auf.

DATPEDLNAKL (pepI.2)

Die beim pepI.1 beobachtete Tendenz verstärkt sich nach der Substitution von Glycin 1 durch Aspartat. Die Helicität nimmt weiter ab, während die Turn-Bildung weiter ausprägt wird. Letzterer Aspekt ist besonders augenfällig bei Prolin 4 und Leucin 7, die bei doppelt sovielen akzeptierten Strukturen in β -Turns einbezogen sind im Vergleich zur Simulation des h-pep. In diesen Strukturen kommt es zu nicht-lokalen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Aspartat 1 und 6 mit dem C-terminalen Lysin. Wiederum sind aber die Strukturen mit dem größten statistischen Gewicht ab Prolin 4 helical, was auch in der Konformationsraumprojektion ersichtlich ist.

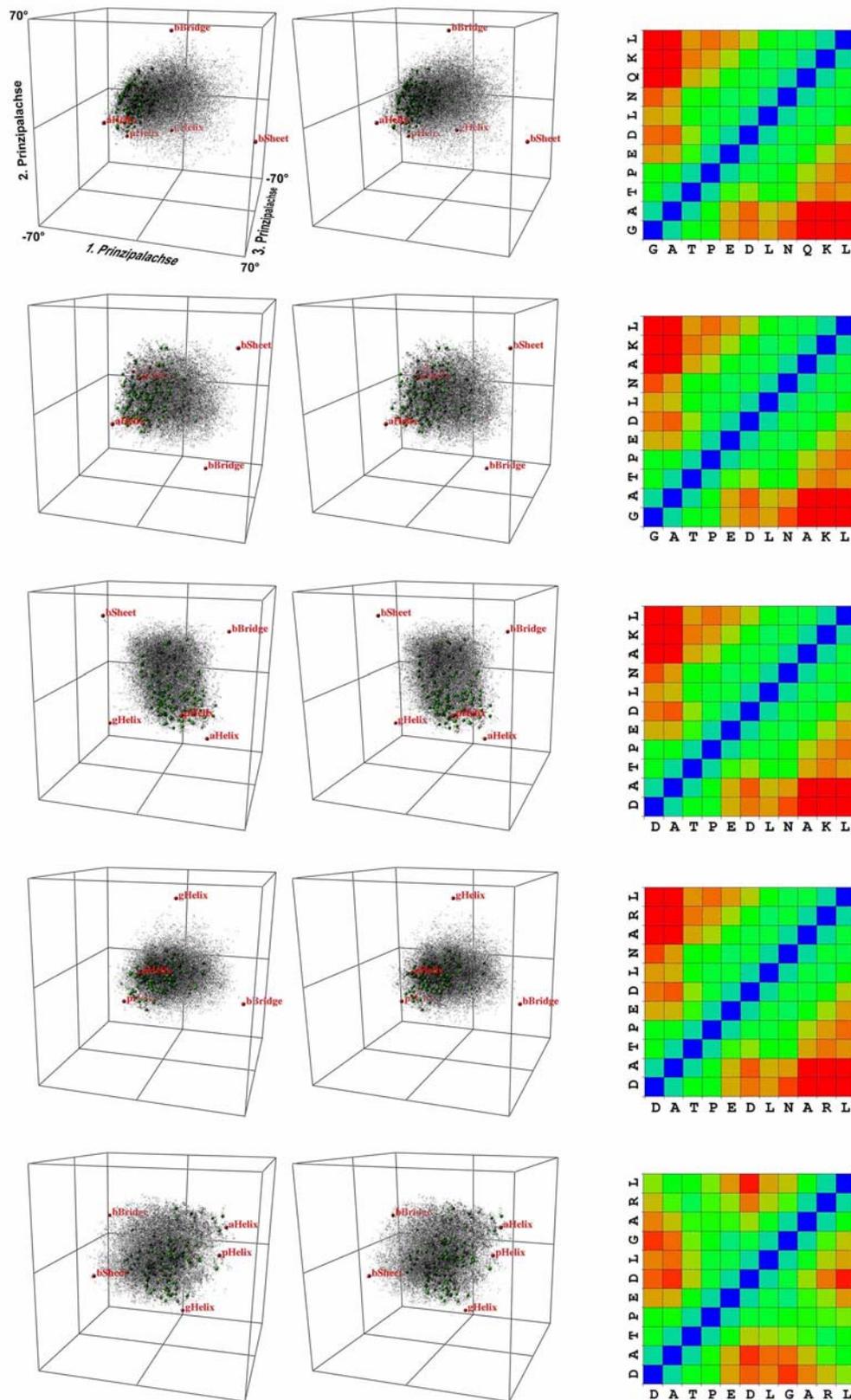
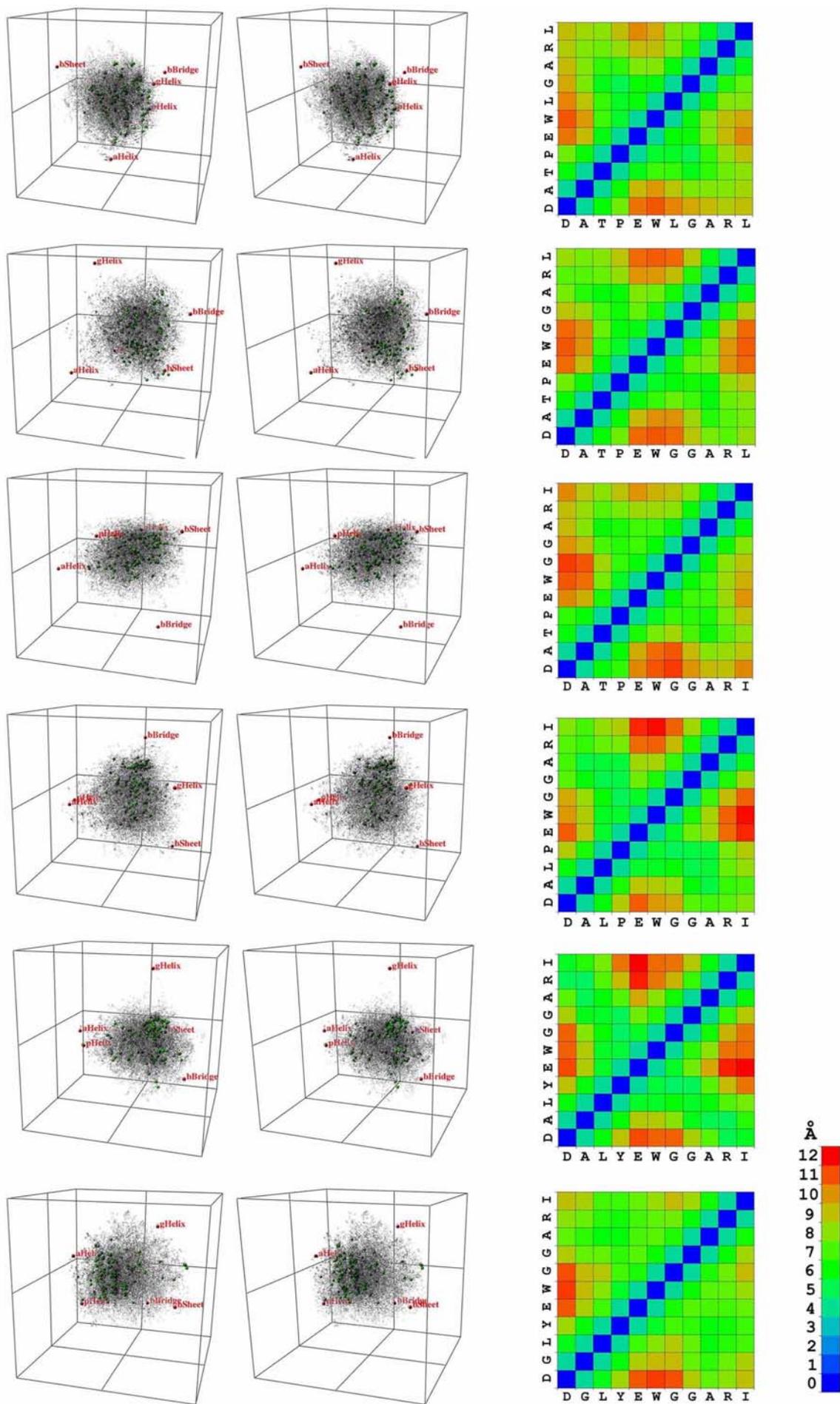


Abb. 5. (Diese und folgende Seite) Abbildung des während der Simulationen abgesuchten Konformationsraumes für die Peptide aus der Transformation h-pep↔u1-pep entlang der drei Hauptachsen, die die größten Eigenvektoren der Varianz der ϕ - ψ -Winkelpaare repräsentieren (jeweils das linke Stereobild). Die Positionen der Referenzstrukturen (rot) und der Tiefstenergie-Strukturen (grün) sind gegeben (aHelix= α -Helix, gHelix= 3_{10} -Helix, pHelix= π -Helix, bSheet= β -Faltblatt, bBridge=isolierte β -Brücke). Je nach Akzeptanzrate der Simulationen sind 78715 bis 120409 Konformationen als Punktwolke dargestellt. Die Dimensionen des Raumes sind in allen Bildern gleich, die Peptidsequenz ist aus dem rechten Bild zu entnehmen. Jeweils rechts: Für Raumtemperatur statistisch gewichtete mittlere Abstände der $C\alpha$ -Atome der jeweils 100 energetisch besten Strukturen aus den Simulationen. Alle Abstände über 12 Å sind rot markiert.



DATPEDLNARL (pepI.3)

Die konformationelle Analyse der Simulation des pepI.3 ergibt ein sehr ähnliches Bild wie die des h-pep. Die Helicität ist gegenüber pepI.2 wieder sprunghaft gestiegen und überwiegt den Gehalt an β -Turns, obwohl die Substitution von Lysin gegen Arginin an Position 10 ein konservativer Austausch von physikochemisch ähnlichen Aminosäuren ist. Die elektrostatische Energie und die Solvatationsenergie der am meisten bevorzugten Konformation sind niedriger als bei der vergleichbaren des pepI.2, obwohl die Strukturen identisch sind (0,03 Å RMSD nach Überlagerung aller identischen Atome). Es kann bei den Tiefstenergiestrukturen keine H-Brückenbindung zwischen Aspartat 6 und Arginin 10 festgestellt werden, obwohl sie genau eine α -Helixwindung voneinander positioniert sind (dies würde zu einer unvorteilhaften Seitenkettengeometrie im Arginin führen), aber die elektrostatische Anziehung scheint sich doch stabilisierend auf die Helixformation auszuwirken. Sowohl Lysin als auch Arginin begünstigen bei C-terminaler Positionierung eine Helixbildung durch Verstärkung des Helix-Dipols.

DATPEDLGARL (pepI.4)

Diese Peptid hat noch 64% Sequenzidentität mit dem h-pep und auch das Muster der Substitutionsanalyse ist noch nahezu identisch. Die Vorzugskonformationen sind hier allerdings deutlich verschieden von denen des h-pep. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Peptiden verteilen sich die energietiefen Strukturen der Simulationen relativ gleich im Raum zwischen den Referenzstrukturen und weisen überwiegend Turn-artige Motive auf. Die Abstandsmatrix der C_{α} -Atome spiegelt dies wieder. Die endständigen Aminosäuren haben im statistischen Durchschnitt einen größeren Abstand zu den mittelständigen Residuen als untereinander. Wie Abb. 7 zeigt, besitzt die Struktur mit dem größten statistischen Gewicht eine β -Haarnadelstruktur mit einem Turn von Glutamat 5 bis Glycin 8 sowie einem kleinen N-terminalen Turn. Zwei Wasserstoff-Brückenbindungen bestehen zwischen CO (Alanin 2)-NH (Leucin 11) sowie CO (Prolin 4)-NH (Glycin 8), man kann von einem nascenten Faltblatt sprechen. Wie beim h-pep besitzt pepI.4 eine hydrophobe Seite, die hier aber aus Prolin 4, Leucin 7 und Leucin 11 besteht. Die Neigung zur Bildung von α -helicalen Motiven ist allgemein drastisch gesunken, besonders aber im C-terminalen Abschnitt ab Glycin 8, während für dieselbe Position der Gehalt an Turnstrukturen stark gestiegen ist. War zwischen den Positionen 5 bis 10 die Ausbildung von Helix-Motiven im Verlauf der Simulationen von h-pep bis pepI.3 noch nahezu normalverteilt, bricht diese Verteilung sehr deutlich bei Position

8 ab im Falle von pepI.4, wo erstmals entlang des Transformationsweges ein hochflexibles Glycin zu finden, dessen Fehlen von Seitenketten Helixbildung benachteiligt.

DATPEWLGARL (pepI.5)

Die bisher beobachtete Tendenz des Konformationsverhaltens (mit Ausnahme von pepI.3) setzt sich mit der Einführung des für die Antikörper-Bindung wichtigen Tryptophan an Position 6 fort. Die weitere Benachteiligung von α -helicalen Motiven ist sicherlich beeinflusst durch den Wegfall der elektrostatischen (i,i+4)-Wechselwirkung zwischen den Seitengruppen der Positionen 6 (bisher Aspartat, jetzt Tryptophan) und 10 (Arginin). Im Gegensatz zu den vorherigen Peptiden ist aber im Mittel der Trajektorie erheblich mehr Anteil an π -Helixmotiven festzustellen, insbesondere zwischen Glutamat 5 und Alanin 9, während der Anteil an α -Helix für keine Residue mehr als 11% aller während der Simulation akzeptierten Strukturen beträgt. Eine π -Helix kann auch als Aufeinanderfolge von Typ IV-Turns beschrieben werden, so daß sich insgesamt eine deutlich erhöhte Neigung zu Turn-Strukturen zeigt. Wie auch beim pepI.4 besitzt dieses Peptid eine deutlich erhöhte Tendenz zur Turnbildung bei Prolin 4 und Glycin 8 (es markiert auch den Höhepunkt an gewichtetem Turn-Gehalt entlang des Transformationsweges). Die energietiefsten Strukturen der Simulation bilden alle ein hydrophobes Cluster der Seitenketten von Tryptophan 6, Leucin 7 und Leucin 11, wobei sich aber durch die große Flexibilität des Glycin 8 ein verschiedenes Arrangement der Seitenketten zueinander ergibt. Die höchstgewichtete Konformation bildet die Rückgratstruktur einer β -Haarnadel aus. Obwohl kein eigentliches Faltblatt vorhanden ist, kann eine β -Brücke beobachtet werden, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen CO (Aspartat 1) – NH (Leucin 11) und NH (Threonin 3) – CO (Alanin 9) gebildet wird. Proline 4 und Glutamat 5 formen einen doppelten β (i,i+1)-Turn, ohne jedoch Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidrückgrat auszubilden.

DATPEWGGARL (pepI.6)

Die relative Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Sekundärstrukturelemente ist vergleichbar mit der des vorhergehenden Peptids pepI.5, die absolute Anzahl aber nimmt weiter ab und erreicht bei keiner Position mehr als 17% summarisches Auftreten entlang der Trajektorie. Augenfällig ist die Zunahme von kurzen β -Faltblattabschnitten zwischen Alanin 2/Threonin 3 und Glycin 8/Alanin 9. Damit einhergehend ist eine Zunahme des Auftretens von β -Turns zwischen Prolin 4 und Glycin 7 zu beobachten. Bei diesem Peptid wurde ja an Position 7 das für die h-pep-Bindung so wichtige Leucin erstmals gegen Glycin ausgetauscht,

welches für die Bindung des u1-pep essentiell ist. Andererseits halbiert sich nahezu die Akzeptanz entlang der Trajektorie von Turn-Motiven, die an den Positionen 5, 6 und 7 beginnen. Insgesamt erscheint das Peptid entlang der Trajektorie unstrukturierter als die bisher beschriebenen. Die mit dem höchsten statistischen Gewicht auftretende Struktur bildet eine β -Haarnadelkonformation aus und einen N-terminalen Turn aus. Die Haarnadel wird hier im Gegensatz zu dem vorherigen Peptid durch einen doppelten $\beta(i,i+1)$ -Turn der Typen IV und III' bei Glutamat 5 und Tryptophan 6 definiert sowie durch eine β -Brücke mit H-Brückenbindungen CO (Prolin 4) – NH (Leucin 11) und CO (Alanin 9) – NH (Tryptophan 9). Auch hier liegen die polaren Seitenketten vorwiegend über der einen Seite der Haarnadel und die hydrophoben auf der entgegengesetzten. Es gibt insgesamt 5 Strukturen mit einem Gewicht von >5%, die alle eine Haarnadelstruktur ausbilden.

DATPEWGGARI (pepI.7)

Die konformationelle Analyse dieses Peptids ergibt ein sehr ähnliches Bild wie die des pepI.6. Jedoch nimmt die Neigung zur Ausbildung α -helicaler Strukturen weiter ab und erreicht bei vielen zentralen Peptidpositionen die Hälfte des Wertes von pepI.6, obwohl der Austauschschritt Leucin 11 \rightarrow Isoleucin C-terminal stattfand. Einhergehend ist eine Zunahme der Ausbildung von β -Brücken zu beobachten, besonder bei Arginin 10. Auch bei diesem, zum u1-pep in der C-terminalen Hälfte bereits identischen Peptid ist eine breite Streuung der energietiefen Konformationen im gesamten Konformationsraum zu erkennen. Bei den zwei höchstgewichteten Niedrigenergie-Strukturen nimmt die N-terminale Hälfte fast identische Rückgrat-Konformationen ein wie bei pepI.6. Der C-terminale Teil bildet multiple Turn-Motive vom Typ IV, die sich sogar bis zu einer π -Helix-Windung vervollständigen können (eine π -Helix ist ein Tripel-Turn, charakterisiert durch eine $\text{CO}^i\text{-NH}^{i+5}$ -Wasserstoffbrückenbindung, in diesem Fall von Prolin 4 – Alanin 9). Da die Turns aber oft gleichgängig sind, kann man nicht von einer eigentlichen β -Haarnadel sprechen, obwohl auch die Ausbildung von isolierten β -Brücken beobachtet wird. Das gehäufte Auftreten von solchen Brücken bei Arginin 10 erklärt sich unmittelbar aus dem vorhergehenden Arrangement der multiplen Turns, das eine weitere Wasserstoff-Brückenbindung von NH (Arginin 10) – CO (Glycin 7) ermöglicht. Das Auftreten von β -Turns ist in der C-terminalen Hälfte deutlich erhöht; bei solchen, die von Glutamat 5 und Tryptophan 6 ausgehen sogar um ca. 10% gegenüber dem pepI.6. Die überwiegende Anzahl der während der Simulation akzeptierten Lösungen sind jedoch random coil-Strukturen.

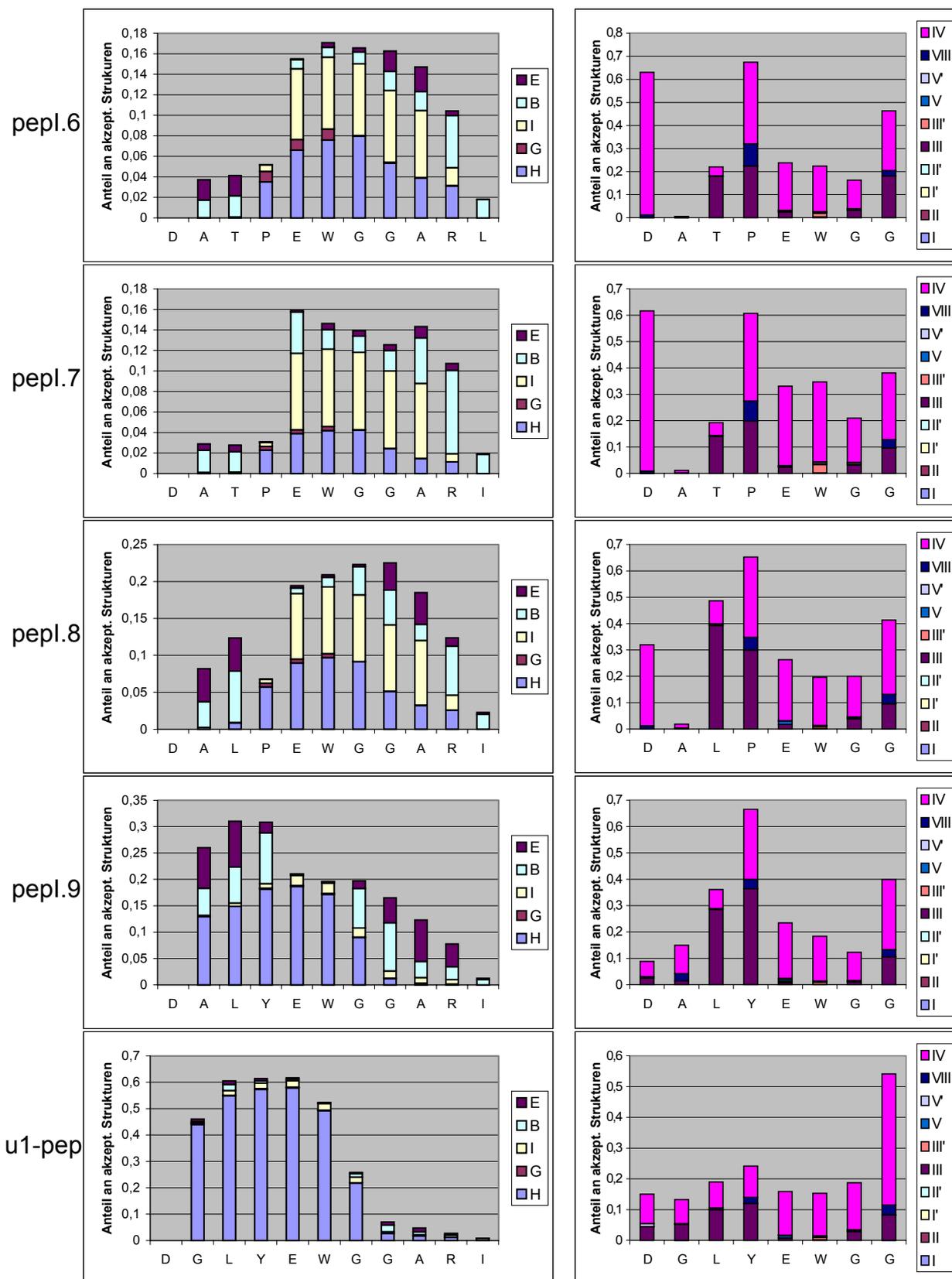


Abb. 6. (vorige und diese Seite) Auftreten von Strukturelementen bei den Simulationen der freien Peptide aus dem Transformationsweg h-pep↔u1-pep. Dargestellt ist jeweils der nach den Positionen aufgelöste Anteil der Motive an den während der Simulation akzeptierten Lösungen. Die jeweils linken Diagramme bezeichnen die häufigsten Sekundärstruktur motive (E=β-Faltblatt, B=β-Brücke, I=π-Helix, G=3₁₀-Helix, H=α-Helix). Die rechten Diagramme stellen die Verteilung der β-Turntypen dar, wobei die letzten drei Positionen weggelassen sind, da sich β-Turns immer zwischen den Positionen i und i+3 definieren. Die Ordinatendimensionen sind auf den jeweiligen Maximalwert bezogen und sind daher für alle Diagramme unterschiedlich.

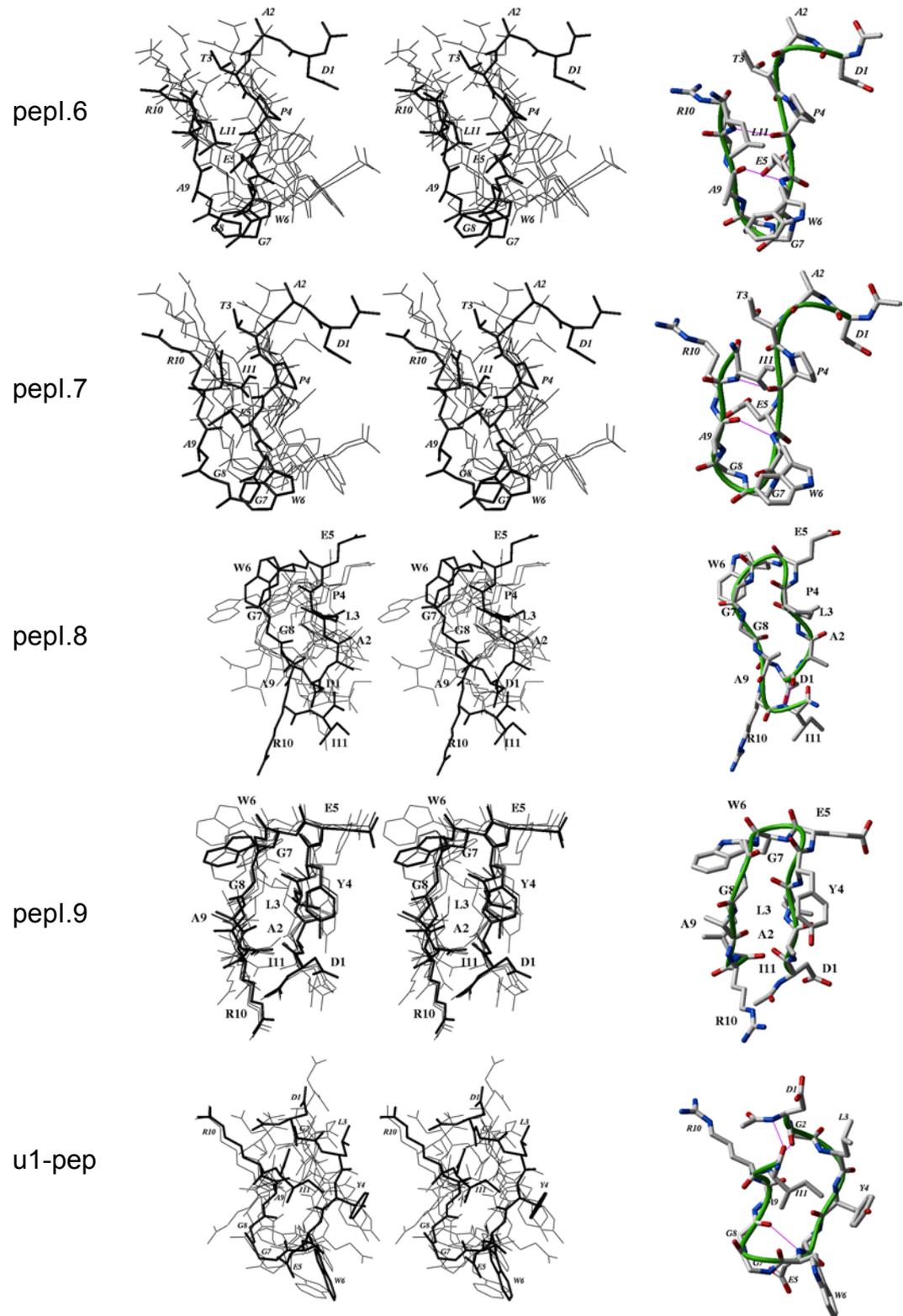


Abb. 7. (vorige und diese Seite) Tiefstenergiestrukturen aus den Konformationssimulationen der Peptide des Transformationsweges h-pep↔u1-pep. Die linke Stereoabbildung stellt jeweils alle Konformationen mit einem statistischen Gewicht von über 5% (bei 298 K) dar. Die höchstgewichtete Konformation ist fett gezeichnet und rechts in der Stickdarstellung separat mit H-Brückenbindungen dargestellt. In grün erscheint die Rückgratspur mit eventuell vorkommenden Sekundärstrukturelementen.

DALPEWGGARI (pepI.8)

Die Einführung von Leucin an Position 3 führt zu einer gegenüber dem Vorgängerpeptid deutlich gestiegenen Helicität, bei den zentralen Aminosäuren bis zu mehr als dem Doppelten des Wertes von pepI.7. Das könnte dem Wegfall einer β -verzweigten Aminosäure zuzuschreiben sein. Gleichzeitig kann man eine nur halb so große Neigung zur Ausbildung von β -Turns bei Aspartat 1 und einen doppelt so großen Anteil daran an der Position 3 (wo im pepI.7 Threonin war) feststellen. Die Ursache hierfür ist die häufige Ausbildung von hydrophoben Clustern aus den Seitengruppen von Leucin 3 und Tryptophan 6, die die N-terminalen zwei Aminosäuren in einer gestreckten Rückratkonformation halten. Diese Cluster werden oft noch komplementiert von Isoleucin 11, da die beiden aufeinanderfolgenden Glycine 7 und 8 ein C-terminales Arrangement erlauben, das bei Seitenketten tragenden Residuen sterisch verboten wäre. Die Flexibilität dieses Rückrat-„Gelenkes“ ermöglicht auch eine Vielzahl von konformationellen Merkmalen bei den Tiefstenergiestrukturen, von Haarnadeln über kurzen Faltblättern bei Alanin 2/Leucin 3 – Alanin 9/Arginin 10 über eine π -Helixwindung von Prolin 4 - Alanin 9 bis zu „coiled coil“-Strukturen mit isolierten β -Brücken.

DALYEWGGARI (pepI.9)

Der Austausch des durch ein starres Rückgrat und ein fehlendes Amidproton gekennzeichnetes Prolins an der vierten Position durch Tyrosin hat zwei gravierende Folgen: Ein enormer Zuwachs an Helicität und eine Verschiebung der Helix-Häufigkeitsverteilung in die N-terminale Peptidhälfte. Die α -helicalen Motive beginnen jetzt häufig schon bei Alanin 2 und reichen bis Glycin 7, der Maximalwert der Verteilung liegt bei Glutamat 5, wo bei doppelt so vielen akzeptierten Strukturen eine Einbeziehung in eine Helix vorzufinden ist. Die Tendenz zur Bildung von energetisch ungünstigeren π -Helices hat sich gegenüber dem vorangegangenen Peptid deutlich verringert, während immer noch relativ häufig kurze β -Faltblattabschnitte bei Alanin 2/ Leucin 3 und Glycin 8 bis Arginin 10 erkennbar sind. Die Verschiebung von α -helicalen Abschnitten in Richtung des N-Terminus ist auch in der bei Aspartat 1 merklich gesunkenen Neigung zur Ausbildung von β -Turns festzustellen. Die im Ensemble der Niedrigenergie-Strukturen wahrscheinlichsten Konformationen sind allerdings alle einer β -Haarnadel ähnlich, wobei entweder kurze Faltblattabschnitte oder einzelne β -Brücken die Termini durch Wasserstoffbrücken verbinden. Diese Strukturen sind durch einen Turn, ausgehend von Tyrosin 4, sowie durch ein hydrophobes Cluster aus den Seitenketten von Leucin 3, Tryptophan 6 und teilweise Isoleucin 11 gekennzeichnet.

DGLYEWGGARI (u1-pep)

Obwohl der letzte Austausch entlang des Transformationsweges h-pep \leftrightarrow u1-pep an zweiter Position ein Alanin, das Helixbildung von allen Aminosäuren am stärksten begünstigt, durch ein Glycin ersetzt, verstärkt sich der bereits beobachtete Trend zu α -Helixbildung im N-terminalen Bereich erheblich. Bei durchschnittlich der Hälfte aller während der globalen Optimierung angenommenen Strukturen finden sich zwischen Glycin 2 und Tryptophan 5 helicale Elemente. Besonders augenfällig ist in diesem Zusammenhang auch die verminderte Tendenz zur Turnbildung an den Position 3 und 4. Die aufeinander folgenden Glycine 7 und 8 sind dagegen ganz offensichtlich Helixbrecher, schon Glycin 7 ist deutlich weniger in α -Helices einbezogen, während bei Glycin 8 in über der Hälfte der Niedrigenergie-Strukturen ein β -Turn beginnt.

Die Tiefstenergie-Strukturen mit dem höchsten statistischen Gewicht (>5%) haben allerdings wie auch bei pepI.9 keine helicalen Sekundärstrukturen, sondern weisen alle einzelne oder multiple β -Turns, besonders im zentralen Teil, sowie überwiegend β -Brücken oder kurze β -Faltblattabschnitte auf. Sie können als mehr oder weniger deformierte Haarnadelstrukturen angesehen werden, wobei mindestens eines der zentralen Glycine immer in einem engen, reversen Turn einbezogen ist. Die Struktur, die zu ca. 13% im konformationellen Ensemble vertreten ist, besitzt durch zwei enge, nicht benachbarte Typ IV-Turns ein kurzes Stück eines parallelen Faltblattes, wobei Leucin 3/Tyrosin 4 und Arginin 9/Alanin 10 durch Rückgrat-Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind.

3. 3. 1. 1 Zusammenfassender Vergleich der Konformationsanalysen für die Transformationspeptide zwischen h-pep \leftrightarrow u1-pep

Das Absuchen des Konformationsraumes bei der globalen stochastischen Optimierung erfolgte bei den untersuchten Peptiden des Umwandlungsweges h-pep \leftrightarrow u1-pep hinreichend vollständig. Wie die Projektionen entlang der Hauptachsen zeigen, sind die Dichteverteilungen der getesteten Konformationen in allen Fällen homogen. Es wurden bei allen Peptiden Konformationen mit niedriger Energie gefunden, die die häufigsten Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Brücke bzw. -Faltblatt sowie β -Turns enthalten. Darüber hinaus konnten auch seltenere Elemente, wie 3_{10} - und π -Helices, identifiziert werden, wobei bei einigen Peptiden deren Anteil bei den während der Simulation akzeptierten

Lösungen den Anteil an α -Helix übersteigt, obwohl letztere die thermodynamisch stabilere Helixform ist.

Insgesamt weisen die Übergangspeptide deutlich weniger Tendenz zur Ausbildung definierter Sekundärstrukturen auf, wobei besonders der Anteil an α -Helix wesentlich geringer ist als bei h-pep und u1-pep (Abb. 8). Diese beiden Peptide, End- bzw. Ausgangspunkt des Peptid-Umwandlungsweges, zeigen in der Summe ein ähnliches Verhalten bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen. Obwohl im statistisch gewichteten Durchschnitt der Simulation jeweils mehr als 25% der Aminosäuren der beiden Peptide in einer α -helicalen Struktur vorliegen, ist die Verteilung dieser Elemente sehr unterschiedlich. Während beim h-pep praktisch alle Niedrigenergie-Strukturen C-terminal eine Helix ausbilden, die durch Prolin initiiert wird

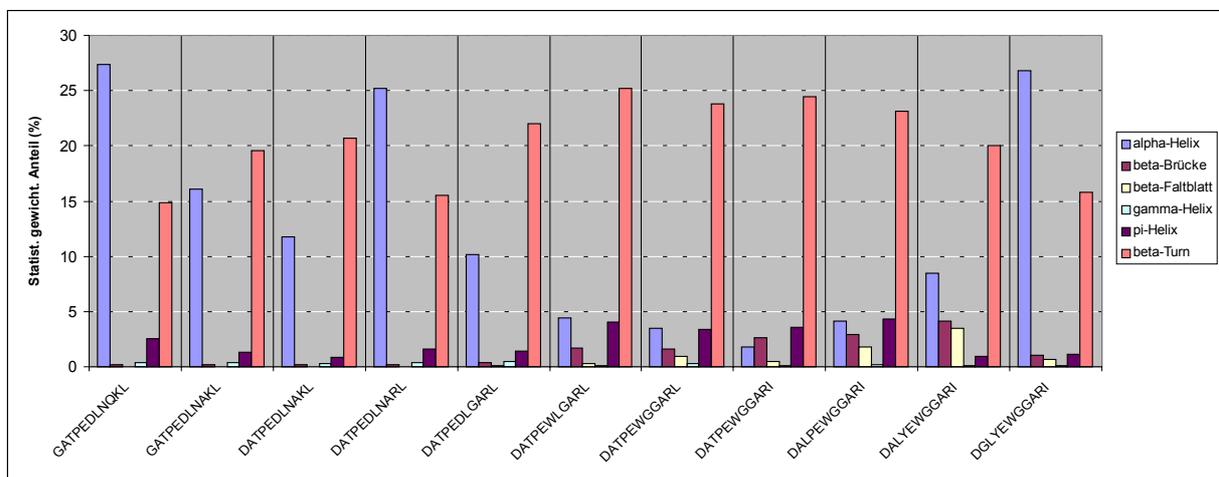


Abb. 8. Zusammenfassender Vergleich des konformationellen Verhaltens der Peptide aus dem Transformationsweg h-pep↔u1-pep. Für die häufigsten Sekundärstrukturelemente sind die statistisch gewichteten Anteile während der Trajektorie für das Gesamtpeptid dargestellt. Die β -Turns repräsentieren dabei alle während der Trajektorie beobachteten Typen.

(Abb. 7), ist es beim u1-pep vorwiegend die N-terminale Peptidhälfte, die eine Helixstruktur bevorzugt. Die Einführung von Glycin schon beim Übergangspeptid pepI.4 bewirkt ein Zurückgehen des beobachteten Anteils an α -Helix. Gleichzeitig steigt die Befähigung zur Ausbildung von multiplen β -Turns und anderen turnartigen Strukturen wie einzelne π -Helixwindungen. Insgesamt sind die Übergangspeptide des Umwandlungsweges weniger strukturiert im Verlauf der Simulationstrajektorie. Für die Konformationen tiefster Energie ergeben sich bei ihnen im Unterschied zu h- und u1-pep keine Präferenzen im Konformationsraum. Obwohl beim u1-pep im statistischen Mittel über 10% mehr α -helicaler Anteil als β -Turns beobachtet wird, sind die bevorzugten Strukturen hier nicht helical, sondern bilden β -Haarnadelmotive aus, wie dies auch schon bei den Übergangspeptiden, nicht jedoch beim h-pep beobachtet wurde.

Die deutliche Sequenzabhängigkeit der Strukturbildung zeigt sich auch an der Isomerie des Prolins 4, das bis zum pepI.8 in den jeweiligen Übergangspeptiden noch vorhanden ist. Während der Anteil des Prolinsamplings an der gesamten Anzahl des MC-Samplings relativ konstant bleibt (allerdings sinkt die Zahl der Freiheitsgrade der Peptide leicht von h-pep nach u1-pep) und auch die Akzeptanzrate für Prolin-Zufallsbewegungen immer rund 2/3 beträgt, ist

Peptid	Anteil Prolin an Gesamt-MC (%)	Davon akzeptiert (%)	Anteil Trans-Cis-Versuche (%)	Davon akzeptiert (%)	Anteil Cis-Trans-Versuche (%)	Davon akzeptiert (%)
GATPEDLNQKL	2,33	66,18	17,45	1,46	1,26	89,87
DATPEDLNQKL	2,25	66,30	16,86	0,47	0,49	83,87
DATPEDLNAKL	2,41	64,56	17,81	0,25	0,57	79,49
DATPEDLNARL	2,39	63,95	17,19	0,57	0,88	91,11
DATPEDLGARL	2,51	65,26	16,21	0,33	0,25	68,42
DATPEWLGARL	2,54	64,71	17,36	0,50	0,81	75,00
DATPEWGGARL	2,61	64,43	17,04	0,25	0,21	66,67
DATPEWGGARI	2,70	64,13	17,35	0,16	0,37	85,19
DALPEWGGARI	2,60	63,91	17,83	0,34	0,59	61,54

Tab. 2 Einfluß der cis-trans-Isomerisierung von Prolin auf die Konformationssuche. Für jedes Peptid ist der gegeben: der Anteil, den Prolin an allen Zufallsschritten der Trajektorie hatte; die von diesem Anteil akzeptierten Schritte, der Anteil, den trans-cis-Übergangsversuche an den von Prolin versuchten Schritten hatten; der davon akzeptierte Anteil; der Anteil, den cis-trans-Übergangsversuche an den von Prolin versuchten Schritten hatten und der davon akzeptierte Anteil.

die Akzeptanzrate für den trans-cis-Übergang sehr unterschiedlich. Beim pepI.4, das immerhin noch 64% Sequenzidentität zum h-pep besitzt, reduziert sich diese Akzeptanz auf rund 1/5 des Wertes beim h-pep. Das pepI.7 weist sogar nur noch 1/9 der Akzeptanzrate des h-pep auf. Obwohl bei den Übergangspeptiden entsprechend weniger cis-trans-Übergangsversuche registriert werden (für einen solchen Übergang muss sich das Prolin ja bereits in cis-Stellung befinden), ist die Akzeptanzrate dafür jedoch sehr hoch. Insgesamt kann aber gesagt werden, daß für die Vorzugskonformationen aller Peptide des h-pep↔u1-pep Umwandlungsweges eine trans-Konfiguration des Prolins begünstigt ist. Die höhere Akzeptanz einer cis-Konfiguration im h-pep kann man durch fehlende nicht-lokale Wechselwirkungen und damit eine höhere Flexibilität des N-Terminus erklären, während schon die Einführung von Aspartat an der ersten Position zu Interaktionen mit den C-terminalen Aminosäuren und damit zu sterischer Beanspruchung im Prolin führt.

Zusammenfassend lassen sich in etwa drei Phasen in der Sekundärstrukturausbildung bei den Übergangspeptiden des Transformationsweges h-pep↔u1-pep erkennen:

- h-pep bis pepI.4: Es finden Aminosäureaustausche ausschließlich im C-terminalen Peptidteil statt. Die Peptide weisen überwiegend α -helicale Sekundärstrukturelemente in der C-terminalen Peptidhälfte auf, besonders stabilisiert durch hydrophobe

Wechselwirkungen der durch eine α -Helixwindung getrennten Leucine. Bei pepI.4 läßt sich durch die Einführung des Glycin 8 bereits eine Störung dieses Verhaltens feststellen.

- pepI.4 bis pepI.8: Mit der Einführung des zweiten zentralen Glycins an der bislang durch Leucin 7 besetzten Position überwiegen jetzt coil-Strukturen mit multiplen β -Turns, energetisch am meisten begünstigt sind β -Haarnadelmotive. Der Effekt der hohen Flexibilität der zentralen Glycine wird auch zwei terminale Austausch nicht beeinträchtigt. Die Peptide sind im Verlauf der Simulation größtenteils unstrukturiert.
- pepI.9 und u1-pep: Das Ersetzen des Prolins führt in der N-terminalen Peptidhälfte zu einer verstärkten Helixausbildung. Dagegen liegt der C-terminale Teil fast ausschließlich in gestreckten Konformationen vor, da die Helix an den zentralen Glycinen abbricht. Die wahrscheinlichsten Strukturen sind aber auch hier β -Haarnadelkonformationen in unterschiedlicher Ausprägung.

3. 3. 1. 2 α -Helixbildung im Vergleich der Simulationen mit Vorhersageprogrammen

Die während der Simulation festgestellten unterschiedlichen Tendenzen zur Ausbildung von α -Helixmotiven wurden mit den Vorhersagen zweier Programme verglichen. Es handelt sich um die Programme HELIXv1.5 (Andersen et al., 1997) und AGADIR (Munoz et al., 1997), die beide auf empirischer Parametrisierung der Helixbildungseigenschaften der einzelnen Aminosäuren mittels CD-Spektroskopie basieren. Beide Programme beziehen potentielle Helixcapping-Wechselwirkungen, den Einfluß der Termini sowie Salicität und pH-Wert ein.

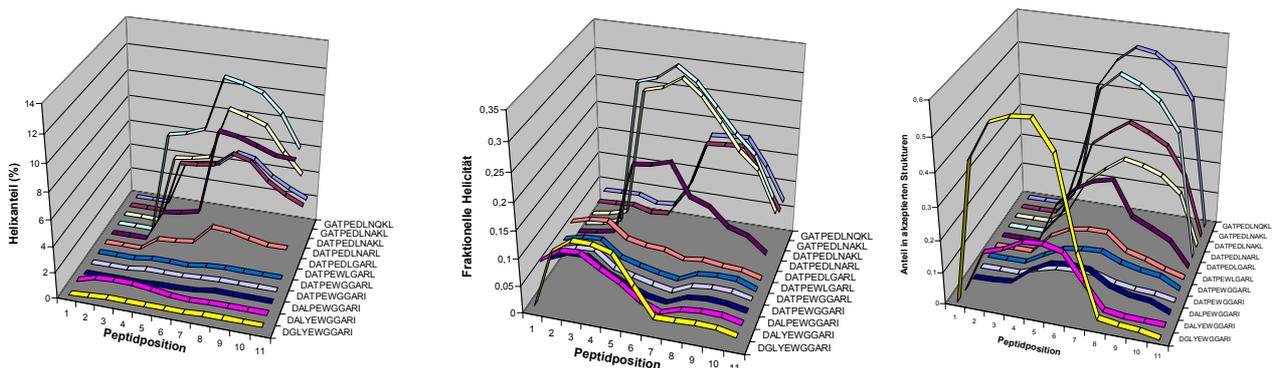


Abb. 9. Vergleich von Helizitätsvorhersagen mit den während der Simulationen beobachteten Helizitäten der Peptide aus dem Transformationsweg h-pep↔u1-pep. Das h-pep ist jeweils hinten, das u1-pep vorn. Links: Vorhersage nach AGADIR, Mitte: Vorhersage nach HELIXv1.5, Rechts: Simulationsergebnisse. Bei den Vorhersagen wurden folgende Bedingungen angenommen: pH 7,0, Ionenstärke 0.1 M (AGADIR), ≤ 1 M NaCl (HELIXv1.5), T=273 K (AGADIR), N-Terminus acetyliert, C-Terminus amidiert.

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, sind tendenziell die Helixbildungseigenschaften der Peptide des Transformationsweges vergleichbar. Vom h-pep ausgehend, sind auch bei den Vorhersageprogrammen für die ersten Übergangspeptide helicale Strukturelemente überwiegend im C-terminalen Peptidteil zu finden. Die sukzessive Einführung von Glycin 8, Tryptophan 6 und Glycin 7 lassen die Helicität deutlich einbrechen. Der Algorithmus von HELIXv1.5 sagt für den weiteren Verlauf des Transformationsweges ein kontinuierliches Ansteigen des N-terminalen Helixanteils vorher, wie das auch bei den Simulationen beobachtet wurde, während das AGADIR-Programm nur beim pepI.9 einen geringen N-terminalen Helixanteil prognostiziert.

3. 3. 2 Transformationsweg h-pep↔u2-pep

Auch für diesen Transformationsweg war die Konvergenz der Konformationsuch-Simulationen zufriedenstellend (Tab. 3). Auf die Darstellungen des Konformationsraumes wurde hier verzichtet, ebenso auf die Abbildungen der C α -Abstandsmatrices, da diese sich untereinander nicht so deutlich unterscheiden wie beim Transformationsweg h-pep↔u1-pep. Die Konformationsraumprojektionen zeigten aber ebenso ein vollständiges Absuchen während der Simulationen und eine homogene Dichte an Konformationen. Die akkumulativen Sekundärstrukturmotive der akzeptierten Lösungen sind für den gesamten Transformationsweg in Abb. 10, die Konformationen mit den höchsten statistischen Gewichten in Abb. 11 dargestellt.

	Minimale Energie (kcal/mol)	Max. Energiediff. (kcal/mol)	Mittl. Akzeptanzrate
FATPEDLNQKL	-154,69	1,43	0,36
FAKPEDLNQKL	-166,71	1,88	0,33
FAKPWDLNQKL	-164,59	2,51	0,34
FDKPWDLNQKL	-180,34	2,04	0,35
FDKPWNLNQKL	-175,98	1,93	0,35
FDKEWNLNQKL	-196,53	1,67	0,32
FDKEWNLIQKL	-180,8	2,13	0,34
FDKEWNLIQQL	-178,08	2,31	0,37
FDKEWNLIQQN	-187,25	1,55	0,36
FDKEWNLIEQN	-195,7	0,91	0,39

Tab. 3. Konvergenz der jeweils 6 Simulationen der Peptide des Übergangsweges h-pep↔u2-pep. Die maximale Energiedifferenz bezieht sich auf den größten Unterschied zwischen den jeweiligen energietiefsten Strukturen der Simulationen. Die mittlere Akzeptanzrate bezeichnet den Durchschnittsanteil der während einer Simulation angenommenen Strukturen.

FATPEDLNQKL (pepII.1)

Die schrittweise Umwandlung von h-pep in u2-pep durch Einzelsubstitutionen beginnt am N-Terminus durch die Einführung von Phenylalanin 1. Dadurch nimmt die Helicität sprunghaft ab (um über 10% im statistischen Mittel), obwohl sich das generelle Bild der Verteilung helicaler Elemente entlang der Sequenz kaum ändert. Der während der Simulation akzeptierte Anteil an α -Helix verringert sich bei Leucin 7, das beidesmal den Maximalwert der ausgeprägten Helicität von Prolin 4 bis bis Lysin 10 repräsentiert, um über 20%. Damit einhergehend ist eine starke Zunahme von β -Turns zu beobachten, deren Ausgang bei Prolin 4 – ein beinahe verdoppelter Anteil – und bei Asparagin 8 liegt. Der Grund hierfür liegt in einer starken hydrophoben Wechselwirkung von Phenylalanin 1 mit Leucin 7 und/oder Leucin 11, das das helicale Rückgrat-Arrangement stören kann. Die mit höchstem Gewicht vertretenen Tiefstenergie-Strukturen sind dennoch ausschließlich durch eine α -Helixstruktur geprägt, die mindestens den Abschnitt von Glutamat 5 bis Glutamin 9 umfaßt.

FAKPEDLNQKL (pepII.2)

Der Austausch von Threonin 3 durch Lysin bewirkt eine relativ geringe Änderung des konformationellen Verhaltens verglichen mit dem Vorgängerpeptid pepII.1. Allerdings nimmt die Helicität im Gesamtbild wieder etwas zu und ist etwa gleich groß wie die mittlere Tendenz zu β -Turnbildung. Offenbar begünstigt die Substitution des β -verzweigten Threonins durch eine geradkettige Aminosäure die Initiation einer α -Helix, in der Tat befindet sich Prolin 4 in nahezu doppelt so vielen Niedrigenergie-Strukturen am Beginn eines helicalen Motivs. Eine minimale Zunahme der Neigung zur Bildung einer β -Brücke ist bei Alanin 2/Leucin 7 zu beobachten, in Verbindung mit einer Verdopplung des Anteils von β -Turns an der dritten Position, an der jetzt Lysin zu finden ist. Dieser Turn wird stabilisiert durch elektrostatische Anziehung zwischen der $N\zeta$ -Aminogruppe und der Carboxy-Funktion des drei Positionen entfernten Aspartats. Die allermeisten Tiefstenergie-Strukturen sind allerdings helical zwischen Prolin 4 und Lysin 10.

FAKPWDLNQKL (pepII.3)

Im Konformationsraum zeigt sich eine klare Bevorzugung des pepII.3 im Bereich helicaler Strukturen, wobei eine deutliche Cluster-Bildung zu beobachten ist. Die Gesamthelicität verändert sich im statistischen Mittel kaum, verglichen mit dem Vorgängerpeptid. Jedoch verschiebt sich das Verteilungsprofil der in Helixformation einbezogenen Residuen in

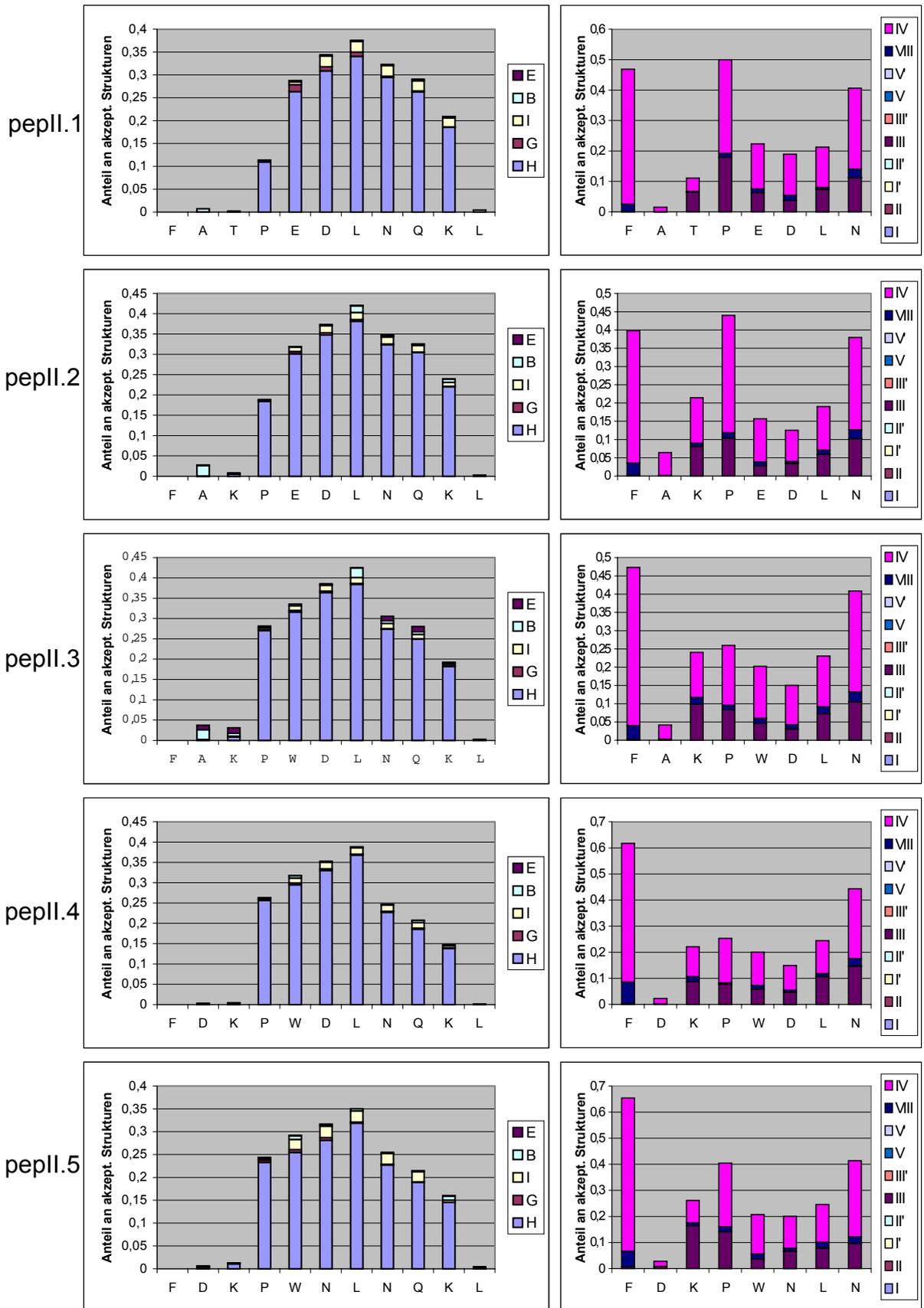
Richtung des N-Terminus, was sich auch an der deutlichen Abnahme der β -Turnbildung bei Prolin 4 ablesen läßt. Allerdings bildet die Struktur mit dem höchsten statistischen Gewicht (91%) eine β -Haarnadelstruktur aus, und ein kurzer β -Faltblattabschnitt zwischen Alanin 2/Lysin 3 und Asparagin 8/Glutamin 9 wird beobachtet. Dieses Arrangement ermöglicht einen geringfügig größeren van-der-Waals-Kontakt, besonders zwischen den hydrophoben Seitenketten, als bei der zweitwahrscheinlichsten Struktur, die zwischen Prolin 4 und Lysin 10 eine α -Helix ausbildet und somit der bevorzugten h-pep-Konformation sehr ähnlich ist. Der zentrale Peptidabschnitt ist überwiegend in helicalen Lokalstrukturen involviert, während Asparagin 8, wie auch bei den ersten beiden Peptiden des Umwandlungsweges, diese Sekundärstruktur oft unterbricht und einen C-terminalen Turn einleitet.

FDKPWDLNQKL (pepII.4)

Das konformationelle Verhalten dieses Peptids während der Optimierungssimulation unterscheidet sich nur sehr wenig von dem des vorherigen. Auch hier kann wieder eine ungleiche sequentielle Verteilung der Helicität um deren Maximalwert bei Leucin 7 beobachtet werden – die N-terminale Peptidhälfte bildet proportional mehr Helixmotive. Das spiegelt sich bei den wahrscheinlichsten Tiefstenergie-Strukturen wider, die häufig nur ein kurzes Helixsegment von Prolin 4 bis Leucin 7 aufweisen. Der C-terminale Abschnitt ist dabei auf den N-Terminus zurückgebogen, so daß Leucin 11 mit Phenylalanin 1 und Leucin 7 ein hydrophobes Cluster bildet. Bei einer Verlängerung der Helix in die C-terminale Peptidhälfte ist dieses nicht mehr so stark ausgeprägt. In der Projektion des Konformationsraumes ist eine Konzentration der Tiefstenergie-Strukturen nicht mehr erkennbar; die Gesamthelicität ist gegenüber pepII.3 leicht gesunken.

FDKPWNLNQKL (pepII.5)

Bei weiterhin sinkender statistisch gemittelter Helicität bietet die detaillierte sequentielle Analyse ein weithin identisches Bild wie die des pepII.4. Die Tendenz zur Bildung von β -Turns an der Position 6, an der der Austausch von Aspartat zu Asparagin stattgefunden hat, ist gegenüber dem Vorgängerpeptid wieder leicht gestiegen. Nahezu alle mit einem Gewicht von >5% vertretenen Tiefstenergie-Konformationen weisen eine C-terminale Helix, beginnend bei Prolin 4, auf. Die mittlere Tendenz zur Ausbildung von β -Turns aber hat sich gegenüber pepII.4 erhöht.



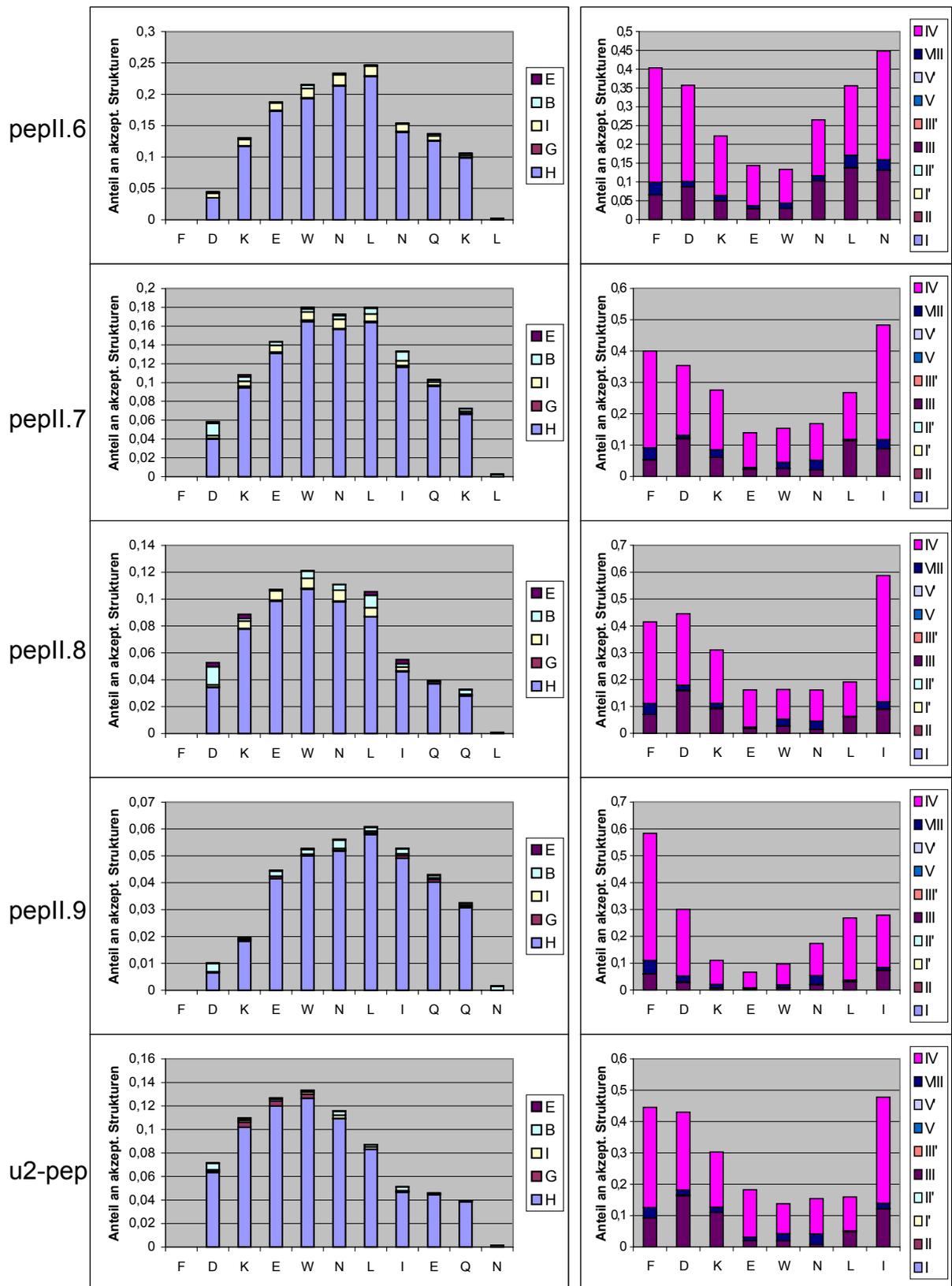
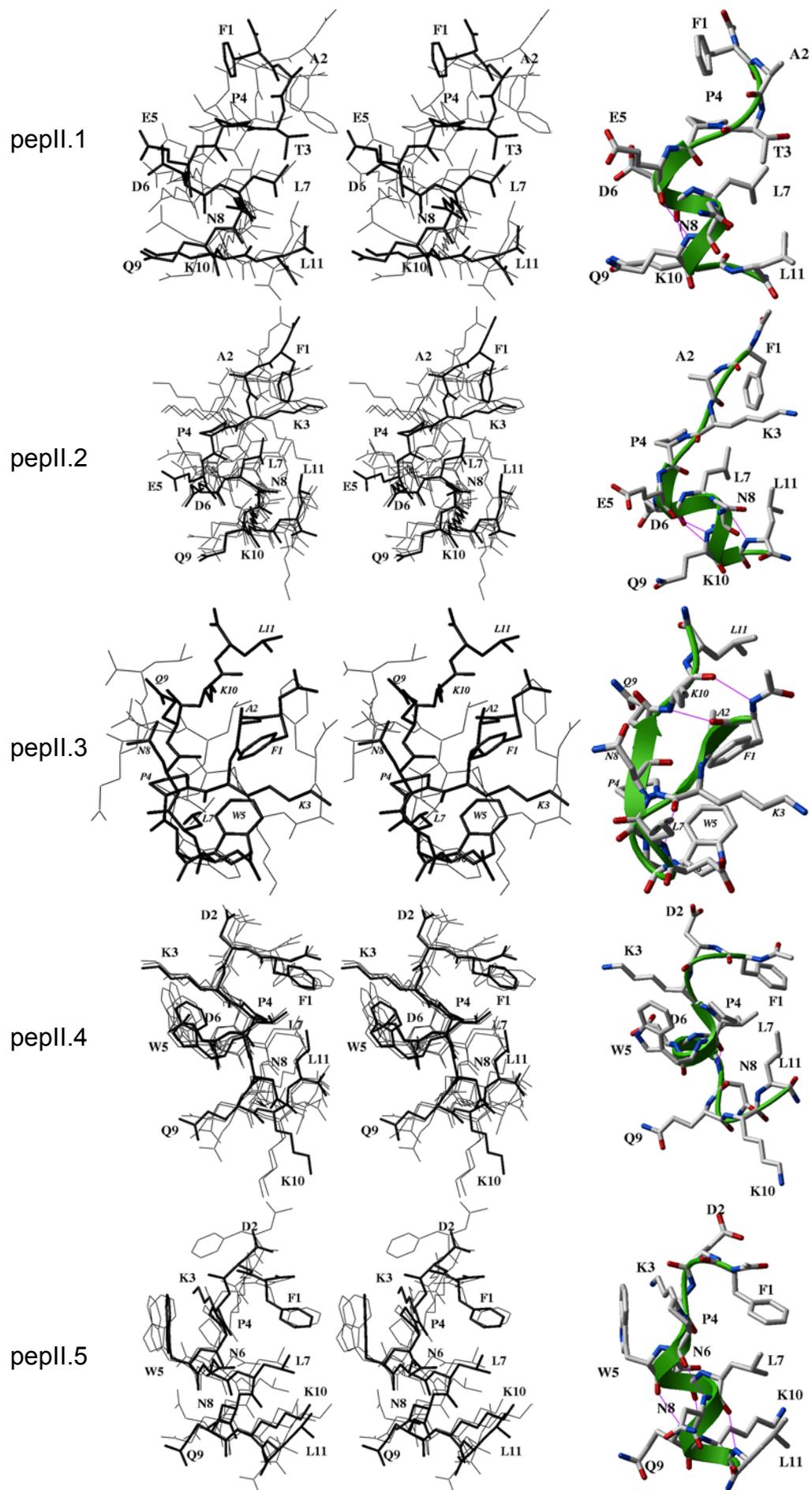


Abb. 10. (Vorige und diese Seite) Auftreten von Strukturelementen bei den Simulationen der freien Peptide aus dem Transformationsweg h-pep↔u2-pep. Dargestellt ist jeweils der nach den Positionen aufgelöste Anteil der Motive an den während der Simulation akzeptierten Lösungen. Die jeweils linken Diagramme bezeichnen die häufigsten Sekundärstruktur motive (E=β-Faltblatt, B=β-Brücke, I=π-Helix, G=3₁₀-Helix, H=α-Helix). Die rechten Diagramme stellen die Verteilung der β-Turntypen dar, wobei die letzten drei Positionen weggelassen sind, da sich β-Turns immer zwischen den Positionen i und i+3 definieren. Für das h-pep siehe Abb. 6. Die Ordinatendimensionen sind auf den jeweiligen Maximalwert bezogen und sind daher für alle Diagramme unterschiedlich.



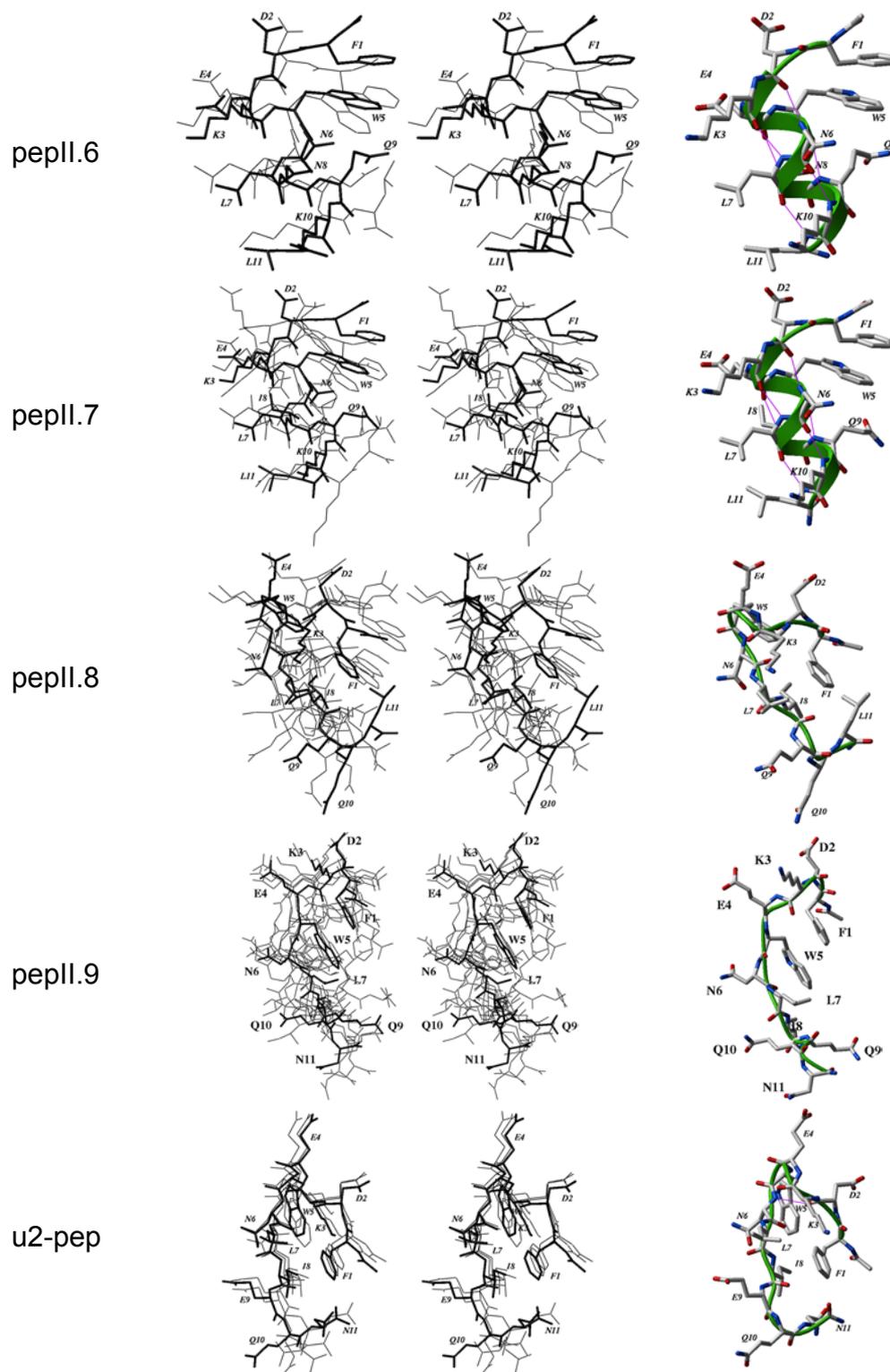


Abb. 11. (Vorige und diese Seite) Tiefstenergiestrukturen aus den Konformationssimulationen der Peptide des Transformationsweges h-pep↔u2-pep. Die linke Stereoabbildung stellt jeweils alle Konformationen mit einem statistischen Gewicht von über 5% (bei 298 K) dar. Die höchstgewichtete Konformation ist fett gezeichnet und rechts in der Stickdarstellung separat mit H-Brückenbindungen dargestellt. In grün erscheint die Rückgratspur mit eventuell vorkommenden Sekundärstrukturelementen. Für die Konformationen von h-pep siehe Abb. 6.

FDKEWNLNQKL (pepII.6)

Mit der Substitution von Prolin 4 gegen Glutamat ist der sequentielle Umwandlung der N-terminalen Peptidhälfte abgeschlossen. Im Verlauf der Simulation wird weiterhin weniger Anteil an α -Helix insgesamt registriert (weniger als die Hälfte des mittleren Wertes von h-pep), der Helix-Anfang aber verschiebt sich jetzt in Richtung auf den N-Terminus, was mit dem Fehlen des Prolins erklärt werden kann. Die sequentielle Verteilung des β -Turnanteils hat sich im Vergleich mit pepII.5 drastisch verändert und korrespondiert gut mit der dazu inversen Verteilung des α -Helixgehaltes, die im zentralen Peptidbereich maximal wird. Wiederum kann bei Asparagin 8 ein Einbrechen beim α -helicalen Anteil beobachtet werden, einhergehend mit der höchsten Tendenz zur Einleitung eines β -Turns. Für ein im Mittel gestrecktes Peptid spricht auch die C_α -Abstandsmatrix, die auch einen flexiblen C-Terminus andeutet (Leucin 11 hat in etwa den gleichen Abstand zu den drei N-terminalen Aminosäuren). Die beiden am höchsten populierten Tiefstenergie-Strukturen sind weitgehend α -helical strukturiert, wobei dieser Bereich von Lysin 3 bis Lysin 10 bzw. Asparagin 8 reicht. Der Unterschied zwischen beiden Strukturen beschränkt sich ausschließlich auf den C-Terminus, das terminale Leucin interagiert in der langen Helix mit Leucin 7, bei der kurzen dagegen mit den Seitenketten von Phenylalanin 1 und Tryptophan 5, was die Helix vorher abbrechen läßt. Die Ringsysteme der beiden letztgenannten Aminosäuren lassen in beiden Strukturen ein sog. „Aromaten-Stacking“ erkennen, wobei die planaren Seiten der aromatischen Seitenketten in Kontakt treten.

FDKEWNLIQKL (pepII.7)

Dieses Peptid zeigt ein sehr ähnliches Konformationsverhalten wie das vorangegangene, das sich an Position 8 von ihm unterscheidet. Die Einführung von Isoleucin an Stelle von Asparagin bewirkt eine fast ideale Normalverteilung des α -Helixgehaltes entlang der Primärsequenz, obwohl summarisch die Tendenz zur Helixbildung weiter abnimmt. Von den vier statistisch höchstgewichteten Strukturen sind drei überwiegend helical und weisen dieselben Merkmale auf wie die besprochenen Konformationen von pepII.6. Die mit 12% am Ensemble beteiligte Konformation zeigt ein gestrecktes Rückgrat des zentralen Peptidteils und Termini, die zum Mittelteil zurückgefaltet sind. Hier wird auch ein hydrophobes Cluster beobachtet, das Phenylalanin 1, Leucin 7, Isoleucin 8 und Leucin 11 umfaßt. Obwohl der energetische Beitrag der van-der-Waals-Kontakte wie auch der Wasserstoffbrückenbindungen schwächer ist als bei den helicalen Strukturen, wird dies durch eine wesentliche günstigere Solvation kompensiert, da viele polare Rückgratotope wasserzugänglich sind.

FDKEWNLIQQL (pepII.8)

Insgesamt sinkt die Fähigkeit zur Ausbildung von α -Helices bei fortschreitender Substitution weiter, während offensichtlich das Auftreten von Turnstrukturen zunimmt und bei Isoleucin 8 in fast 60% aller angenommenen Konformationen beobachtet werden kann. Eine Bevorzugung helicaler Strukturen ist auch im Raum der Hauptachsen nicht mehr auszumachen, ganz im Gegenteil gibt es eine leichte Konzentration im Bereich der β -verbrückten Konformationen. Wie die C_{α} -Abstandsmatrix der statistisch gewichteten Niedrigenergiestrukturen erkennen läßt, haben die C-terminalen Glutamin 10 und Leucin 11 einen großen mittleren Abstand zu den Aminosäuren der Positionen 2 bis 5, einen kleineren dagegen zu Phenylalanin 1. Das widerspiegelt sich in der höchstgewichteten Struktur der Simulation, die identisch zu der beim pepII.7 beschriebenen ein gestrecktes Peptidrückgrat in der Mittelsequenz hat und deren Termini auf den zentralen Teil zurückgefaltet sind mit einem doppelten $\beta(i,i+1)$ -Turn bei Aspartat 2/Lysin 3 bzw. einem Typ IV-Turn beginnend bei Isoleucin 8. Daneben treten aber auch viele Niedrigenergiestrukturen auf, die im zentralen Teil eine α -Helix ausbilden, die entweder durch das Aromaten-Stacking von Phenylalanin und Tryptophan am N-Terminus stabilisiert wird (längere Helix) oder durch hydrophobe Wechselwirkungen von Phenylalanin 1 mit Leucin 7 bzw. Tryptophan 5 mit Leucin 11 an beiden Termini (kürzere Helix). Der C-Terminus nimmt aber eine größere Vielfalt an Konformationen an als bisher beobachtet.

FDKEWNLIQQN (pepII.9)

Die Helicität erreicht durch die Substitution Leucin 11 \rightarrow Asparagin den Tiefstpunkt entlang des Transformationsweges von h-pep nach u2-pep mit gerade noch 3% Anteil im statistischen Mittel. Aber auch die Tendenz zur Turnbildung sinkt im Vergleich mit den vorhergehenden Peptiden; bemerkenswert ist besonders ist das Absinken des β -Turnanteils aber bei Isoleucin 8. Der Wegfall der hydrophoben Seitenkette an der Position 11 führt dazu, daß sich der N-Terminus nicht mehr auf den zentralen Teil zurückfaltet oder eine α -Helix begünstigt, um einen optimalen Kontakt zu Leucin 7 oder anderen hydrophoben Residuen zu etablieren. So liegt auch bei allen Tiefstenergie-Strukturen mit über 5% Gewicht die N-terminale Peptidhälfte in gestreckter Form vor, während sich der C-Terminus auf den mittleren Peptidteil zurückfaltet, um ein hydrophobes Cluster von Phenylalanin 1 mit den zentralen aliphatischen und aromatischen Seitenketten zu bilden.

FDKEWNLIEQN (u2-pep)

Die Verteilung der energietiefen Strukturen im Konformationsraum ist auch hier völlig gleichförmig im gesamten Bereich der besuchten Konformationen. Es scheinen keine der klassischen Sekundärstrukturelemente bevorzugt zu werden. Unter den Lösungen mit den höchsten Gewichten finden sich keine helicalen Anteile mehr, obwohl summarisch die Tendenz zur Bildung von α -Helices wieder leicht gestiegen ist im Vergleich zu pepII.9. Alle Konformationen mit über 5% Gewicht bilden die bereits beschriebene, gestreckte Konformation mit einem oder beiden zurückgefalteten Termini aus und sind von Phenylalanin 1 bis Glutamat 9 nahezu identisch. Das herausragende Merkmal dieser Strukturen ist der enge hydrophobe Kontakt zwischen Phenylalanin 1 und Isoleucin 8. Die beiden C-terminalen Aminosäuren nehmen in den Strukturen eine Reihe von ungeordneten Konformationen ein, ohne polare Kontakte auszubilden. Die N-terminalen Aminosäuren bilden einen multiplen Turn gemischter Typen.

3. 3. 2. 1 Zusammenfassender Vergleich der Konformationsanalysen für die Transformationspeptide zwischen h-pep \leftrightarrow u2-pep

Auch bei den Simulationen der Peptide aus dem Transformationsweg h-pep \leftrightarrow u2-pep wird der Konformationsraum hinreichend homogen abgesucht, wie die Projektionen entlang der drei größten Eigenvektoren der angulären Distanzmatrix der Referenzstrukturen zeigen (aus Platzgründen keine Abbildung). Besonders bei den ersten Substitutionen, ausgehend vom h-pep, können Konzentrationen der Niedrigenergie-Konformationen im Bereich der α -helicalen Strukturen beobachtet werden. Das konformationelle Verhalten der Übergangspeptide aus dem Transformationsweg ändert sich nicht so markant, wie dies bei der Umwandlung von h-pep in u1-pep der Fall zu beobachten war. Am deutlichsten ist mit zunehmender sequentieller Entfernung vom h-pep ein Absinken der Neigung zur Ausbildung von α -Helices auszumachen (Abb. 12). Einhergehend ist eine leichte Zunahme der Bildung von β -Turns zu beobachten, die besonders von den N-terminalen Aminosäuren und Isoleucin 8 ausgebildet werden und zu einer häufig besuchten Konformation führen, die man in etwa als „Klammer-Konformation“ bezeichnen könnte und ein gestrecktes Peptidrückgrat im zentralen Abschnitt und darauf zurückgefaltete Termini aufweist. Auffällig ist das sehr seltene Vorkommen von β -verbrückten Konformationen oder solchen mit kurzen β -Faltblattabschnitten entlang des gesamten Umwandlungsweges. Diese β -Haarnadelmotive wurden, wie bereits dargelegt, im Transformationsweg h-pep \leftrightarrow u1-pep durch die Einführung von zwei zentralen, aufeinander

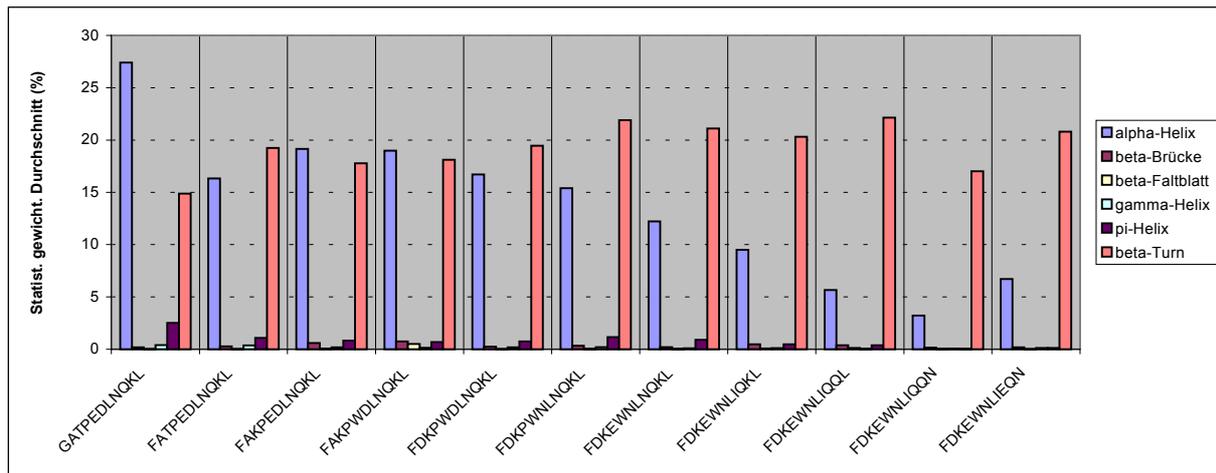


Abb. 12. Zusammenfassender Vergleich des konformationellen Verhaltens der Peptide aus dem Transformationsweg h-pep \leftrightarrow u2-pep. Für die häufigsten Sekundärstrukturelemente sind die statistisch gewichteten Anteile während der Trajektorie für das Gesamtpeptid dargestellt. Die β -Turns repräsentieren dabei alle während der Trajektorie beobachteten Typen.

folgenden Glycinen induziert, da durch das Fehlen sterisch anspruchsvoller Seitenketten enge reverse Turns möglich sind. Diese Möglichkeit fehlt bei der schrittweisen Umwandlung des h-pep in die u2-pep-Sequenz. Besonders in der zweiten Hälfte des Umwandlungsweges finden sich vielmehr unter den wahrscheinlichsten, energietiefsten Strukturen Konformationen mit mehr oder weniger gestreckten Rückgrat-Elementen, da auch die Helixbildung nicht mehr bevorzugt ist.

Obwohl die Abgrenzung von sequenzabhängigen Stufen beim konformationellen Verhalten der Übergangspeptide h-pep \leftrightarrow u2-pep nicht so scharf festgelegt werden kann und diese quantitativ eher kontinuierlich ineinander gehen, sollen doch grob wieder drei Phasen unterschieden werden:

- h-pep bis pepII.5: Die Einzelaustausche von Aminosäuren finden ausschließlich in der N-terminalen Peptidhälfte statt. Obwohl die Helicität kontinuierlich mit fortschreitender Substituierung abnimmt, findet sich bei fast allen Tiefstenergie-Strukturen die bereits beim h-pep beobachtete C-terminale α -Helix mit einer Höchstlänge von Prolin 4 bis Lysin 10. Die verminderte Helicität kann auf „long range“-Wechselwirkungen, besonders hydrophober Art, der neu hinzugekommenen Aminosäuren, insbesondere von Phenylalanin 1, mit zentralen oder C-terminalen Residuen zurückgeführt werden.
- pepII.6 bis pepII.9: Der Austausch von Prolin 4 bewirkt, wie dies auch schon bei der Transformation h-pep \leftrightarrow u1-pep beobachtet wurde, eine Verschiebung des sequentiellen α -helicalen Verteilungsprofils in Richtung des N-Terminus. Die Helicität aber nimmt weiter ab und jetzt werden auch keine Cluster der wahrscheinlichsten Strukturen im Konformationsraum mehr beobachtet. Die nahezu normale Verteilung der helicalen

Elemente entlang der Sequenz findet ihre Entsprechung in der dazu inversen Verteilung an β -Turnmotiven, die an den Termini am größten und in der Peptidmitte am geringsten ist. Die Konformationen mit den höchsten statistischen Gewichten sind in der Regel im zentralen Teil gestreckt, während sich ein oder beide terminalen Rückgratabschnitte auf den Mittelteil zurückfallen.

- u2-pep: Der letzte Aminosäure-Austausch ist nicht eigentlich deutlich abgrenzbar in seinen Konsequenzen von der vorangegangenen Phase, es ist nur ein erneutes Ansteigen der Helicität zu erkennen. Das Sequenzprofil der α -Helixbildung verschiebt sich deutlich in N-terminale Richtung, was allerdings auch schon beim pepII.8 sichtbar war. Die Vorzugskonformationen sind auch hier solche mit gestrecktem Rückgrat im zentralen Peptidteil und ein zurückgebogener N-terminaler Abschnitt, während der C-Terminus oft auch gestreckt bleibt.

3. 3. 2. 2 α -Helixbildung im Vergleich der Simulationen mit Vorhersageprogrammen

Wiederum wurden die Programme HELIXv1.5 und AGADIR zum Vergleich der Helicitätsprognosen herangezogen. Wie in Abb.13 zu erkennen ist, ist die Übereinstimmung mit der während der Optimierungssimulationen ermittelten Tendenz nicht so groß wie bei dem Übergangsweg h-pep↔u1-pep. Bis zum pepII.5 postuliert das Programm AGADIR gleichfalls ein kontinuierliches Absinken der Helicität, wobei der Maximalwert auch immer in

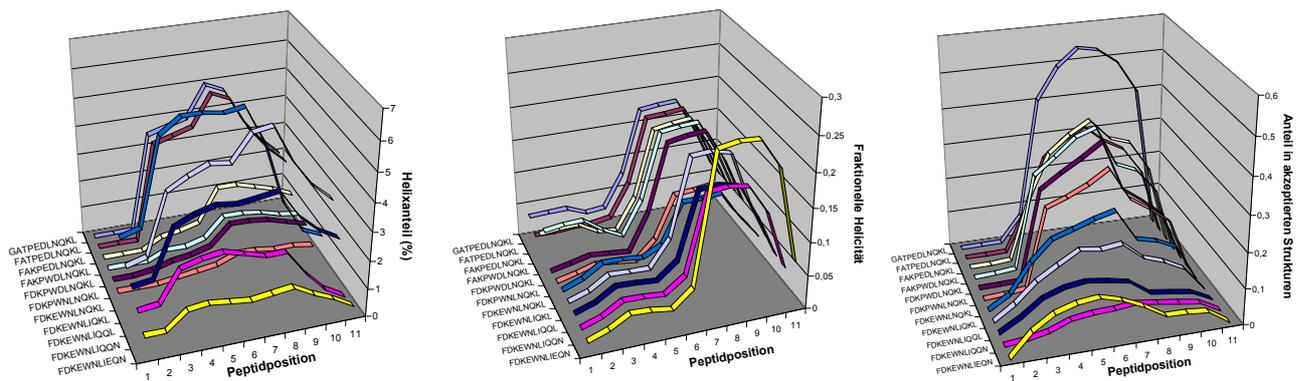


Abb. 13. Vergleich von Helicitätsvorhersagen mit den während der Simulationen beobachteten Helicitäten der Peptide aus dem Transformationsweg h-pep↔u2-pep. Das h-pep ist jeweils hinten, das u2-pep vorn. Links: Vorhersage nach AGADIR, Mitte: Vorhersage nach HELIXv1.5, Rechts: Simulationsergebnisse. Bei den Vorhersagen wurden folgende Bedingungen angenommen: pH 7,0, Ionenstärke 0.1 M (AGADIR), ≤ 1 M NaCl (HELIXv1.5), T=273 K (AGADIR), N-Terminus acetyliert, C-Terminus amidiert.

der C-terminalen Peptidhälfte vorhergesagt wird. Der Austausch von Prolin soll dann bei pepII.6 ein sprunghaftes Ansteigen, besonders im N-terminalen Teil, bewirken, bevor die Helicität bei fortschreitender Substitution bis hin zum u2-pep wieder sinkt. Am Ende des Transformationsweges sagt AGADIR ebenfalls eine Verschiebung des Verteilungsprofils in N-terminale Richtung voraus.

Die Vorhersage-Ergebnisse des Programmes HELIXv1.5 dagegen zeigen keinerlei Übereinstimmung mit den bei den Simulationen beobachteten Tendenzen. Sowohl das Verteilungsprofil entlang der Sequenz als auch die absoluten Werte ändern sich entlang des Transformationsweges danach kaum. Das u2-pep soll entsprechend der Vorhersage von HELIXv1.5 sogar eine im Schnitt höhere Helicität als das h-pep aufweisen.

3. 4 Konformationen einiger antigener Peptide in CB4-1 Komplexstrukturen

Von einigen Komplexen des Antikörpers CB4-1 mit verschiedenen Peptiden konnten mittlerweile hochaufgelöste Kristallstrukturen bestimmt werden (Keitel et al., 1997; Hoffmüller et al., 2000). Neben der nativen Antikörperstruktur (PDB Code 1cfq) und den Strukturen mit dem Wildtyp-Epitopeptid GATPQDLNTnL (PDB Code 1cfn) sowie dem D-Peptid Ikgpl (PDB Code 1cft) sind auch fünf Komplexstrukturen mit Peptiden aus dem Transformationsweg h-pep↔u1-pep bekannt: mit dem h-pep GATPEDLNQKL (PDB Code 1bog), dem pepI.2-Peptid DATPEDLNAKL (PDB Code 1hh9), dem pepI.4 DATPEDLGARL (PDB Code 1hh6), dem pepI.5 DATPEWLGARL (PDB code 1hi6) sowie dem Endpeptid des Transformationsweges, dem u1-pep GLYEWGGARIT (PDB code 1cfs). Die Auflösung der Kristallstrukturen beträgt zwischen 2,55 und 2,8 Å. Für Peptide aus dem Transformationsweg h-pep↔u2-pep ist es bisher noch nicht gelungen, Komplexstrukturen zu gewinnen.

RMSD (Å)	1bog	1hh9	1hh6	1hi6	1cfs	1cfn	1cfq	1cft
1bog	0	0,77	0,76	0,80	1,35	0,43	1,10	0,51
1hh9	1,01	0	0,33	0,42	1,50	0,78	1,11	0,79
1hh6	1,00	0,43	0	0,38	1,43	0,76	1,08	0,76
1hi6	1,03	0,54	0,40	0	1,38	0,79	1,04	0,78
1cfs	1,42	1,63	1,62	1,61	0	1,35	1,22	1,25
1cfn	0,49	1,06	1,06	1,06	1,41	0	1,06	0,49
1cfq	1,38	1,53	1,54	1,54	1,36	1,38	0	1,01
1cft	0,57	1,09	1,07	1,09	1,39	0,57	1,37	0

Tab. 4. Mittlere Abweichung (root mean square deviation, RMSD) in Å nach optimaler Superposition der Antikörperstrukturen von CB4-1 in verschiedenen Peptidkomplexen bzw. nativ (1cfq). In kursiver Schrift sind die Abweichungen nur der CDR's nach deren optimaler Superposition gegeben.