

4. Diskussion

4. 1 CB4-1 bindende Transformationspeptide: Schlüsselaminosäuren, Vorzugskonformation und Entropie

Die Wichtigkeit einer Aminosäure an einer bestimmten Position eines Bindemotivs kann durch Bindungsstudien wie Substitutionsanalysen und Längenanalysen eruiert werden. Wodurch aber wird eine derart identifizierte Residue zur Schlüsselaminosäure und was charakterisiert sie?

Offensichtlich ist die Annahme, daß eine Schlüsselaminosäure auch immer einen spezifischen Kontakt zum Rezeptormolekül etabliert, unzulänglich und nicht hinreichend. Wie andere Autoren am Beispiel von Komplexen von Thrombin und intestinalem Fettsäure-bindendem Protein (IFABP) erläutert haben (Greenspan et al., 1999), kann man aus der Beobachtung eines intermolekularen Kontaktes in der Kristallstruktur eines Komplexes nicht auf den Beitrag zur Stabilisierung dieses Komplexes schließen. Die Autoren stellen auch fest, daß ein Bindungsverlust in Folge des Austausches einer bestimmten Rezeptorresidue durch Alanin, wie sie bei der sog. *Alanin Scanning Mutation* (ASM) üblich ist, nicht als Hinweis darauf verstanden werden kann, daß diese Aminosäure auch tatsächlich direkt an der Ligandenerkennung beteiligt ist. Vielmehr muß in Betracht gezogen werden, so die Autoren, daß die Ersetzung einer Aminosäure die Eigenschaften des freien Makromoleküls beeinflusst bzw. größere Änderungen der Entropie während der Komplexbildung hervorruft.

In der vorliegenden Arbeit sind nun weitere Indizien für eine mögliche Multikausalität individueller Wichtigkeiten vorgestellt. Im Gegensatz zu den erwähnten Studien, die Austausche an definiert gefalteten Proteinstrukturen untersucht haben, die deren Gesamtfaltung nicht beeinträchtigt, sind es hier Substitutionen an potentiell hochflexiblen, kleinen Peptiden. Die Substitutionsanalysen der CB4-1 bindenden Peptide h-pep und ul-pep und der aus ihnen durch Einzelaustausche hervorgegangenen Transformationspeptiden zeigen hochaufgelöst die Wichtigkeiten der einzelnen Aminosäurepositionen für das Gesamtereignis der Bindung an den Antikörper. Zumindest für einige der Komplexe sind auch Kristallstrukturen bekannt. Einige Aspekte von Schlüsselaminosäuren können daran und mit Hilfe der Konformationssimulationen beleuchtet werden:

Die beiden Leucine 7 und 11 im h-pep GATPEDLNQKL, die als essentiell erkannt werden, da ein Austausch an einer der Positionen bei unveränderter übriger Sequenz zum Verlust der Bindung an CB4-1 führt, bleiben während der nachfolgenden fünf Transformationsschritte in

den jeweiligen Übergangspeptiden erhalten und ihre Spezifität ändert sich gleichfalls offensichtlich nicht. Das läßt zunächst vermuten, daß in diesen sechs Peptiden die Kontakte der Leucine zur *combining site* des Antikörper gleichfalls identisch sind. Das ist jedoch nicht der Fall. Bereits im h-pep kann man die Exklusivität von Leucin an der 11. Position nicht durch einen Antikörperkontakt erklären, da es überwiegend lösungsmittlexponiert ist. Hingegen ist das gleiche Leucin im nächsten Transformationspeptid, bei dem Glutamin 9 durch Alanin ausgetauscht wurde, bei gleicher Peptid-Gesamtkonformation in einer hydrophoben Tasche zu finden, in der sich im h-pep Lysin 10 befand. Die Seitenketten von Lysin und Leucin haben offenbar die Positionen vertauscht. Der Kontakt von Leucin 7 ist in diesen beiden Peptiden identisch, jedoch verschieden von dem in den Peptiden des vierten und fünften Transformationsschrittes beobachteten, obwohl die Spezifität in den Substitutionsanalysen nicht unterscheidbar ist. In den letztgenannten Peptiden ist Leucin 11 ähnlich positioniert wie im ersten Transformationspeptid, zeigt aber nicht immer einen engen Kontakt.

Bei gleicher, durch Bindungsstudien ermittelter absoluter Wichtigkeit ist die relative strukturelle Wichtigkeit also verschieden. All diese Peptide binden aber in einer gleichen, gestreckten Gesamtkonformation, die in der C-terminalen Hälfte als nascente Helix beschrieben werden kann. Vergleicht man die Bindekonformation mit den Ergebnissen der Konformationssimulationen der freien Peptide, so fällt auf, daß über den ersten Teil des Transformationsweges, bei dem die Muster der Spezifitäten in den Substitutionsanalysen und die Affinitäten vergleichbar bleiben, auch die Vorzugskonformationen ähnlich sind. Eine starke α -helicale Präferenz wird im h-pep erkannt, auch bei den Nachfolgepeptiden, obwohl Helicität mit einer Ausnahme geringer wird. Stabilisiert wird diese Helix durch eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Leucin 7 und 11, die genau eine Helixwindung voneinander entfernt sind (im pepI.3 darüber hinaus durch elektrostatische Anziehung zwischen Aspartat 6 und Arginin 10, die auch durch eine Helixwindung getrennt sind). Die Einführung eines Glycins in die Sequenz läßt dann abrupt die Helicität einbrechen und eine Bevorzugung von coil-Strukturen und β -Turn/Haarnadelmotiven bei den Simulationen erkennen. Bei gleichen enthalpischen Faktoren, die zur Bindung beitragen – die essentiellen Antikörperkontakte sind im h-pep GATPEDLNQKL und im pepI.4 DATPEDLGARL vergleichbar – und bei der gleichen bindenden Gesamtkonformation führt die Einsetzung von Glycin zu einer Erniedrigung der Bindungsaffinität. Diese Erscheinung kann also nur durch die Erhöhung der Entropie erklärt werden, die dadurch zustande kommt, daß das seitenkettenlose Glycin erheblich mehr Rückgratzustände einnehmen und ein größeres

Ensemble von energietiefen, einander unähnlichen Konformationen erzeugen kann, in dem das Gewicht der letztendlich bindenden Konformation sinkt.

Die Beobachtung, daß das C-terminale Leucin in der ersten Hälfte des h-pep \leftrightarrow u1-pep Transformationsweges eine Schlüsselaminosäure trotz eines wenig definierten Kontaktes zum Antikörper ist, kann verschiedene Ursachen haben. Denkbar ist, daß es im Komplex eine erkennbare Unordnung und Unschärfe der Kontakte gibt, daß also eine inhärente Mobilität des gebundenen Peptides auftritt, die durch Kristallstrukturaufklärung nicht analysierbar ist, da nur eine einzelne Konformation im Kristall auftritt oder die Elektronendichte eine gemittelte Konformationsfamilie repräsentiert. In der Tat sind bei den Kristallstrukturen der Transformationspeptide auch die B-Faktoren des C-Terminus deutlich höher als der Rest des Peptids. Derart große Bewegungen, wie es Leucin 11 im gebundenen Zustand aufweisen müßte, sind allerdings schwer vorstellbar und kaum in Übereinstimmung mit der Auffassung einer spezifischen Erkennung zu bringen, wie sie ja gerade bei Antikörpern wichtig ist, um in Konkurrenz zu vielen anderen eventuellen Bindern das intendierte Molekül zu finden. Eine andere Erklärung ist die bereits erwähnte, daß das Leucin eine Konformation des freien Peptids stabilisiert, die bevorzugt erkannt wird. Obwohl man aus den vorliegenden Daten keine Aussagen über Populationszeiten und -gleichgewichte treffen kann, ist dies stark anzunehmen. Eine experimentelle Überprüfung wäre allerdings extrem schwierig, da die Konversionszeiten einzelner Konformationen solch kurzer Peptide deutlich unter der Zeitauflösung der meisten Analysemethoden sind. Nussinov und Mitarbeiter stellten kürzlich fest: „... Moleküle oder Regionen, die Unordnung zeigen, werden als inhärent unstrukturiert betrachtet... Dennoch, auch wenn es erscheint, daß die Moleküle ungeordnet sind, existieren vorherrschende Konformationen, mit Populationszeiten höher als die aller alternativen Konformationen.“ (Tsai et al., 2001). Bei Annahme einer solchen Vorzugskonformation wird die Gesamtentropie im freien Peptid erniedrigt, was abträglich für die freie Energie ist; aber im Falle einer Bindung wird die Entropie sowieso verringert und dadurch erst ein enthalpischer Gewinn ermöglicht. Ist die Entropie also bereits vor dem Bindeereignis in einer bevorzugten Konformation verringert und die resultierende Anordnung der Seitenketten günstig für eine Einpassung in die Bindestelle, ist das Resultat eine schnelle Assoziation und damit eine hohe Affinität. Die in der Simulation beobachtete Vorzugskonformation des freien h-pep und die Konformation des h-pep im Komplex mit CB4-1 unterscheiden sich im Peptidrückgrat nur mit einem Rmsd von 2,7 Å.

Beide Erklärungsansätze, die Annahme einer Vorzugskonformation oder eine inhärente terminale Unschärfe im Komplex, sind aber gleichwertig, wenn es um den Einfluß des im 4.

Transformationschritt eingeführten Glycins geht, denn in beiden Fällen würde es zu einer Erhöhung der Entropie führen, entweder im freien Peptid oder im gebundenen. Für die Bedeutung des Begriffes Schlüsselaminosäure würde es im Falle einer Vorzugskonformation bedeuten, daß sich hier zwei entropische Faktoren gegenseitig eliminieren: Einerseits der Endeffekt des Leucins, der eine Helix stabilisiert und die Entropie verringert, aber damit die Assoziationsrate erhöht; andererseits der die Rückgratentropie erhöhende Einfluß von Glycin, der eine Helix destabilisiert und durch die vergrößerte Unordnung die Assoziationsrate senkt. Die Simulationen zeigen deutlich, daß mit der Einführung des Glycins das Auftreten von helicalen und gestreckten Strukturen verringert ist. Gleichzeitig bedingt aber der verbleibende Satz von Aminosäuren, daß das Peptid in einer gestreckten Form binden muß. Der Gesamteffekt ist eine Verringerung der Bindungsaffinität, die sich als Verringerung der Verdrängungskonstante messen läßt.

Der entropische Nachteil, den die Einführung des flexiblen Glycins in ebendiesen Aminosäuresatz nach sich zieht, kann aber in einer anderen sequentiellen Umgebung zu einem sterischen Vorteil werden. Das ist unzweifelhaft im Falle des u1-pep DGLYEWGGARI. Die durch die zwei hintereinander liegenden Glycine 7 und 8 hervorgerufene konformationelle Elastizität ist sicherlich nachteilig, aber sie kann eben auch Konformationen hervorbringen, die bei anderen Aminosäuren an ihrer Stelle sterisch stark benachteiligt wären, aber für die enthalpisch wichtigen Kontakte von Leucin 3, Tryptophan 6 und Isoleucin 11 unabdingbar sind. Sowohl das Fehlen von Seitenketten, die bei der für die Bindung nötigen räumlichen Anordnung der übrigen Aminosäuren van-der-Waals-Zusammenstöße mit dem Antikörper zur Folge hätten, als auch das Einnehmen von Rückgratwinkeln, die bei der gegebenen Länge des Peptids nötig, aber mit anderen Residuen nicht erreichbar wären, werden hier zu Vorteilen, die die erhöhte Entropie kompensieren.

Das Verhältnis zwischen Vorzugskonformation, Bindekonformation und Aminosäurezusammensetzung stellt sich also für die Peptidtransformation vom h-pep zum u1-pep folgendermaßen dar: Das h-pep bindet wie die unmittelbaren Nachfolgepeptide in der gestreckten Konformation einer nascenten Helix, was durch enthalpischen Wechselwirkungen (hydrophobe und polare) mit den Residuen der CB4-1 Bindungstasche bedingt wird. Diese Gesamtkonformation toleriert ohne große Veränderungen eine Reihe von Austausch innerhalb der Sequenz. Auch die freien Peptide bevorzugen helicale, gestreckte Konformationen, besonders in der C-terminalen Hälfte, die durch geringe Auffaltung in die Bindekonformation „überführt“ werden kann. Die Einführung von Glycin verschiebt die Präferenzen der freien Peptide in Richtung von Coil- und Turnstrukturen, während die

Bindung noch immer in gestreckter Form erfolgen muß auf Grund spezifischer Kontakte. Die Affinität sinkt und erreicht ein Minimum, wenn eine kritische Anzahl an enthalpischen Kontakten unterschritten ist. Eine schrittweise Ersetzung der „alten“ Kontaktresiduen führt dann zur Begünstigung einer gebogenen Rückgratstruktur in den gebundenen Peptiden und zur Optimierung der neuen spezifischen Kontakte, während auch die freien Peptide überwiegend Turn-Strukturen ausbilden, zumindest im C-terminalen Teil. Ein neues Set von essentiellen Aminosäuren bedingt sich gegenseitig.

Diese Korrelationen sind für die Transformation von h-pep GATPEDLNQKL zum u2-pep FDKIEWNLIEQN nicht so deutlich auszumachen, auch der Verlauf der Affinitäten ist hier undeutlicher, da es scheint, als ob sich nach dem Umschlagpunkt (nach Verlust des Prolins und Einführung von Isoleucin) eine „Erholung“ durch Optimierung von neuen Kontakten nur unzureichend vollzieht. Da eine gebundene Struktur von u2-pep nur prognostiziert werden kann (siehe unten), sind Aussagen über den Zusammenhang zwischen Vorzugs- und Bindekonformation ohnehin nicht genügend basiert. Sollte das vorgestellte Modell einer gestreckten Peptidkonformation von u2-pep im Komplex überwiegend stimmig sein, so findet hier zudem auch keine dramatische Änderung der gebundenen Konformation statt. Eine Veränderung der präferenziellen Strukturen der ungebundenen Peptide kann beobachtet werden, sie ist aber nicht so deutlich wie bei der anderen Peptidtransformation. Die Helicität nimmt im Verlauf der sukzessiven Austausch ab, die Vorzugskonformationen sind aber überwiegend gestreckte im zentralen Peptidteil, obwohl sie eine ganze Reihe von Sekundärstrukturmotiven aufweisen. Die Veränderung des Substitutionsmusters der gebundenen Peptide durch Einführung von Isoleucin ist nicht von einer markanten Veränderung bevorzugter Konformationen der freien Peptide begleitet, es ist daher anzunehmen, daß das veränderte Bindeverhalten mit veränderten Wechselwirkungen in der Antikörperbindungstasche verbunden ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß wichtige Aminosäuren eingeteilt werden können in:

- Enthalpische Schlüsselaminosäuren: Ein hochspezifischer Kontakt zum Rezeptor bestimmt die Wichtigkeit. Eine Austauschbarkeit mit physikochemisch ähnlichen Aminosäuren kann häufig beobachtet werden.
- Entropische Schlüsselaminosäuren: Sie bestimmen die Bevorzugung einer bestimmten Konformationsfamilie (bzw. Benachteiligung anderer), die bindungswichtig ist. Prolin und

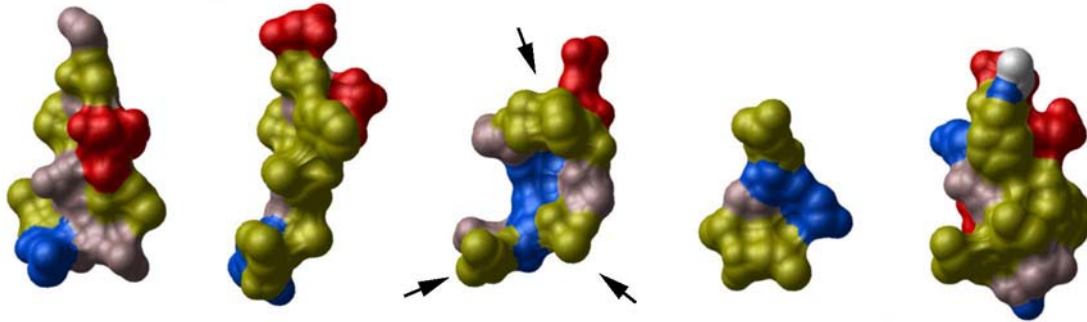


Abb 39. Oberflächenstruktur von CB4-1 bindenden Peptiden in ihren jeweiligen Komplexen. Die Kontaktflächen der Peptide sind dargestellt, d. h. der Betrachter sieht die in der Bindungstasche begrabene Seite. Von links: GATPEDLNQKL (h-pep), DATPEWLGARL (pepI.5), GLYEWGGARIT (u1-pep), IkGpl (d-pep) und FDKEWNLIEQN (u2-pep, gedocktes Modell). Hydrophobe Residuen sind gelb gefärbt, polare rosa, saure rot und basische blau. Die beiden linken Peptide haben bei identischer Rückgratkonformation eine völlig andere Kontaktfläche. Allen Peptiden gemeinsam sind protrudierende Oberflächenelemente (bei u1-pep mit Pfeilen markiert), die in entsprechende Mulden in der Bindungstasche des Antikörpers passen (siehe auch Abb. 15). Diese sind zwar in den meisten Fällen hydrophober Natur, aber lassen (wie beim h-pep) auch andere Kontakte zu. Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit der hydrophoben Kontaktflächen von u1-pep (Mitte) und u2-pep (rechts) bei verschiedenen Sequenzen.

Glycin sind in dieser Gruppe die wichtigsten entropieverringenden bzw. -vergrößernden Residuen, aber auch β -verzweigte Aminosäuren.

- Sterische Schlüsselaminosäuren: Sterische Verhältnisse entweder im gebundenen Zustand oder in der bevorzugt zur Bindung führenden Konformation erschweren den Ersatz durch andere Aminosäuren. Oft kann eine solche Residue auch nicht durch physikochemisch ähnliche Aminosäuren substituiert werden.

In den seltensten Fällen wird eine Schlüsselaminosäure nur in einer der Gruppen charakterisierbar sein. So kann man Leucin 7 im h-pep als enthalpische und entropische Schlüsselresidue ansehen: Sie macht sowohl einen hydrophoben Kontakt zum Antikörper als auch stabilisiert sie durch eine hydrophobe Wechselwirkung mit Leucin 11 eine helicale Konformation im freien Peptid. Die Glycine im u1-pep sind sowohl entropisch wichtig, denn sie führen zu gebogenen Rückgratstrukturen in den Vorzugskonformationen, wie sie auch im gebundenen Zustand beobachtet werden, als auch sterisch entscheidend, denn eine seitenkettenträgende Aminosäure an ihrer Stelle würde zu störenden Kollisionen mit den Antikörperresiduen führen.

4. 2 Substitutionsanalysen, Sequenzlandschaften und Bindungskontinuum

Die Bestimmung von Schlüsselaminosäuren, wie sie durch Bindungsexperimente geschieht, hat also nur einen Sinn, wenn man bedenkt, daß alle Aminosäuren in einem bindenden Peptid kooperativ und durch das Zusammenwirken von verschiedenen Faktoren wirken und daß diese nur für die jeweils gegebene Peptidlänge gültig sind. Ein unmittelbarer Schluß von der

Wichtigkeit, die sich aus einer Substitutionsanalyse ergibt, auf strukturelle Signifikanz im Komplex ist genau so unzuverlässig wie umgekehrt die Ableitung der Bedeutung aus der Komplexstruktur: „... Kontaktresiduen müssen nicht energetisch wichtige Residuen sein und andersherum, wichtige affinitätsbestimmende oder spezifitätsbestimmende Residuen müssen nicht Kontaktresiduen sein.“ (Greenspan et al., 1999). Ein gutes Beispiel hierfür sind die Komplexstrukturen von pepI.5 und u1-pep. Beiden ist Tryptophan 6 gemeinsam, das auch in der gleichen Bindungsspalte in ähnlicher Position tief zwischen leichter und schwerer Kette von CB4-1 begraben ist. Im gestreckt bindenden pepI.5 ergibt die Substitutionsanalyse aber eine Austauschbarkeit durch eine Reihe von polaren und geladenen Residuen, während es im u1-pep exklusiv ist. Also: Gleicher Kontakt, verschiedene Wichtigkeit. Das umgekehrte Beispiel bietet das terminale Leucin im h-pep und den Nachfolgepeptiden, wie oben beschrieben: Verschiedene Kontakte, gleiche Wichtigkeit.

Eine Substitutionsanalyse ist auch immer im Zusammenhang mit der durchschnittlichen Affinität zu sehen, die Art und Dauer der Detektion bestimmt und nur qualitativ mit dem Read-out des Detektionsgerätes korreliert. Das wird besonders deutlich an den Affinitätsminima der Transformationswege von h-pep in u1-pep und u2-pep. Beim Schritt von pepI.4 zu pepI.5 wird beispielsweise Tryptophan an Stelle von Aspartat 6 eingeführt, obwohl die Substitutionsanalyse dies scheinbar verbietet. In Wirklichkeit ist es nur ein Artefakt, denn bei längerer Detektion würde auch an der Tryptophan-Variante ein Signal erscheinen (wie das ja auch in der Analyse von pepI.5 geschieht). Gleichzeitig aber würde sich rein optisch das Muster der Schlüsselaminosäuren ändern, da ja in allen anderen Reihen Aspartat an der Position 6 ist, was ein viel stärkeres Signal zur Folge hat. So ist denn aber in der pepI.5 Substitutionsanalyse das Muster der Schlüsselaminosäuren vergleichbar, obwohl die absolute Affinität geringer, aber über die Varianten gleichmäßig ist.

Eine weiteres wichtiges Merkmal von Substitutionsanalysen ist, daß sie nur Einzelaustausche und immer nur eine bestimmte Peptidlänge berücksichtigen, was die Interpretation verfälschen kann. Die Peptidlänge bestimmt durch die Anzahl an Rückgrat-Einheiten sozusagen die Größe des Rahmenwerks, auf dem sich durch Anordnung verschiedener Seitenketten ein spezifitätsbestimmendes Muster von Atomgruppen ergeben kann. Innerhalb einer Substitutionsanalyse ist die Größe des Rahmenwerks also immer gleich, aber bei einer anderen Peptidlänge kann sich die Spezifität von Schlüsselaminosäuren durchaus ändern. Desgleichen ist die Wichtigkeit einer Aminosäure an einer Position immer nur im Zusammenhang mit den restlichen Aminosäuren des Peptids zu sehen, die ja in einer Substitutionsanalyse konstant bleiben. So würde man beispielsweise aus der

Substitutionsanalyse des TE33-Wildtyppeptids VPGSQHIDS (Abb. 30) schließen, daß an Position 8 nur Aspartat erlaubt ist und keine andere Aminosäure. Das gilt aber nur im Kontext der übrigen Sequenz: Wie gezeigt werden konnte, bindet das Peptid VPGSQHPPS ebenso an den Antikörper, obwohl Prolin an achter Stelle ist. Der gleichzeitige Austausch mehrerer Aminosäuren kann also zu einem anderen Bindeverhalten führen, als aus einer Substitutionsanalyse erwartet.

Es gibt kein absolutes Kriterium für eine Bindung, nur ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation. Selbst im Falle einer hochspezifischen Bindung eines monoklonalen Antikörpers gibt es nur differentielle Unterschiede in der Bindung von vielen ähnlichen Peptiden, wie sie zum Beispiel in einer Substitutionsanalyse präsent sind: Man muß eher von einem Bindungskontinuum in einem unscharf begrenzten Bereich des Sequenzraumes sprechen. Dieser Bereich kann in einem Sequenzraum einer bestimmten Dimension auch nur eine von vielen Inseln oder Clustern sein, zwischen denen es Überlappungen geben kann. Ob es immer eine Überlappung gibt, wie es bei den Transformationswegen von h-pep in u1-pep und u2-pep der Fall ist, ist letztlich ein Detektionsproblem und eine Frage, was man als „Rauschen“ der Bindung akzeptieren will. Form und Lage dieser Cluster zueinander gelten aber immer bloß für eine definierte Länge, selbst eine Aminosäure mehr oder weniger kann die Verhältnisse auf unvorgesehene Weise verändern.

4. 3 Modellierung von Antikörper-Komplexen mit linearen Peptiden: Konformationsänderungen und multiple Bindungsmodi

Jede Bindung hat ihre Ursache in einer Verringerung der freien Energie und wird durch das Zusammenspiel von enthalpischen und entropischen Faktoren bestimmt. Da eine Bindung die Einfrierung einer Konformation bzw. einer begrenzt flexiblen Konformationsfamilie ist, also eine Erniedrigung der konformationellen Entropie bedeutet, muß diese durch eine Erhöhung von Enthalpie im Verlauf der Bindung überkompensiert werden, damit es zu einer Erniedrigung der freien Energie kommt. Bei im zeitlichen Mittel strukturell definierten Entitäten, also gefalteten Proteinen, ist die Entropieverringerung, zumindest für das Rückgrat, bereits vor dem Bindeereignis geschehen. Bei flexiblen Peptiden tritt dies erst im Verlauf der Bindung ein. Die dabei erkannte Konformation muß nicht die Vorzugskonformation des freien Peptids sein und kann mit einem nur geringen Gewicht im Strukturensemble vorhanden sein. Diese Konformation wird im Laufe der Bindung dem Ensemble entzogen und wird

entsprechend der kinetischen Barrieren der individuellen Energielandschaft durch Umwandlung aus anderen Konformationen nachgeliefert. Die Verschiebung des Gleichgewichtes bewirkt aber gleichzeitig auch eine Veränderung der Energielandschaft, so daß sich die Wichtungen bzw. Populationszeiten der Konformationen verschieben können, wie dies im Konzept der Faltungs- und Bindungstrichter diskutiert wird (Tsai et al., 1999a; Tsai et al., 1999b). Aber nicht nur die Energieflächen des einen Bindepartners, auch die des anderen kann sich im Verlauf der Bindung verändern. Bei Proteinen als Rezeptoren ist sie natürlich nicht so zerklüftet wie die eines flexiblen Binders, aber eine präferentielle Erkennung einer selten eingenommenen Konformation kann auch beim Rezeptor zu einer Höhergewichtung derselben führen, was sich letztlich als Konformationsänderung im Vergleich zum nativen Protein äußert. In Wirklichkeit ist also anzunehmen, daß nicht die Bindung eines Moleküls eine Konformationsänderung im Sinne eines induzierten Fits führt (was ja auch kaum Änderungen an vom Bindungsort weit entfernten Proteinteilen erklären kann), sondern daß diese veränderte Struktur von Anfang an im Ensemble, wenn auch sehr gering repräsentiert, vorhanden war und erst im Verlauf der Bindung durch eine bevorzugte Wechselwirkung mit dem Bindepartner stärker ins Gewicht fällt und eventuell sogar die einzige ist, die kristallisiert und strukturell charakterisiert werden kann. Es sind sogar Fälle bekannt, z. B. bei Mutanten von WW-Domänen, wo erst im Verlaufe der Bindung eines Peptids ein Protein im überwiegend gefalteten Zustand vorliegt, während es unkomplexiert zum großen Teil ungeordnet war (Koepp et al., 1999).

Bei den mit Kristallstrukturen bekannten Peptidkomplexen von CB4-1 sind solche Konformationsänderungen, zum Teil lokaler, zum Teil aber auch globaler Natur, sichtbar. So ist zum Beispiel die mittlere Entfernung der leichten von der schweren Kette im Komplex mit u1-pep größer als beim h-pep Komplex; auch werden unterschiedliche Seitenkettenorientierungen und -konformationen beobachtet. Es ist klar, daß das Ausmaß einer Konformationsänderung im Verlauf einer Bindung nicht vorhergesagt werden kann und daher eines der hauptsächlichen Probleme für die Modellierung von Komplexen darstellt, besonders im Falle von Antikörpern, wo die Bindungstasche von zwei recht flexibel miteinander verbundenen Domänen gebildet wird, die sich gegeneinander verschieben können. Aber selbst mit der gebundenen Struktur des Antikörpers als Docking-Partner ist es für lineare Peptide, zumindest für die hier untersuchte Länge von 11 Aminosäuren, kaum möglich, die korrekte Komplexstruktur durch Modellierungen zu identifizieren. Dies kann im Prinzip zwei Ursachen haben: entweder ist die Zielstruktur nicht in der Gesamtheit aller produzierten Konformationen vorhanden, d. h. die gesuchte Information wird gar nicht

erzeugt, oder die Zielstruktur wird nicht als gut erkannt, d. h. die gesuchte Information wird falsch bewertet. Im ersten Fall ist die Konformationserzeugung ungenügend, im zweiten das Kraftfeld (oder ein anderes Bewertungsschema, wie Oberflächenkompatibilität o. ä.). Bei den vorgestellten Docking-Simulationen der linearen Peptide können beide Szenarien zutreffend sein. Es wurde zur Repräsentation des Antikörpers ein weiches Potential gewählt, das zusätzlich aufgeweitet wurde, um Konformationsübergänge zu erleichtern und die Oberfläche des Antikörpers „unschärfer“ zu machen, d. h. um leichte lokale Konformationsänderungen zu mimikrieren. Das führt natürlich auch zu einer gewissen Ungenauigkeit bei der energetischen Bewertung der erzeugten Peptidkonformationen. Dennoch führt die Tatsache, daß Simulationen der linearen Peptidkomplexe strukturell selten konvergent waren, zu der Annahme, daß die enorme Anzahl von Freiheitsgraden trotz einer sehr großen Anzahl von stochastischen Schritten eine erschöpfende Konformationserzeugung beeinträchtigt. Es sind ja auch vereinzelt Niedrigenergie-Konformationen identifizierbar, die der gesuchten sehr ähnlich sind (z. B. bei den h-pep und u1-pep-Komplexen), aber eben nicht in allen Simulationen. Daß die Modellierung des u2-pep-Komplexes mit CB4-1 strukturell konvergent war, ist daher wohl eher ein Glücksfall. Es ist ja in allen Fällen von randomisierten Strukturen ausgegangen worden ohne manuelle Intervention oder Vorinformation; möglicherweise waren die konvergenten Rechnungen des u2-pep bei Simulationsbeginn zufällig in einem Bereich des riesigen Konformationsraumes, von wo die Zielstruktur in der vorgegebenen Anzahl von 100 Mill. Funktionsaufrufen erreichbar war.

Die Zielstruktur, also die Peptidkonformation in der Kristallstruktur, ist beim Docking linearer Peptide, selbst bei Verwendung der gebundenen Antikörperstruktur für die Modellierung, also nicht verlässlich identifizierbar. Es stellt sich allerdings die Frage, inwieweit der Begriff einer Zielstruktur sinnvoll ist bzw. ob der durch Kristallstrukturaufklärung beobachtbare Bindungsmodus die ganze Realität widerspiegelt. Weit verbreitet ist die Ansicht, daß es für ein Paar von gebundenen Molekülen einen singulären, optimalen Komplex gibt. Das muß jedoch noch nicht einmal für Proteine der Fall sein, geschweige denn für die viel flexibleren Peptide. Neueste Arbeiten (Decanniere et al., 2001) zeigen z. B. für einen Antikörperkomplex mit Lysozym, daß ein und derselbe Komplex in verschiedenen Entitäten mit signifikanten Unterschieden bei den Kontaktflächen vorliegen kann, sogar im selben Kristall, was unterschiedliche Lösungsmiteleinflüsse ausschließt. Die unterschiedlichen Bindekonformationen müssen zu einem gewichtigen Anteil in der Lösung vorhanden sein, damit es zum Kristallwachstum kommt, schließen die Autoren, so daß die Beobachtung kein Artefakt der Kristallisation sein kann. In diesem Licht muss man auch die

in dieser Arbeit als Vorgabe zur Verifizierung der Modellierungsmethode verwendeten Kristallstrukturen der Antikörper-Peptid-Komplexe sehen. Unter anderem bietet sich hier eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die oben beschriebenen Unstimmigkeiten zwischen den Bindungsdaten der Substitutionsanalyse und der Komplexstruktur von h-pep mit CB4-1. So ist denkbar, daß die beobachtete Komplexkonformation des h-pep nur eine von mehreren in Lösung vorhandenen ist und daß nur diese eine zur Kristallisation geführt hat. Es stellt sich darüber hinaus die Frage, wie die Verhältnisse für die Komplexstrukturen der Transformationspeptide, die mit zum Teil sehr geringer Bindungsaffinität an CB4-1 binden, aussehen. Der Aminosäuresatz ist durch Substitutionen in diesen Peptiden ja nicht mehr für eine starke, hochspezifische Bindung optimal und es ist wahrscheinlich, daß es eine Anzahl von bindenden Konformationen gibt, die zeitlich nebeneinander existieren. Besonders der Punkt der Transformationswege, wo das Muster der Substitutionsanalysen umschlägt und die Bindungsaffinität das Minimum durchschreitet, ist wohl eher durch ein Ensemble von Peptidkonformationen und durch multiple Bindungsmodi gekennzeichnet als durch eine einzelne, zeitlich und räumlich konstante Struktur. Eine Analyse durch Röntgenkristallstruktur-Analyse würde für ein solches Ensemble unmöglich sein. Die Vorgabe einer einzelnen Zielstruktur eines Peptid-Antikörper-Komplexes für die Überprüfung von Modellierungsergebnissen ist daher mit Fragezeichen zu versehen. Andererseits ist die Entscheidung, welche Strukturen aus einem Konformationsensemble einer Simulation den reellen eines Komplexes in Lösung entsprechen, kaum zu treffen. Die Wichtigkeit einer Aminosäure im Bindepeptid, wie sie aus Substitutionsanalysen abgeleitet werden kann, ist jedenfalls als Kriterium ungeeignet, da sie, wie bereits dargelegt, nicht einem energetisch stabilisierenden Kontakt entsprechen muß. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung bemerkenswert, daß z. B. bei der Simulation des u1-pep Komplexes mit CB4-1 in einer großen Anzahl von Niedrigenergie-Lösungen der C-terminale Teil des Peptids „richtig“ gedockt war, also der Kristallstruktur entsprach, während die N-terminale Hälfte eine große Bandbreite an Konformationen annahm. Diese Strukturen sind natürlich unter dem Kriterium der „Zielstruktur“ verworfen worden.

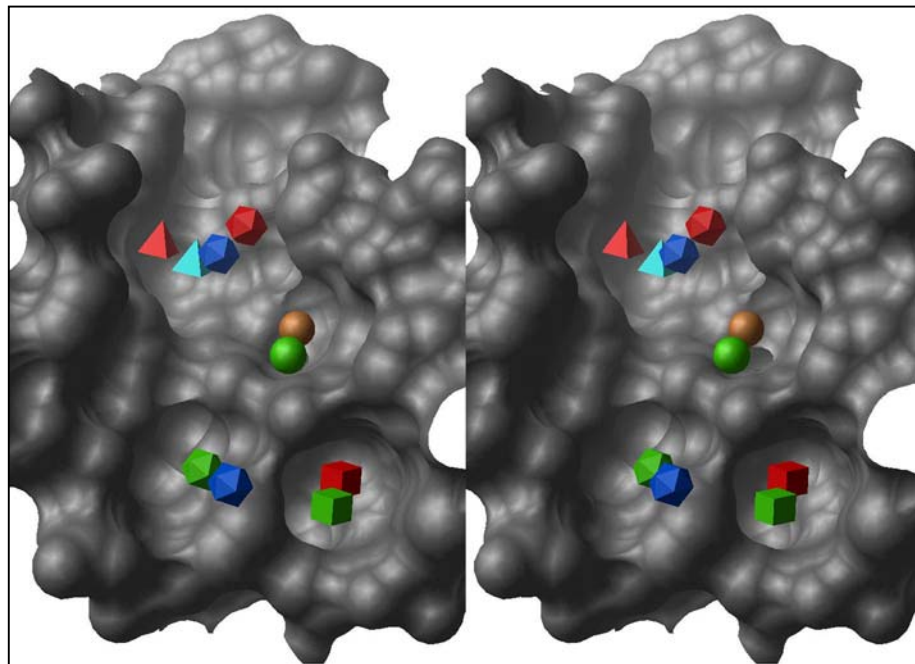


Abb. 40. Kreuzreaktivität und Polyspezifität sind nicht sauber von einander zu unterscheiden. In der Stereoabbildung ist die Bindungstasche von CB4-1 mit den Positionen ausgewählter, wichtiger Peptid-Seitenketten aus verschiedenen Komplexen dargestellt. Rot: u1-pep, blau: d-pep, cyan: pepI.5, braun: h-pep, grün: u2-pep. Tetraeder: Tryptophan, Icosaeder: Leucin, Würfel: Isoleucin, Kugel: Asparagin. Das Modell von u2-pep vereint Charakteristika anderer Peptide, obwohl die entsprechenden Aminosäuren in einem anderen sequentiellen Zusammenhang stehen; andere (nicht dargestellte) Kontakte sind dagegen einzigartig. Die Marker geben die Positionen der Massenschwerpunkte der Seitenketten wieder.

4. 3. 1 Das Modell des CB4-1 Komplexes mit u2-pep *FDKEWNLIEQN*

Als einziges untersuchtes System linearer Peptid-Komplexe waren die Simulationen für das u2-pep, dessen Komplexstruktur bisher nicht mit Kristallstrukturanalyse gelöst werden konnte, strukturell konvergent. Dies ist umso bemerkenswerter, da für den Docking-Partner die Koordinaten des nativen Antikörpers verwandt wurden. Vergleicht man die Modellstruktur des u2-pep mit anderen, bekannten linearen Peptiden in ihren jeweiligen CB4-1 Komplexen, so fällt auf, daß es viele Übereinstimmungen gibt, obwohl keine Sequenzähnlichkeit vorhanden ist. Glutamat 4 ist beispielsweise in Kontakt zu den stark basischen Residuen Arg 50 und 53 des Loops 2 der leichten Kette. In vergleichbarer räumlicher Umgebung sind auch Glutamat 5 bei h-pep *GATPEDLNQKL* und bei u1-pep *DGLYEWGGARI* in den jeweiligen Kristallstrukturen zu finden. Diese Position ist bei h-pep kaum bindungswichtig und beliebig substituierbar, bei u1-pep dagegen empfindlich gegenüber Austauschen. Im u2-pep kann Glutamat nicht ohne Bindungsverlust ausgetauscht werden – ein Vergleich von Wichtigkeiten an Hand von vergleichbaren Kontakten ist aber,

wie oben erläutert, unzulässig. Absolut essentiell ist auch die Aminosäuretriade Asparagin 6 bis Isoleucin 8. Asparagin 6 ist in der räumlichen Position seiner Seitenkette nahezu identisch mit Asparagin 8 im h-pep Komplex (Abb. 40). Ähnlich wie bei h-pep kann es gegen Arginin ausgetauscht werden (interessanterweise ist für die Asparagin 8-Seitenkette im Komplex mit pepI.2 DATPEDLNAKL keine Elektronendichte vorhanden, obwohl es in der Substitutionsanalyse als essentiell ausgewiesen ist – ein weiteres Indiz dafür, daß Bindungswichtigkeit und strukturell definierter Kontakt nicht notwendigerweise korreliert sind). Leucin 7 macht in der Modellstruktur des u2-pep einen hydrophoben Kontakt zu Phe 94L; die gleiche Wechselwirkung kann mit Leucin 5 im Komplex von CB4-1 mit dem D-Peptid lkGpl beobachtet werden. Schließlich ist Isoleucin 8 im Modell des u2-pep Komplex in jener schmalen hydrophoben Tasche der schweren Kette begraben, in der sich auch das terminale Isoleucin in der u1-pep Kristallstruktur befindet. Für die anderen wichtigen Aminosäuren des u2-pep ergeben sich Kontakte, die zumindest nicht in Widerspruch zu den Bindungsdaten stehen. In dem Modell weist das Peptid eine kurze α -Helix im C-terminalen Bereich auf. Hier ist vielleicht die Ursache darin zu sehen, daß Leucin an Stelle von Asparagin 11 eine höhere Bindungsaffinität zu ergeben scheint (an Hand der Substitutionsanalyse). Eine stärkere hydrophobe Wechselwirkung mit Leucin 7 hätte denselben helixstabilisierenden Effekt wie für das h-pep diskutiert (siehe oben).

Eine Verifizierung des Modells ist letztlich nur durch physikalische Strukturanalyse möglich. Es fällt aber auf, daß sich in dem Modell sehr spezifische Kontakte aus anderen Peptidsequenzen wiederfinden, die sich hier gleichwohl in einem anderen Gesamtarrangement mit anderer sequentieller Positionierung darstellen (Abb. 40). Weiterhin ist bemerkenswert, daß sich trotz unterschiedlicher Sequenzen sehr ähnliche, gestreckte Gesamtkonformationen für das h-pep und das u2-pep ergeben mit einer nascenten Helix, die im u2-pep in einer kurzen terminalen Helix endet. Dies ist möglicherweise eine sterische Rahmenbedingung, innerhalb deren eine Sequenztoleranz verschieden Binder“familien“ mit verschiedenen Spezifitäten hervorbringen kann, denn auch für das kurze D-Peptid kann eine fast gleiche, wellenförmige Rückgratkonformation in identischer Positionierung beobachtet werden, obwohl hier die terminale Orientierung im Vergleich mit den anderen linearen Bindern umgekehrt ist.

Es gibt also starke Indizien, daß das Modell des u2-pep/CB4-1-Komplexes strukturell stimmig ist, wenn auch vielleicht nicht in allen detaillierten Kontakten. Die generelle Gesamtkonformation wurde auch in vier von fünf Simulationen konvergent identifiziert, wobei sich einzelne Wechselwirkungen durchaus unterschieden. Hier aber stellt sich wieder

die Frage, in welchem Maße die Bindung durch ein Ensemble von Konformationen vermittelt wird, zwischen denen es Übergänge geben kann. Diese Frage kann mit den angewandten Modellierungsmethoden nicht beantwortet werden.

4. 4 Modellierung von Antikörperkomplexen mit konformationell eingeschränkten Peptiden

Da die strukturelle Konvergenz von Docking-Experimenten mit linearen Peptiden größtenteils unbefriedigend war, wurden vergleichbare Simulationen mit cyclischen Peptiden durchgeführt. An Hand bekannter Komplex-Kristallstrukturen kleiner hetero- und homodetisch verbrückter Peptide, die an den Antikörper tAb2 binden, konnte gezeigt werden, daß in der Tat die Konvergenz der Rechnungen und damit die Wahrscheinlichkeit, die gesuchte Struktur korrekt zu identifizieren, sehr viel größer waren als bei den bisher untersuchten linearen Peptidepitopen. Da die gleiche Methode der Antikörper-Repräsentation, also die gleiche Art der Potentialerzeugung und -behandlung, bei den Experimenten durchgeführt wurde, ist also davon auszugehen, daß die geringe Konvergenz bei linearen Peptiden auf die Schwierigkeit zurückzuführen ist, den ungleich größeren Konformationsraum erschöpfend zu durchsuchen. Wenngleich die Gesamtkonformation bei den tAb2-bindenden cyclischen Peptiden in sehr guter Näherung detektiert werden konnte, ist dies bei einzelnen Seitenketten-Kontakten nicht immer möglich gewesen. So ist der in der Kristallstruktur von *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE beobachtete Kontakt von Glutamat 5 bei keiner gedockten Struktur ermittelt worden. Hier ist womöglich eine sterische Hinderung die Ursache, denn die lineare Variante bindet kaum an den Antikörper, während mit Aspartat an 5. Position, also mit einer Methylengruppe weniger, sowohl das lineare als auch das cyclische Peptid binden. Die Docking-Simulationen von *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNDEYE zeigen dann auch die erwartete räumliche Anordnung der Aspartat-Seitenkette.

Ausgehend von diesen Ergebnissen und in Ermangelung anderer polyspezifischer Testsysteme wurde die Modellierbarkeit von Komplexen konformationell eingeschränkter Peptide weiter an Konstrukten erprobt, die aus dem linearen u1-pep abgeleitet wurden. Grundlage war die Beobachtung, daß das u1-pep auch als lineares Peptid in einer gebogenen, quasi-cyclischen Konformation an CB4-1 bindet. Durch Ersatz einer nichtkovalenten Wasserstoffbindung, die diese Struktur stabilisiert, durch kovalente Lactam- bzw. Disulfidbindungen wurde zunächst ein Satz von cyclischen u1-pep Analoga entworfen und

diese Konstrukte, jeweils ausgehend von einer zufällig erzeugten Konformation, einer umfassenden Konformationssuche in Gegenwart des Antikörper-Potentials unterzogen.

Auch bei diesen konstruierten cyclischen Peptiden ist die strukturelle Konvergenz im Durchschnitt besser als bei den vergleichbaren linearen Epitopen. Von je fünf Simulationen konvergierten in der Regel zwei bis drei Rechnungen in einer Konformationsfamilie, die der Struktur des Templatpeptids sehr ähnlich war. Dennoch gibt es auch bei den cyclischen Peptiden eine große Bandbreite an energiegünstigen Konformationen, die zum Teil keine Ähnlichkeit mit der erwarteten Struktur aufwiesen. Hier ist allerdings die chemische Natur der Cyclisierung von großem Einfluß. Die Cyclisierungsbindung wurde bei den Modellierungsexperimente durch Distanz-Zwangsbedingungen emuliert, wobei dem Charakter der partiellen C-C-Doppelbindung bei einer Lactamverbrückung entsprechend größere Strafwerte bei einer Abweichung von der Idealgeometrie zugewiesen wurden als bei Disulfidverbrückungen, deren S-S-Einfachbindung als frei drehbar angesehen werden kann. Daher ist die Vielfalt an Rückgratkonformationen bei den Cystin-verknüpften Konstrukten ungleich größer und auch Verdrehungen des Peptidringes, was sich als größere Streuung der Planarität analysieren läßt. Auch der Einfluß von Abstandshaltern, die eingesetzt wurden, da sich die sterische Beanspruchung und damit die tatsächlich günstigste Ringgröße eines Konstrukts schwer abschätzen läßt, läßt sich hier erkennen. Obwohl erwartet wurde, daß bei einem oder zwei zusätzlich in die Sequenz gebrachten Prolinen eine Versteifung des Rückgrates eintritt (was sich in verminderter Variabilität der Ringplanarität äußern würde), ist dies nicht der Fall. Die Konstrukte mit Glycin in der Abstandshalterregion sind in der Regel in einem enger fokussierten Planaritätsbereich zu finden, während Prolin-haltige u1-pep-Analoga in mindestens zwei diskreten Bereichen zu finden sind. Es ist hier also eher ein Umschnapp-Mechanismus zu beobachten, bei dem das Peptidrückgrat durch sterische Hinderung des Prolins in eine andere Konformation übergeht. Desgleichen ist ersichtlich, daß Abstandsabschnitte, in denen Glycin vorkommt, zu einer Ringplanarität führen, die der idealen des u1-pep eher entsprechen. Glycin funktioniert durch seine große inhärente Flexibilität als ein „Scharnier“, das sterischen Streß, wie er durch die Einnahme wichtiger Kontakte im restlichen Peptid entsteht, leichter abbauen kann durch Einnahme auch ungewöhnlicher Dihedralwinkel.

Die konstruierten cyclischen Derivate des u1-pep binden mit vergleichbarer Affinität an den Antikörper CB4-1, wie die Bindungsstudien zeigen. Die aus den Modellierungen abgeleitete Vermutung, daß eine zusätzliche Rückgratversteifung, die hier versucht wurde, um die Simulationskonvergenz potentiell zu erhöhen, bei gleichzeitiger Cyclisierung kontraproduktiv

sein kann, ist auch aus den Substitutionsanalysen ersichtlich. Bei Prolinen, die in der Sequenz dem bindungswichtigen Leucin vorangehen, legt das Muster der Austausch in fast allen Fällen nahe, daß andere Aminosäuren an dieser Stelle begünstigt wären.

Da mit diesen Experimenten bewiesen wurde, daß globale stochastische Konformationssuche-Algorithmen eine höhere Konvergenz in struktureller Hinsicht aufweisen, wurde des weiteren ein bislang in seiner Komplexstruktur unbekanntes cyclisches Peptid untersucht, das an den anti-Choleratoxin Antikörper TE33 bindet. Mit Hilfe eines Strukturmodells sollte eine Aussage getroffen werden, ob echte Polyspezifität, d. h. die Verwendung unterschiedlicher Wechselwirkungen und Bindungsmodi, oder Kreuzreaktivität, d. h. die Ausnutzung vergleichbarer Kontakte bei versteckter Sequenzähnlichkeit, vorliegt.

4. 4. 1 Das Modell des Komplexes von TE33 mit dem *cycl1-pep*

cyclo(S γ_1 -S γ_{11})-CNQLFNTPPSC

Das aus einer *phage display* Bibliothek identifizierte *cycl1-pep* weist keinerlei Sequenzähnlichkeit mit dem linearen Wildtyp (wt)-Binder VPGSQHIDS aus dem Choleratoxin-Peptid 3 auf. Dennoch zeigen die – auch hier strukturell konvergenten – Simulationen eine große Ähnlichkeit der generellen Rückgratkonformation mit der des wt-Peptids. Die schleifenförmige Konformation wird in dem CPT3-Peptid insbesondere durch die Aufeinanderfolge von Prolin und Glycin gebildet, die zusammen einen scharfen doppelten Knick im Rückgrat ermöglichen. Beides sind auch unersetzliche Aminosäuren. In der räumlich sehr beengten hydrophoben Einbuchtung, in der die Rückgratome des Glycins sich in der Kristallstruktur des wt-Peptidkomplexes befinden, ist in der gedockten Struktur des *cycl1-pep* der Ring des Phenylalanins 5 in einer aromatischen Stacking-Interaktion mit Trp 50H zu sehen. Es ist hier also derselbe Effekt zu beobachten, der auch in den Komplexen von CB4-1 aufgefallen ist: Sterische Anforderungen erzwingen in einem Peptid die exklusive Anwesenheit von Glycin an einer bestimmten Position; dieselbe Raumeinheit kann aber in einem anderen Peptid mit einem anderen Aminosäuresatz durch eine Seitenkette eingenommen werden. Anders als bei den CB4-1 bindenden Peptiden ergibt sich durch diesen sterischen Effekt zwar keine gravierend andere Rückgratkonformation, aber die Unähnlichkeit der beiden TE33-Binder ist an dieser Stelle am größten: während das lineare Peptid mit seinem Rückgrat tief in der Bindungstasche begraben ist, verläuft es im *cycl1-pep* exponiert. Während Prolin 2 im wt-Peptid unter dem Imidazol-Ring von His 31L begraben ist und vermutlich aus entropischen Gründen der Turn-Bildung wichtig ist, wechselwirkt das an

vergleichbarer Position in der Bindungstasche sich befindende Glutamin 3 über Wasserstoffbrücken mit dem Histidin und dem Rückgrat des dritten CDR-Loops der leichten Kette – eine balancierte enthalpische Interaktion, die bereits beim Fehlen einer Methylengruppe (bei Substitution durch Asparagin) gestört wäre. Das einzig äquivalente Bindungsmerkmal im Vergleich von wt-Peptid und cyc1-pep ist die Wechselwirkung von Glutamin 5 bzw. Asparagin 6 in der Einbuchtung zwischen den CDR-Loops 1 und 2 der schweren Kette. Die generelle Richtigkeit des cyc1-Komplexmodells vorausgesetzt, wäre hier eine Kreuzreaktivität zu beobachten. In beiden Fällen kann die entsprechende Aminosäure nicht durch das kürzere bzw. längere Homolog ausgetauscht werden – das kann wiederum nur im Gesamtkontext der restlichen Peptidstruktur verstanden werden, denn eine räumlich begrenzte Perturbation wie das Fehlen oder Hinzutreten einer Methylengruppe könnte lokal sicherlich kompensiert werden. Aber kleine lokale Ausgleichbewegungen können einerseits an entfernteren Orten Störungen hervorrufen, die dem empfindlichen und austarierten Gesamtnetzwerk von Interaktionen abträglich sind; andererseits können sie, wie bereits erwähnt, die Stabilität des freien Moleküls verändern.

Besondere Erwähnung muß in diesem Zusammenhang auch die Rolle der beiden sukzessiven Proline im cyc1-pep finden. Von diesen beiden ist Prolin 9 besonders exklusiv, das vorhergehende Prolin erscheint etwas weniger spezifisch. Ein vergleichbares Muster aufeinanderfolgender Prolin-Residuen ist bekannt von kleinen, prolinhaltige Peptide bindenden Proteindomänen und wird dort als spezifische Wechselwirkung einerseits und als entropischer Faktor andererseits beschrieben, da eine im Mittel gestreckte Peptidkonformation unterstützt wird. Es ist denkbar, daß ein solches Verhalten auch im cyc1-pep die Wichtigkeit bestimmt, wiederum im Wechselspiel mit den anderen enthalpischen und entropischen Parametern der übrigen Sequenz. Wird nämlich ein identischer Sequenzabschnitt in das lineare wt-Peptid eingebaut, so bindet dieses auch; die Spezifität ist aber nicht vergleichbar mit der im cyc1-pep. Es kann eher ein Längeneffekt beobachtet werden, denn die Sequenz VPGSQHPP bindet zwar noch, die um ein Prolin verkürzte aber bereits nicht mehr. Während die Substitutionsanalyse des wt-Peptids nahelegt, daß Aspartat 8 unerlässlich für die Bindung der Sequenz VPGSQHIDS ist und dies sich auch durch eine Salzbrücke in der Kristallstruktur widerspiegelt, kann eine Bindung aber auch erfolgen, wenn sich C-terminal zwei Proline befinden. Die offensichtlich unterschiedliche Spezifität der Proline im cyc1-pep und in dem Prolin-derivatisierten wt-Peptid muß nicht bedeuten, daß sie sich nicht in beiden Peptidkomplexen in ähnlicher räumlicher Position befinden, da sich mehrere Effekte im Gesamtprozeß der Bindung überlagern können. Am Beispiel der CB4-1 bindenden Peptide

wurde ja schon gezeigt, daß relative Wichtigkeiten gleicher Aminosäuren bei gleicher absoluter Umgebung in Komplexen verschiedener Peptide nicht übereinstimmen müssen. Ein überraschendes Ergebnis ist, daß eine Cyclisierung für die Sequenz des *cycl1-pep* nicht bindungsbestimmend ist. Die ursprüngliche Substitutionsanalyse des *cycl1-pep* legte dies nahe. Es ist allerdings zu beachten, daß dort N- und C-terminal je zwei weitere Aminosäuren außerhalb des eigentlichen Cyclus sich befinden, die im Falle eines linearen Peptids eine Störung des erforderlichen Bindungsmodus bewirken könnten. Aus den Längenanalysen des linearisierten minimalen *cycl1-pep*, bei dem die Cysteine durch isosterische Serine ersetzt wurden, geht jedoch hervor, daß für die verkürzte Sequenz eine Cyclisierung nicht mehr unbedingt erforderlich ist. Daß sich durch Verkürzungen oder Verlängerungen Spezifitäten einzelner Positionen ändern können, ist auch aus den Substitutionsanalysen der cyclisierten wt-Peptidvarianten ersichtlich. Durch eine Cyclisierung kann, wenn auch mit Affinitätsverlust, der C-terminale Teil einschließlich des ansonsten wichtigen Aspartats, abgeschnitten werden. Bei der Disulfid-verbrückten Variante *cyclo(S_{γ1}-S_{γ8})CVPGSQHe* ist dadurch aber an Stelle von Valin 2 jetzt auch Prolin und Isoleucin toleriert, bei der homodetischen Variante *cyclo(N_α-C_{δ7})VPGSQHe* dagegen Isoleucin und Lysin, während es im eigentlichen wt-Peptid exklusiv ist. Gleiche Beobachtung können auch an dem linearisierten *cycl1-pep* gemacht werden: Threonin 7 und Prolin 8 zeigen andere Substitutionsmuster als das cyclische Peptid. Die Längenanalysen der linearisierten und der cyclischen Varianten von *cycl1-pep* beweisen aber, daß das lineare Minimalepitop in diesem Bereich des Sequenzraumes QLFNTPP heißt. Damit ist ein neues minimales Bindemotiv gefunden worden, das keine konformationelle Stabilisierung braucht und keine Ähnlichkeit mit dem wt-Peptid aufweist. Diese Tatsache und das Modell der Docking-Simulationen führen zur Annahme, daß es sich hier um einen Fall echter Polyspezifität handelt. Ob bei Kenntnis des linearen Minimalepitops eine Vorhersage seiner gebundenen Konformation hätte erreicht werden könnte, ist im Lichte der Ergebnisse des CB4-1 Antikörpers zweifelhaft. Die Strukturvorhersage der cyclischen Variante erlaubt aber eine Diskussion des Bindungsmodus des linearen Epitops.

4. 5 Polyspezifität und Kreuzreaktivität

Die begriffliche Trennung der Termini Polyspezifität und Kreuzreaktivität erfolgte in der Vergangenheit nicht immer sauber und auch andere Nennungen verwandter Phänomene sind anzutreffen, wie Multispezifität, Bindungspromiskuität usw. Während bei Polyspezifität von

unterschiedlichen Bindungsmodi nicht verwandter Epitope ausgegangen wird, bezeichnet Kreuzreaktivität eine versteckte molekulare Ähnlichkeit bei unterschiedlicher Sequenz, die aber dieselben Schlüsselaminosäuren nutzt bzw. Interaktionen, die aus den Schlüsselaminosäuren des Wildtyp-Binders abgeleitet sind. Der Bindungsmodus wird dabei oft mit der Gesamtkonformation in Verbindung gebracht, wobei man bei gleicher Rückgratstruktur auch gleichen Bindungsmodus annimmt. Das ist jedoch nicht zwangsläufig der Fall, wie in Abb. 39 zu sehen ist, wo die beiden linken Peptide (h-pep und pepI.5) eine völlig andere Oberflächenstruktur im Komplex aufweisen, obwohl ihre Rückgratkonformationen identisch sind. Andererseits ergibt die gedockte Struktur des u2-pep eine Oberflächenkomposition, die sehr ähnlich zu der des u1-pep ist. Dennoch sind die Gesamtkonformationen ihrer Rückgrate sehr unterschiedlich. Der Bindungsmodus muß also immer die Gesamtheit der atomaren Struktur berücksichtigen und ist eher mit der Struktur der kontaktierenden Flächen zu beschreiben; Bindung findet nicht auf der Ebene von ganzen Residuen statt. Obwohl h-pep und pepI.5 zu 55% sequenzidentisch sind und laut der Substitutionsanalysen dieselben Schlüsselaminosäuren nutzen, haben sie aber nicht dieselben Bindungsmodi (zumindest bei statischer Betrachtung der Kristallstrukturen); daher kann man eigentlich nicht von Kreuzreaktivität sprechen. Hingegen weist das Modell des u2-pep im CB4-1 Komplex strukturelle Merkmale auf, die aus anderen Komplexen bekannt sind (siehe Abb. 40). Die Oberflächenstruktur wird hier gebildet unter Verwendung einer Reihung von Seitenkettenkontakten, die einzeln auch in anderen Komplexen vorkommen und hier gleichsam superpositioniert sind: Asparagin 6 entspricht in seiner Position Asparagin 8 aus dem h-pep, Leucin 7 dem Leucin 5 aus d-pep, Isoleucin 8 dem C-terminalen Isoleucin aus u1-pep. Während hier also eine Art multipler Kreuzreaktivität vorliegt, reichen diese Kontakte allein aber nicht zur Bindung; andere wichtige Wechselwirkungen, wie etwa die von Lysin 3, sind aber nicht beobachtbar an anderen Peptidkomplexen, so daß man auch einen anderen Bindungsmodus und mithin polyspezifische Charakteristika hat.

Ähnliche Beobachtungen lassen sich für die TE33-bindenden Peptide machen. Während bei sehr ähnlicher Gesamtkonformation des linearen Wildtyp-Binders und der gedockten Struktur des cyclischen Peptids die meisten Seitenketten-Wechselwirkungen unterschiedlicher Natur sind, mithin der Antikörper polyspezifisch interagiert, ergibt sich für Glutamin 5 (wt-Peptid) bzw. Asparagin 6 (cyc1-pep) ein sehr ähnlicher Kontakt, der als kreuzreaktiv beschrieben werden kann.

Die Phänomene von Kreuzreaktivität und Polyspezifität sind also auf struktureller Ebene nicht klar trennbar. Die Oberflächenstruktur von monoklonalen Antikörpern weist eine typische,

fingerabdruckartige Zusammensetzung von Erhebungen und Einbuchtungen auf, die innerhalb gewisser Grenzen in Form und Größe veränderlich sind (Abb. 40). Die Wandungen dieser Mulden und Hügel sind von einer Vielzahl Atome mit unterschiedlichen Eigenschaften gesäumt, die der Oberfläche ambivalente Eigenschaften verleihen und nur sehr allgemein als „hydrophob“, „polar“ usw. charakterisiert werden können: sie lassen generell verschiedene Bindungsmodi zu. So ist in derselben hydrophoben Mulde von CB4-1 einmal Lysin (h-pep), Leucin (pepI.5) bzw. Isoleucin (u1-pep) zu finden; in einer anderen Vertiefung befindet sich einmal Asparagin (h-pep) oder Leucin (pepI.4, pepI.5). Erst die kooperative Wechselwirkung aller Aminosäuren bestimmt letztlich die Spezifität. Kleine Änderungen der Form der Bindungstasche und kleine Positionsänderungen der wechselwirkenden Aminosäuren durch sterische Anforderungen o. ä. können deren Spezifität erheblich ändern.

4. 6 Grenzen der Molekularmodellierung für die Komplex-Strukturvorhersage

Trotz großer Fortschritte bei der Molekularmodellierung in den letzten Jahren gibt es insbesondere bei der Simulation hochflexibler Systeme wie Peptide noch viele Unzulänglichkeiten und Hindernisse, die sich im allgemeinen aus Kompromissen zwischen Exaktheit und Anwendbarkeit ergeben. So sind die meisten der derzeit verwandten Kraftfeldmodelle noch mechanistischer Art; es gibt zwar Bemühungen zur Einbeziehung quantenmechanischer Aspekte, eine Anwendung auf flexible Entitäten ist aber derzeit kaum erreicht, geschweige denn bei einer Suche im gesamten Konformationsraum. Gleiches muß auch von der Behandlung der Lösungsumgebung gesagt werden. Die Anwesenheit expliziter Wassermoleküle ist zwar einerseits einer impliziten Behandlung vorzuziehen, da sie z. B. die wahre Größe der Wasserteilchen berücksichtigen lassen, die für Wasserstoffbrücke einer bestimmten Länge und Geometrie wichtig sein kann. Andererseits sind damit auch viele Probleme verbunden: die enorme Erhöhung der Freiheitsgrade, was in einem ohnehin schon hochflexiblen System zu ungenügendem Sampling führen kann, künstliche Grenzbedingungen durch Begrenzung von Interaktionsradien, verfälschte Wechselwirkungen durch Einfluß vereinfachter Polarisationsmodelle. Für globale Konformationssuchen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sind einzeln behandelte Wassermoleküle sicherlich ungeeignet. Es ist bisher auch noch nicht sicher etabliert, ob Wassermoleküle generell eine Rolle bei der molekularen Erkennung von Antigenen spielen oder ob sie überwiegend zur Erhöhung der Packungsdichte bei imperfekter Komplementarität dienen (Webster et al., 1994).

Das hier verwandte Modell eines distanzabhängigen Dielektrikums wurde entwickelt, um Abschirmungen von Ladungen durch Wassermoleküle zu mimikrieren. Dieses Modell ist natürlich nur eine ungefähre Näherung der realen Verhältnisse, aber es vermindert die Überbewertung lokaler Interaktionen, was sich z. B. in einer künstlich erhöhten Helicität widerspiegeln würde. Dem entgegen wirken aber auch zwei weitere Maßnahmen: die Belegung der Rückgratvariablen mit einem zusätzlichen Potential und die Verwendung eines Solvationsmodells, das auf der wasserzugänglichen Oberfläche individueller Atome beruht. Dieses begünstigt die Exponierung polarer Atome und wirkt damit einer starken helicalen Tendenz entgegen. Allerdings können auch hier keine Polarisierungseffekte berücksichtigt werden. Eine Anwendung der Poisson-Boltzmann-Gleichung in dem elektrostatischen Modell, was z. B. mit linearisierten Lösungsmethoden möglich ist, wäre deshalb wünschenswert und ist auch bereits für sehr große Systeme gezeigt worden (Baker et al., 2001); eine Parametrisierung für kleine Peptide ist aber nach wie vor unsicher und der gesamte Rechenaufwand für jede der Versuchskonformationen einer globalen Optimierung enorm. Nicht zuletzt steht die Frage offen, in wie weit selbst nach der Theorie hochakkurate Lösungsmittelmodelle den Verhältnisse in biologischen Systemen entsprechen. Eine hohe makromolekulare Konzentration (ca. 80 g/l im Blutplasma, 300-400 g/l im Zellinnern) lassen Volumenausschluß-Effekte überaus wichtig werden und fördern molekulare Aggregation und beeinflussen Reaktionskonstanten (Ellis, 2001); ob in einer solchen Umgebung herkömmliche Vorstellungen von physikalischen Eigenschaften freien Wassers noch gültig sind, kann zumindest bezweifelt werden.

Aus den genannten Gründen der Unsicherheiten elektrostatischer Modelle wurden für die vorgestellten Modellierungsversuche ausschließlich ungeladene Peptidtermini verwendet. Dies trägt auch dem Umstand Rechnung, daß die unterstützenden Bindungsstudien wie Substitutions- und Längenanalysen mit Peptiden durchgeführt wurden, die C-terminal an der festen Phase der Cellulosemembran immobilisiert waren. Die Fixierung erfolgt hierbei über β -Alanin-Residuen und es wurde abgeschätzt, daß ein Amid-Terminus bei den Peptidmodellen eine adäquate Annäherung an die Verhältnisse darstellt. Gleichfalls wurden die Peptide an den Membranen in der Regel acetyliert. Eine Modellierung mit geladenen Termini kann unvorhergesehene Endeffekte zur Folge haben und Seitenketten-Wechselwirkungen überlagern.

Ungenauigkeiten der gängigen Kraftfelder werden häufig durch die Anwendung weiterer Bewertungskriterien auf die erzeugten Konformationen bei Docking-Simulationen begegnet. Auf die Anwendung bzw. die eigene Entwicklung sog. Scoring-Methoden wurde allerdings

bei den vorgestellten Experimenten verzichtet. Einerseits besteht bei Antipeptid-Antikörpern kaum eine Korrelation zwischen der Kontaktfläche, der Anzahl der spezifischen Wechselwirkungen und der Affinität (Webster et al., 1994), wie sie an Protein-Protein-Komplexen oft beobachtet wurde. Dies wird zurückgeführt auf die Schwierigkeit, die entropische Komponente der freien Bindungsenergie bei flexiblen Bindungspartnern zu quantifizieren. Eigene Versuche, die in dieser Richtung unternommen, aber nicht vorgestellt wurden, bestätigen dies. Andererseits sollte es möglich sein, aus der durch Bindungsstudien eruierten relativen Wichtigkeiten der einzelnen Aminosäuren an ihren Positionen ein zusätzliches Bewertungsschema für die erzeugten Komplexstrukturen abzuleiten. Das würde aber bedeuten, daß sich die individuelle Wichtigkeit in einem eindeutigen Verhältnis zu strukturellen Kontakten befindet, was, wie gezeigt wurde, zumindest für lineare Peptide nicht der Fall ist. Bei cyclischen Peptiden ist dagegen die Wahrscheinlichkeit, daß eine essentielle Aminosäure eine hochspezifische Wechselwirkung eingeht und nicht zur Stabilisierung einer zur Bindung führenden Konformation wichtig ist (sofern sie nicht aus sterischen Gründen bevorzugt ist), sehr viel höher, da ja bereits a priori eine konformationelle Vorformung geschehen ist. Für die Gewinnung eines verlässlichen Bewertungsschemas ist aber die Datenmenge sowohl in Hinsicht von verlässlichen Strukturen als auch von Bindungsdaten entschieden zu gering.

Die verwandte Methode der globalen Optimierung gewährt zwar keinen Einblick in das dynamische Verhalten der beschriebenen Systeme. Dafür gibt sie aber eine gute Darstellung der gesamten Energielandschaft und kann daher ohne Beeinflussung der Startbedingungen angewandt werden. Die identifizierten energiegunstigsten Konformationen sind zwar im ersten Schritt durch die Näherungen, die ein Gitterpotential mit sich bringt, nur als Approximationen an das jeweilige lokale Minimum zu betrachten, wurden aber im zweiten Schritt durch die Behandlung im Vollatom-Modell verfeinert. Zusätzlich wurden für die besten Lösungen die Seitenketteninteraktionen in einer zweiten stochastischen Rechnung optimiert. Diese zweistufige Methode wurde gewählt, um ein möglichst vollständiges globales Sampling zu ermöglichen. Idealerweise müsste während der Konformationssuche des flexiblen Liganden auch die Bindungstasche des Antikörpers, zumindest in den Seitenketten, flexibel gehalten werden, also konformationell ebenfalls abgetastet werden. Dieses Vorgehen erschwert aber durch viele zusätzliche Freiheitsgrade die Konvergenz und wurde nach entsprechenden Versuchen als nicht praktikabel eingeschätzt. Darüber hinaus müsste im Fall flexibler Bindungstaschen-Seitenketten der Antikörper als Vollatom-Modell eingesetzt werden, wodurch sich für die Minimierungsschritte im Vergleich zu der

Behandlung im Gitterpotential-Modell die Rechenzeiten deutlich erhöhen. Auch ist die gleichzeitige Flexibilisierung von Ligand und hypervariabler Region problematisch für die Akzeptanz von potentiellen Strukturen. So kann eine neu erzeugte Seitenkettenkonformation der CDR-Residuen bei einer bestimmten Ligandenkonformation z. B. auf Grund eines van-der-Waals-Zusammenstoßes abgelehnt werden, während sie bei einer anderen, die eventuell der gesuchten entspricht, akzeptiert worden wäre. Demnach müßte nach jeder Neuerzeugung einer Ligandenkonformation alle Seitenkettenkonformationen der Bindungstasche optimiert werden, um ein verlässliches Bild der energetischen Verhältnisse zu erhalten. Das ist aber bei einer globalen Konformationssuche des Liganden, wie sie angestrebt wird, praktisch unmöglich. Die gewählte Methode, ein weiches, räumlich leicht aufgeweitetes Gitterpotential zu wählen, das während des globalen Ligandensampling statisch bleibt, stellt daher den besten Kompromiß zwischen Vollständigkeit der Konformationssuche und Genauigkeit dar. Eine lokale gegenseitige Konformationsadaption wurde dann in einem zweiten Schritt durch eine zweite Optimierung der Seitenketten sowohl des Liganden als auch der Bindungstasche erreicht, während die Rückgratkonformation unverändert blieb. Dieser Schritt wurde allerdings nur für die als beste eingeschätzte Konformation des ersten, globalen Suchschrittes durchgeführt.

4. 7 Einschränkung des Konformationsraumes durch Cyclisierung

Der Einfluß einer Konformationsstabilisierung durch Cyclisierung auf den Gesamtkonformationsraum ist für reale Peptide theoretisch schwer einschätzbar. Zum einen sind die Freiheitsgrade der Dihedralwinkel kontinuierlich, d. h. die einzelnen Zustände wären nur durch das willkürliche Anwenden eines Unterscheidungskriteriums voneinander zu trennen. Zum zweiten ist der Cyclisierungseinfluß sequentiell abhängig, denn jede Aminosäure bewirkt andere sterische Anforderungen, was sich ja auch in der statistisch beobachtbaren Bevorzugung einzelner Rotamerräume erkennen läßt. Lokale sterische Hinderungen wirken sich aber global für das Peptid aus, denn die Relaxation eines energetischen Streßpunktes wird über das ganze Peptid verteilt. Das bedingt aber auch, daß eventuell die Rotamerwahrscheinlichkeiten der Nachbaraminosäuren verzerrt werden. Hier ist natürlich auch die Ringgröße des Peptidcyclus entscheidend, ein größerer Ring hat mehr Möglichkeiten zu relaxieren. Zum dritten wirkt sich die Art der Cyclisierung und die Länge der Linkerregion auf die energetische Situation der einzelnen Zustände aus. Wie bereits ausgeführt, ist eine Lactamverbrückung durch den partiellen Doppelbindungscharakter der

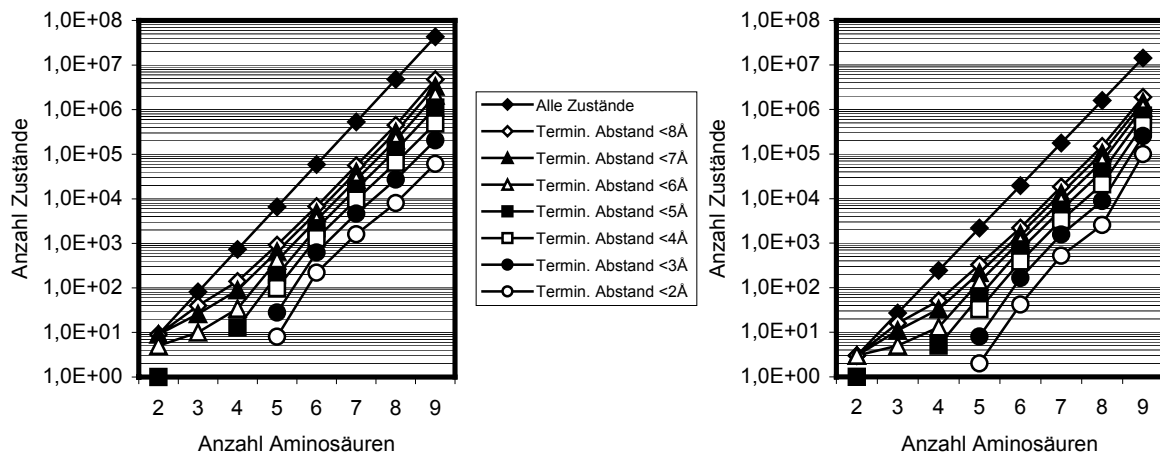


Abb. 41. Abschätzung der konformationellen Einschränkung durch Cyclisierung an vereinfachten Peptidmodellen. Links: Polyglycin mit 2 bis 9 Aminosäuren, rechts: Polyglycin mit 1 bis 8 Aminosäuren und je einem Prolin in der Sequenzmitte (bei ungerader Residuenzahl; bei gerader Zahl (>2) N-terminal um eine Position verschoben). Für jeden freien ϕ - und ψ -Winkel wurden drei diskrete Rotamerwerte erlaubt (0° , 120° , 240°) und systematisch alle möglichen Zustände erzeugt (ohne Energieminimierung!). Gezählt wurden dann die Zustände, bei denen der N-Terminus und der C-Terminus näher als 2 Å, 3 Å usw. zueinander waren, um die erlaubten Zustände verschiedener cyclisierter Analoga zu ermitteln. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert.

Pseudopeptidbindung sterisch anspruchsvoller als eine Disulfidverknüpfung, wo die S-S-Bindung frei rotierbar ist; eine *head-to-tail* Verbrückung ist im Vergleich mit einer Seitenkettencyclisierung rigider; die elektrostatische Wechselwirkung der Säureamidgruppe einer Laktamcyclisierungsstelle mit anderen polaren Funktionen des Peptids ist größer als bei einer Disulfidbrücke; usw.

Um aber dennoch eine Vorstellung vom Ausmaß der konformationellen Einschränkung bei der Cyclisierung eines Peptids zu gewinnen, wurde der Konformationsraum vereinfachter Peptidmodelle mit diskreten Rotamerzuständen modelliert (Abb. 41). Für Polyglycin-Sequenzen verschiedener Länge ohne bzw. mit einem Prolin in der Sequenzmitte wurden alle theoretisch denkbaren Zustände ohne Energieminimierung erzeugt, wobei jedem freien Rückgratwinkel drei Rotamerwerte erlaubt wurden. Von diesen Gesamtzuständen der linearen Peptide wurden dann diejenigen gezählt, wo die Termini sich in einem Bereich von bis zu 8 Å nahe kamen. Dieser Bereich entspricht den gängigen Linkerlängen (Pseudopeptidbindung: 1,325 Å, Cystinbrücke von $C\alpha$ bis $C\alpha$: $\sim 3,5\text{-}6$ Å, Laktambrücke mit Lysin/Aspartat von $C\alpha$ bis $C\alpha$: ~ 8 Å). Abgesehen von den kurzen Sequenzen, wo dieser Abstand notwendigerweise überrepräsentiert ist und der auch für Cyclisierungen irrelevant ist aus sterischen Gründen, ist der Anteil an verbrückbaren Zuständen maximal ca. 10-13 % aller theoretisch vorkommenden (im Bereich der untersuchten Längen bis 9 Residuen), d. h. der Konformationsraum würde bei diesen Modellpeptiden durch Cyclisierung zehnfach verkleinert werden. Wie zu erwarten,

schränkt sich durch die Einführung eines Prolins in das Modellpeptid der Gesamtkonformationsraum um das dreifache ein.

Dieses sehr vereinfachte Modell kann natürlich nicht ohne weiteres auf reale Peptide übertragen werden, denn weder waren Seitenketten präsent, noch wurden sterische oder energetische Hinderungen berücksichtigt und es wurden nur drei diskrete Zustände pro Freiheitsgrad angenommen. Es läßt sich aber abschätzen, daß qualitativ die Verhältnisse übertragbar sind, wobei die Relationen der Zustände für die cyclischen Modelle eher noch überschätzt sein dürften. Eine Cyclisierung, selbst durch lange, flexible Linkerregionen, führt also zu einer erheblichen Einschränkung des Konformationsraumes, was sich in der erhöhten Konvergenz von Simulationen cyclischer Peptide erkennen läßt.

4. 8 Wirkstoffentwicklung: Rationelles Design vs. empirische Entdeckung

Die Summe der diskutierten schwer einschätzbaren Faktoren und ihrer gegenseitigen Überlagerung bei der Bindung von Antigenen an Antikörper – Konformationsveränderungen, multiple Bindungsmodi etc. – macht es wohl auf absehbare Zeit unmöglich, immunorelevante Wirkstoffe wie Vaccine allein durch Molekulardesign vorherzusagen. Zumindest für Peptid-basierte Impfstoffe ist es auch auf Grund anderer Unwägbarkeiten wahrscheinlicher, durch empirische Versuche zum Erfolg zu gelangen (Van Regenmortel, 2000). Neben dem Umstand, daß Erkennungsregionen von Antikörpern unscharf sind („fuzzy recognition sites“) und Struktur-Funktions-Beziehungen nur schlecht definierbar sind, werden von van Regenmortel weitere Gründe genannt, die z. T. auch hier bereits erwähnt wurden: die schlechte chemische und Oberflächenkomplementarität von Antikörper-Antigen-Kontaktflächen; die Vielzahl von Paratopen in einem einzigen Immunoglobulin, die jeweils nur etwa ein Drittel der CDR-Residuen nutzen, was zu dem Effekt führen kann, daß ein Peptid ein anderes Paratop bindet als das kognate Protein; die Unmöglichkeit, aus Atomkoordinaten eine Bindungsenergie für Antikörper-Antigenwechselwirkungen zu berechnen; die Unmöglichkeit, alle relevanten Epitope, die in der Immunantwort auf ein Pathogen eine Rolle spielen, vorherzusagen und rationell zu optimieren; die nicht erreichbare Modellierung von Kooperativitätseffekten überlappender oder nichtüberlappender Epitope bei der Infektivitätsneutralisierung von Antikörpern; bisher nicht verstandene Mechanismen der Neutralisierung, die ja auch die Wirtszelle berücksichtigen muss, und des Schutzes vor Neutralisierung; Nichtadditivität individueller Mutationen; Unvorhersagbarkeit, ob ein Peptid einen neutralisierenden oder nicht neutralisierenden Antkörper hervorbringt; die

Unmöglichkeit, T-Zell- und cytotoxische T-Zellepitope, die für eine vollständige Immunantwort nötig sind, rationell in ein entsprechendes synthetisches Vaccin einzubauen; Schwierigkeiten, die biologische Verfügbarkeit vorherzusagen usw.

Diese Aufzählung macht deutlich, daß die vorliegende Arbeit kein Beitrag zum rationellen Design immunologisch relevanter Wirkstoffe sein kann. Selbst wenn es gelänge, die bindende Konformation eines Peptidepitops an einen Antikörper mit großer Sicherheit vorherzusagen, gibt es noch eine große Zahl von kaum zu prognostizierenden biologischen Faktoren in dem sehr komplexen immunologischen Regelwerk. Auch die hier berichtete höhere Wahrscheinlichkeit, ein konformationell eingeschränktes Epitop in seiner bindenden Struktur zu modellieren, ist kein beschreitbarer Weg zur Konstruktion von Wirkstoffen. Es gibt zwar Arbeiten, in denen konformationell rigide Peptide bei Experimenten zur Entwicklung von Impfstoffen gegen HIV-1 und Herpes Simplex-Virus eingesetzt wurden (Cabezas et al., 2000; Mezö et al., 2000); bei anderen Versuchen, durch Cyclisierung das molekulare Mimikry zwischen Protein und abgeleitetem Peptid zu erhöhen, beeinflusste die Konjugation des Peptids an das Cyclisierungsagens aber die Bildung neutralisierender Antikörper in unvorhergesehener Weise (Van der Werf et al., 1994). Bis heute ist von keinem der gebräuchlichen Impfstoffe der Aktionsmechanismus vollständig aufgeklärt (Van Regenmortel, 2000). Obwohl die Immunisierung mit Peptiden oft eine starke Antikörperbildung hervorruft, reicht dies für eine erfolgreiche Impfung allein nicht aus.

Die Molekularmodellierung von Antikörper-Peptid-Komplexen kann aber einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung von Protein-Protein-Wechselwirkungen im allgemeinen leisten. Zum einen ist die molekulare Variabilität von Antikörper-Bindungsstellen durch genetische Rekombination bei identischer Grundstruktur des gesamten Moleküls nahezu unbegrenzt. Humanes Blut enthält z. B. etwa 10^8 verschiedene Antikörpertypen, durch Affinitätsreifung können daraus stets hochaffinere Entitäten produziert werden. Auf der anderen Seite können kombinatorische Bibliotheken von Peptiden bei gleichzeitig leichter Synthetisierbarkeit sehr große Bereiche des Sequenzraumes abdecken. Diese doppelte Variabilität läßt es im Prinzip denkbar erscheinen, nahezu alle vorkommenden Wechselwirkungsmodi auf atomarer Ebene zu untersuchen. Die Detektion von Bindeereignissen in begleitenden Experimenten wird dabei durch eine potentiell hohe Affinität von Peptid-Antikörper-Wechselwirkungen erleichtert.

4. 9 Schlußfolgerungen

Die Bindung von Peptidantigenen an Antikörper geschieht durch ein komplexes Zusammenspiel entropischer, enthalpischer und sterischer Faktoren. Eine rein auf strukturelle

Ursachen basierende statische Beschreibung polyspezifischen Bindeverhaltens greift daher zu kurz. Viele für sich genommen schwache Effekte summieren sich im Verlauf eines Bindeereignisses dahingehend, daß ein für eine Assoziation optimales Ensemble atomarer Gruppen sich formiert. Diese Effekte sind voneinander abhängig und nur im Gesamtkontext der Aminosäurezusammensetzung, der Peptidlänge und gegenseitiger Konformationsanpassung zu sehen.

Ein Epitop kann nicht eindeutig sequentiell definiert werden. Vielmehr muß zumindest für Peptide als Bindungspartner davon ausgegangen werden, daß ein Epitop einen unscharf begrenzten Teilbereich des Sequenzraumes umfaßt, innerhalb dessen es eher ein Bindekontinuum als diskrete Zustände gibt. Für ein lineares Peptid gibt es ein Toleranzspektrum, das für eine minimal kritische Anzahl an essentiellen Kontakten eine Bindung durch lokale Konformationsänderungen und –kompensationen ermöglicht. Eine Vorhersage von Auswirkungen sequentieller Veränderungen auf das Bindeverhalten ist kaum möglich, da bereits kleine lokale Änderungen größere globale Wirkungen haben können. Zwischen getrennten Epitopbereichen kann es Überlappungen geben, wobei deutliche Konformationsänderungen der Peptidbinder auftreten können, aber nicht müssen. Die Gesamtkonformation eines gebundenen Peptids ist aber sekundär in dem Sinne, daß sie nur ein Gerüst für spezifische Seitenkettenarrangements bietet. Sie kann dennoch primär werden, wenn sterische und/oder entropische Faktoren dies erzwingen.

Es kann vermutet werden, daß echte Polyspezifität von Antikörperbindungen im Falle von Peptiden als Bindungspartner auf Grund der intrinsischen Flexibilität sehr viel häufiger auftritt als bei Proteinen. Ein notwendiges atomares Interaktionsensemble kann in Peptiden viel leichter erzeugt werden als bei Proteinabschnitten gleicher Sequenz, die sterisch und konformationell stark eingeschränkt sind. Die biologische Signifikanz mittels Peptidbibliotheken ermittelter Polyspezifitäten ist daher leicht zu überschätzen, zumal auch die Aminosäurekomposition an der Oberfläche von Proteinen nicht der Gesamtverteilung aller Aminosäuren entspricht.

Konformationell eingeschränkte Peptide entsprechen potentiell den vergleichbaren Sequenzabschnitten eines Proteins besser als lineare Peptide. Komplexstrukturen von cyclischen Peptiden sind darüber hinaus, wie gezeigt werden konnte, mit höherer Wahrscheinlichkeit vorherzusagen als die mit linearen Epitopeptiden. Da Bibliotheken mit cyclischen Peptiden leicht zu entwerfen und herzustellen sind und zudem die Bindungsaffinitäten potentiell höher sind als bei linearen Peptiden, können sie zur Ableitung von linearen Minimalepitopen und zur Strukturaufklärung durch Molekularmodellierung

verwendet werden. Auch kann eine Cyclisierung zur Bestimmung der gebundenen Gesamtkonformation eines linearen Peptids ohne Einbeziehung physikalisch oder theoretisch ermittelter struktureller Daten herangezogen werden: durch einfache Synthetisierung entsprechender cyclischer Analoga mit variabler Länge von Abstandsresiduen kann eine Aussage über die ungefähre Rückgratkonformation getroffen werden.