

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 lkGpl (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.

Wie aus Tab. 4 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Antikörper in verschiedenen Peptidkomplexen zum Teil merklich. Die Abweichung aller Peptidkomplexe von der nativen, nicht-ligierten Form beträgt für die Schweratome der 57 Aminosäuren, die die *complementary determining regions* (CDR's) bilden, durchschnittlich 1,09 Å. In Abb. 14 sind die Abweichungen nach den Aminosäuren der CDR's aufgeschlüsselt. Wie erwartet, findet man besonders häufig Aminosäuren mit großen Seitenketten unter denjenigen mit hoher Abweichung, insbesondere Lysin, Phenylalanin und Tyrosin. Besonders auffällig ist die durchgängig große Abweichung von Isoleucin 56 aus der CDR:L2 sowie von Lysin 63 aus der CDR:H2. Diese Residuen liegen aber am Rand der Bindungsregion und spielen, wie im folgenden zu sehen sein wird, keine Rolle bei den strukturellen Besonderheiten der verschiedenen Peptid-Bindungsmodi. Die im folgenden besprochenen Strukturen sind in Abb. 15 dargestellt; auf eine Beschreibung des ebenfalls abgebildeten Komplexes mit dem kurzen d-pep wird verzichtet, da dieses nicht dem Peptid-Transformationsweg angehört.

3. 4. 1 Komplex von CB4-1 mit GATPEDLNQKL (h-pep)

Das Peptid liegt in einer gestreckten Struktur in der Bindungstasche des Antikörpers, wobei der N-terminale Abschnitt von Glycin 1 bis Prolin 4 ein nahezu gerades Rückgrat und die C-terminale Peptidhälfte eine wellenförmige Konformation aufweist. Der N-Terminus ist dem CDR:L2-Loop benachbart, der C-Terminus der CDR:H2. Abb. 2 zeigt die Wichtigkeit der einzelnen Aminosäuren in ihrer jeweiligen Position für die Bindung. Alanin 2 kann gegen Glycin, Isoleucin und Prolin ausgetauscht werden, ohne daß es zu nennenswertem Verlust an Bindungsaffinität kommt, beim Ersatz gegen Valin wird die Bindung schwächer. In der Kristallstruktur ist ein hydrophober Kontakt von Alanin 2 zu erkennen, der an einer schmalen Stelle in der Bindungstasche zu Tyr 49L hergestellt wird. Obwohl Aspartat 5 nur gegen die andere saure Aminosäure, Glutamat, ausgetauscht werden kann und die Seitenkette in die Bindungstasche zeigt, ist eine strukturelle Ursache dafür nicht erkennbar. Eine basische Aminosäure – Arg 98H – ist zwar in der Nähe (4,6 Å zur Guanidinogruppe), aber noch enger benachbart ist das saure Asp 100H (3.6 Å zur Carboxyfunktion). Leucin 7 ist die „härteste“ Schlüssel-Aminosäure der Bindung, denn sie kann gegen keine, auch keine physikochemisch ähnliche Residue ausgetauscht werden, ohne daß es zum Verlust der Bindung käme. Wenngleich Leucin 7 mit Phe 32L eine ausgeprägt hydrophobe Interaktion eingeht, ist nicht ohne weiteres zu erklären, warum ein konservativer Austausch – beispielsweise gegen Phenylalanin oder Isoleucin – die Bindung verhindert, denn sterisch wäre eine größere

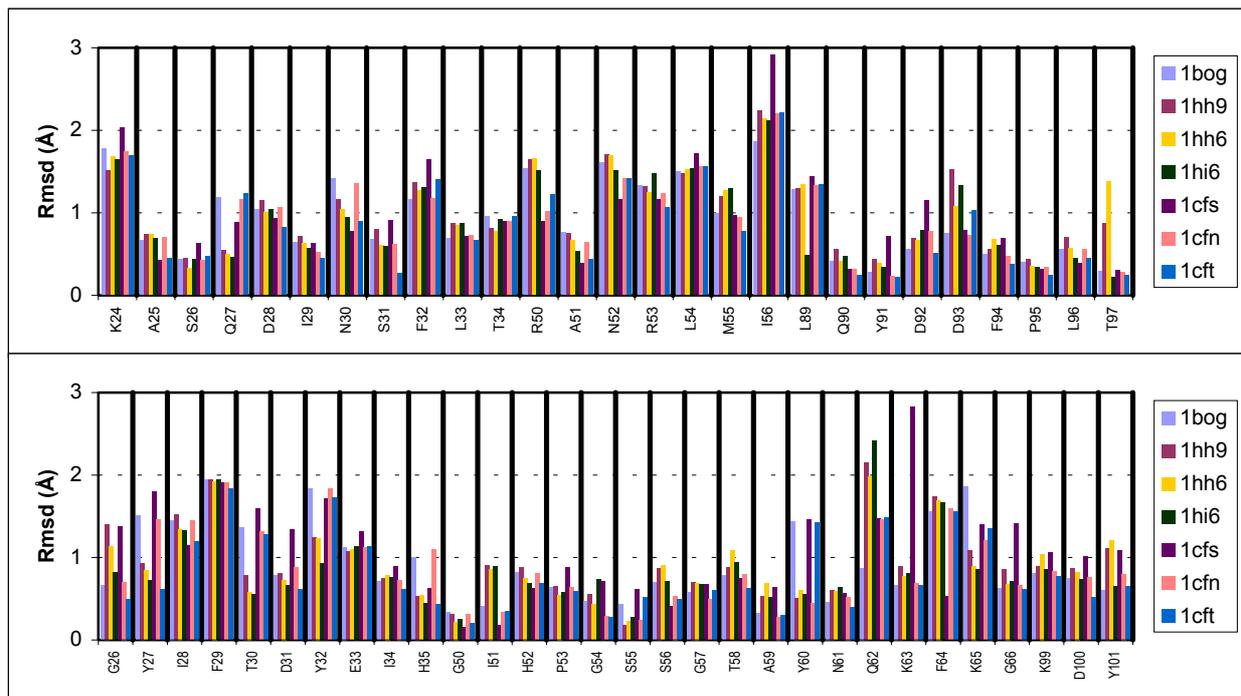


Abb. 14. Mittlere Abweichung (Rmsd) der Residuen in den CDR's der leichten Kette (oben) und der schweren Kette (unten) von CB4-1 in den verschiedenen Peptidkomplexen in Bezug auf die identischen Aminosäuren des unkomplexierten Antikörpers (PDB Code 1cft) nach optimaler Superposition der CDR's.

hydrophobe Seitenkette durchaus vertretbar. Asparagin 8, das nur durch basische Gruppen ersetzt werden kann, hat zwar keine ausgeprägten polaren Kontakte zum Antikörper, aber die Nähe der Glu 33H-Seitenkette sowie Carboxyl-Gruppen lassen diese Auswahl verständlich werden. Das in eine tiefe, schmale Einbuchtung zeigende Lysin 10 ist von teils hydrophoben, teils polaren Residuen des Antikörpers umgeben und kann am ehesten durch Leucin substituiert werden. Das sehr wichtige C-terminale Leucin 11 aber, dessen Austausch gegen Isoleucin schon zu starkem Absinken der Bindungsaffinität führt, zeigt nur einen äußerst schwachen Kontakt zu His 52H und weist überwiegend weg von der Bindungstasche in das Solvent. Die biochemisch demonstrierte Wichtigkeit des Leucin 11 für die Bindung ist aus der Kristallstruktur des Komplexes nicht nachvollziehbar.

Von den in der Struktur fixierten Wassermolekülen ist nur eines erkennbar, das eine Bindung zwischen Peptid und Antikörper vermittelt (es verbindet die Carbonylatome von Leucin 7 und Tyr 91L mit der ζ -Aminofunktion von Lys 99H). Den höchsten B-Faktor (Abb. 16) weist Glutamat 5 auf, das in die Umgebung zeigt.

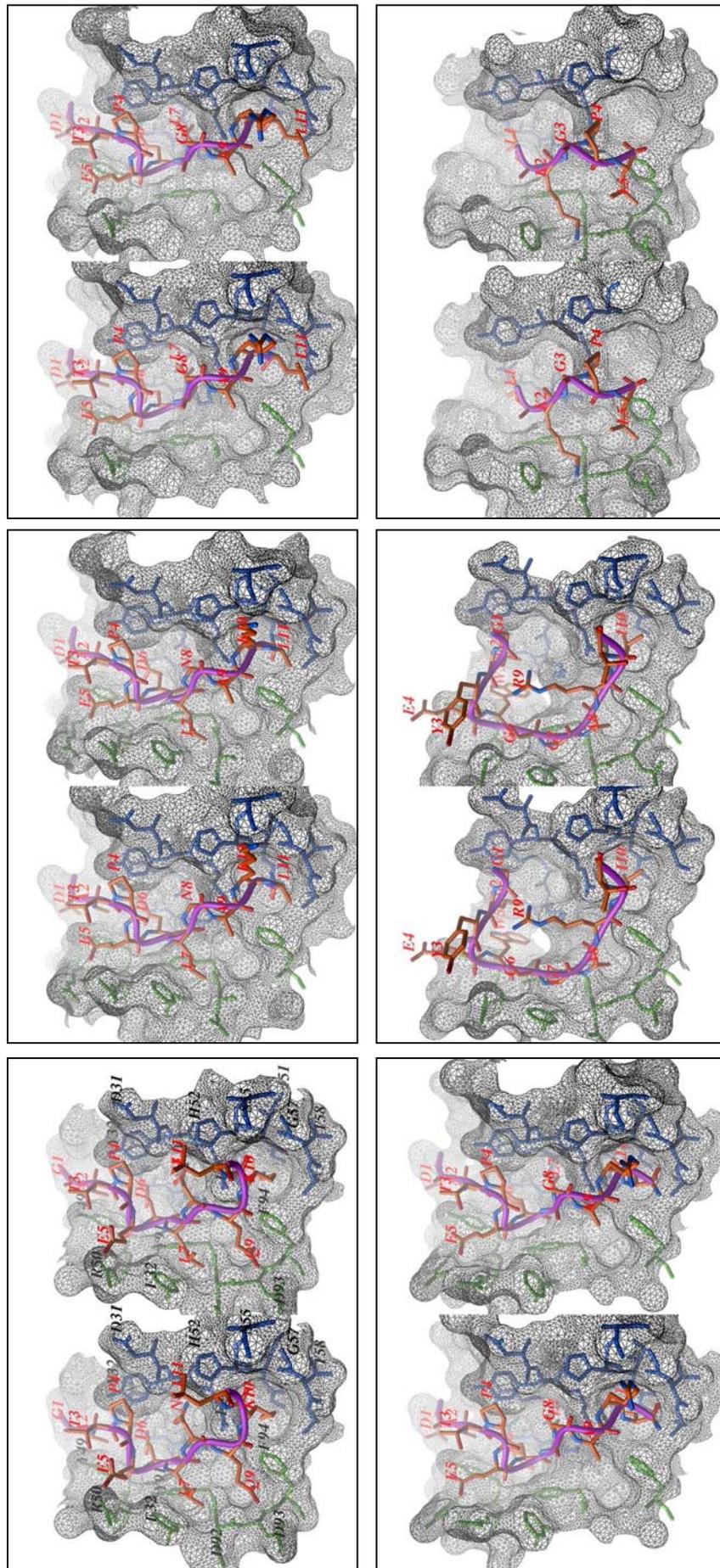


Abb. 15. Stereoabbildungen der Kristallstrukturen von CB4-1 Komplexen mit GATPELWLGARL (h-pep, oben links), DATPELWLGARL (pepl.2, oben mitte), DATPELWLGARL (pepl.4, oben rechts), DATPELWLGARL (pepl.5, unten links), GATPELWLGARL (u1-pep, unten mitte) und lkGpl (d-pep, unten rechts). Die Bindungstasche ist jeweils als schwarze Gitteroberfläche dargestellt, die in einer 4 Å-Umgebung sich befindenden Aminosäuren der leichten Kette erscheinen in grün, die der schweren Kette in blau. Das Peptid ist orange in blau. Das Peptid ist orange mit der Rückratsstruktur in magenta. Wassermoleküle sind nicht dargestellt.

3. 4. 2 Komplex von CB4-1 mit DATPEDLNAKL (pepI.2)

Die Kristallstruktur des durch zwei Substitutionen an den Positionen 1 und 9 aus dem h-pep entstandenen pepI.2 ist in seinem Komplex mit CB4-1 in weiten Teilen nahezu identisch. Wie die Substitutionsanalyse zeigt (Abb. 2), hat sich die Empfindlichkeit fast aller Aminosäuren gegenüber einem Austausch aber stark erhöht. Alanin 2, Prolin 4, Aspartat 6 und Asparagin 8 sind jetzt „harte“ Schlüsselreste, deren Austausch die Bindungsbefähigung des Peptids verhindern würde. An der Position von Alanin 9, wo im h-pep ein Glutamin zu finden war, sind jetzt dagegen mehr Austausche zulässig. Von der Seitenkette des Asparagin 8 fehlt die Elektronendichte in der Kristallstruktur, ebenso von C_γ und den C_δ-Atomen des terminalen Leucin 11. Der markanteste Unterschied zwischen den Komplexstrukturen des h-pep und des pepI.2 aber findet sich beim Arrangement der beiden C-terminalen Aminosäuren Lysin 10 und Leucin 11, deren Seitenkettenpositionen vertauscht erscheinen. Die lange Lysinseitenkette zeigt in das Lösungsmittel, während der C-Terminus in der kleinen Tasche zwischen den CDR:H1 und CDR:H2 lokalisiert ist, wo im h-pep die Lysin 10-Seitenkette positioniert war. Dennoch läßt die Substitutionsanalyse erkennen, daß Lysin 10 für die Bindung des pepI.2 noch wichtiger ist als im h-pep, da es sich jetzt nur noch gegen Arginin austauschen läßt. Ein Kontakt des Lysins mit dem Antikörper ist in der Kristallstruktur aber nicht erkennbar. Das äußerst wichtige Leucin 10 zeigt mit dem C_β-Atom zwar auf die Seitenkette von Phe 94L, aber das Fehlen weiterer Elektronendichte und die Lage am äußersten Rand der Bindungsmude läßt einen engen hydrophoben Kontakt unwahrscheinlich erscheinen. Lysin 10 und Leucin 11 haben von allen Peptidresiduen die höchsten B-Faktoren in der Kristallstruktur (Abb. 16). Eine Bindungsvermittlung über Wassermoleküle ist nicht zu erkennen.

3. 4. 3 Komplex von CB4-1 mit DATPEDLGARL (pepI.4)

Die Gesamtkonformation des zu zwei Dritteln zum h-pep sequenzidentischen pepI.4 in seinem Komplex mit dem Antikörper CB4-1 ist nahezu identisch zu den vorher beschriebenen. Auch die Substitutionsanalyse läßt kaum Unterschiede in der Spezifität der einzelnen Aminosäurepositionen erkennen, mit der Ausnahme von Glycin 8, wo jetzt auch Substitutionen mit Histidin, Lysin, Glutamin und Arginin erlaubt sind (diese sind allerdings auch schon schwach bei den vorherigen Substitutionsanalysen erkennbar). Die Seitenkette von Arginin 10 ist, wie schon das Lysin an derselben Position im pepI.2, vollständig

solvatisiert und hat keinen Kontakt zur Paratopregion. Nichtsdestotrotz bleibt es Schlüsselaminosäure (ein Austausch mit Serin oder Threonin ist zwar erlaubt, schwächt die Bindung aber deutlich). Die Elektronendichte der Leucin 11-Seitenkette ist hier vollständig und zeigt nur einen sehr schwachen Kontakt zu Phe 94L. Die bemerkenswerteste strukturelle Veränderung weist Leucin 7 auf. Die Substitutionsanalyse identifiziert es nach wie vor als essentielle Aminosäure, die Kontakte aber und die Geometrie sind sehr verschieden zu denen des Leucin 7 im h-pep-Komplex. Die Seitenkette ist um nahezu 180° (das Peptidrückgrat als Achse) gedreht und zeigt jetzt auf die schwere Kette des Antikörpers, etwa in die polare Gegend, die im h-pep Asparagin 8 kontaktiert hat. Das zeigt sich auch bei den ϕ - ψ -Winkelpaaren ($39^\circ/88^\circ$ beim h-pep; $-175^\circ/-104^\circ$ bei pepI.4).

Von den in der Struktur fixierten Wassermolekülen sind zwei mit Peptidbindungsatomen von Leucin 7 und Alanin 8 koordiniert. Die höchsten B-Faktoren sind wiederum bei den Seitenketten von Arginin 10 und Leucin 11 zu finden (Abb. 16).

3. 4. 4 Komplex von CB4-1 mit DATPEWLGARL (pepI.5)

Das Peptid, das den Tiefstwert an Bindungsaffinität entlang des Transformationsweges h-pep \leftrightarrow u1-pep markiert, weist eine noch nahezu identische Konformation im Vergleich zum pepI.4 auf (0,5 Å RMSD der Rückgratome). Obwohl die Seitenkette von Tryptophan 6 sehr viel größer ist als die des vorher an derselben Position sitzenden Aspartats, kommt es zu keiner merklichen Abweichung in Geometrie der Bindungstasche zwischen den Komplexstrukturen von pepI.4 und pepI.5 (das zeigt auch, daß Aspartat die Bindungstasche nicht optimal ausfüllt). Tryptophan 6 ist in hydrophober Interaktion mit Tyr 91L und Tyr 49L, dennoch hat es einen relativ hohen B-Faktor. Auch Leucin 11 weist einen hohen B-Faktor auf (Abb. 16), ist jetzt aber mit seiner Seitenkette tief in der nur schwach hydrophoben Tasche begraben, in der im h-pep-Komplex Lysin 10 zu sehen ist. Arginin 10 ragt weiterhin in das Lösungsmittel. Wie auch beim pepI.4 findet sich die Seitenkette von Leucin 7 im Kontakt mit der CDR:H2 der schweren Kette des Antikörpers. Aus der Substitutionsanalyse geht hervor, daß die N-terminalen Aminosäuren Alanin 2, Threonin 3 und Glutamat 5 noch empfindlicher gegenüber Austausch geworden sind. Letzteres kann jetzt nur noch von Aspartat und Tyrosin ersetzt werden.

Eine über lokalisiertes Wasser vermittelte Bindungsstelle findet sich wie bei pepI.4 beschrieben.

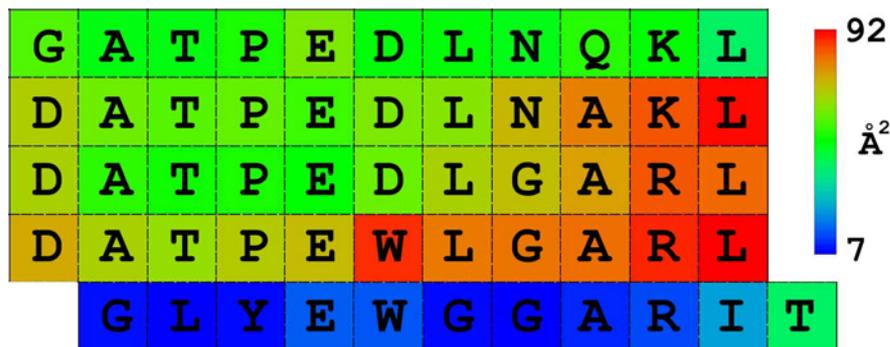


Abb. 16. B-Faktoren von CB4-1 bindenden Peptide in ihren Komplexen. Über die Beziehung $B=8\pi^2\langle u^2 \rangle$ steht der B-Faktor mit der maximalen Schwingungsunschärfe u in Zusammenhang. Ein Vergleich der B-Faktoren ist nur innerhalb eines Peptids möglich.

3. 4. 5 Komplex von CB4-1 mit GLYEWGGARIT (u1-pep)

Das Endpeptid der Transformation h-pep \leftrightarrow u1-pep liegt in einer Konformation in der Bindungstasche, die völlig verschieden von den bisher beschriebenen ist. Das Peptidrückgrat beschreibt einen weiten, C-förmigen Bogen. Der N-Terminus von Glycin 1 bis Glutamat 4, der C-Terminus von Alanin 9 bis Threonin 11 sowie der zentrale Teil des Peptids sind dabei jeweils gestreckt, wobei Tyrosin 3 einen β -Turn des Typs IV einleitet. Die Substitutionsanalyse zeigt Leucin 2 als wichtige Schlüsselaminosäure, in der Komplexstruktur liegt es in einer hydrophoben Sandwich-Struktur zwischen Tryptophan 5 und den langen Seitenketten von Lys 99H und Arg 98H. Tryptophan 5 nimmt im wesentlichen die beim pepI.5 beschriebene Position im Spalt zwischen leichter und schwerer Antikörperkette ein. Die darauf folgenden beiden Glycine zeigen eine schwache Wechselwirkung mit Phe 32L, ihre große Wichtigkeit für die Bindung wird aber darin bestehen, daß Seitenketten tragende Aminosäuren an ihrer Stelle durch sterische Anforderungen die gesamte Peptidkonformation stören würden; darüber hinaus weisen sie ϕ - ψ -Werte auf, die nur für Glycin erlaubt sind. Das Amidproton von Alanin 8 hat eine H-Brückenbindung zum Carbonylatom von Tyr 91L und eine schwache hydrophobe Wechselwirkung zu Phe 94L. Das relativ wichtige Arginin 9 läßt keinen Kontakt zum Antikörper erkennen, die Guanidinogruppe der gestreckten Seitenkette geht aber mit dem Glycin 1-Carbonylatom ein H-Brückenbindung ein und stabilisiert so die gesamte Peptidkonformation. Das absolut essentielle Isoleucin 10 schließlich ist in der kleinen Mulde der schweren Kette verankert, in der im h-pep das Lysin bzw. beim pepI.5 das endständige Leucin zu finden war. Es läßt sich aber nicht ohne Bindungsverlust gegen diese Aminosäuren austauschen. Das C-terminale, ins Lösungsmittel ragende Threonin ist für die Bindung unwichtig und kann ohne Affinitätsverlust abgeschnitten werden; ebenso kann das Peptid N-terminal verlängert werden, ohne daß sich das Substitutionsmuster ändert (Hoffmüller et al., 2000).

Der B-Faktor aller Aminosäuren des u1-pep (bis auf Threonin 11) ist sehr gering; für Isoleucin 10 beträgt er beispielsweise $23,35\text{\AA}^2$, was einer Schwingungsunschärfe von maximal $\pm 0,54\text{\AA}$ entspricht (Abb. 16).

Die zum Teil recht großen Abweichungen der Antikörperstruktur des u1-pep-Komplexes von denen der anderen Peptidkomplexe beschränken sich nicht auf die Seitenketten allein. Insgesamt haben die leichte und die schwere Kette einen größeren mittleren Abstand zueinander (mit einer mittleren Aufweitung der Bindungstasche im Vergleich zum h-pep-Komplex von $0,8\text{\AA}$). Die größten Veränderungen sind zwischen CDR:L2 und CDR:H1 zu beobachten, dort hat das Proteinrückgrat eine maximale Aufweitung von $3,2\text{\AA}$ zwischen leichter und schwerer Kette erfahren. Zwischen diesen beiden Paratop-Loops ist auch die Leucin 2-Tryptophan 5-Sandwichstruktur zu finden.

3. 5 Docking-Simulationen linearer Peptide mit stochastischer globaler Optimierung

3. 5. 1 Docking linearer Peptide aus dem Transformationsweg h-pep \leftrightarrow u1-pep

Mit den Peptiden h-pep, pepI.4, pepI.5 und u1-pep aus dem Transformationsweg h-pep \leftrightarrow u1-pep wurden in Gegenwart des Antikörpers lange stochastische Optimierungsrechnungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die dabei identifizierten globalen Minima den Konformationen der jeweiligen Peptide in ihren Kristallstrukturen entsprechen. Der Antikörper war dabei nicht als Atom-Modell zugegen, sondern wurde durch einen Satz von auf ein Raumgitter mit $0,5\text{\AA}$ Weite projizierten Energiepotentialen repräsentiert (siehe Material und Methoden). Diese Methode erlaubt es, die globale Optimierung erheblich zu beschleunigen und in einem vertretbaren Zeitrahmen zu halten. Für jedes der Peptide wurden fünf unabhängige, jeweils von Zufallskonformationen ausgehende Simulationen durchgeführt, bei denen eine maximale Anzahl von 10^8 Funktionsaufrufen erlaubt wurde. Da bei diesen Experimenten im Gegensatz zu den Peptidfaltungs-Untersuchungen die relative Orientierung des Peptids zum Antikörper (bzw. dessen Potentialen) wichtig ist, wurden sechs Freiheitsgrade der Translation und Rotation bei den Variablen für das Sampling und die Minimierung einbezogen.

3. 5. 1. 1 Docking-Simulationen von h-pep an CB4-1

Wie aus Tab. 5 zu entnehmen ist, sind die Konformationssuchen von h-pep in Gegenwart des Antikörpers zwar in energetischer Hinsicht relativ konvergent, aber strukturell gesehen unterscheiden sich die Tiefstenergie-Strukturen erheblich von der Konformation des h-pep in der Kristallstruktur des Komplexes. Die großen Abweichungen der energietiefsten Konformation sind darin begründet, daß die Orientierung des Peptids in der Bindungstasche teilweise invertiert war bzw. das Peptid am Rand der Bindungstasche lag (die relativ gleich großen Abweichungen bedeuten nicht, daß die Tiefstenergie-Strukturen sich untereinander ähneln, siehe Abb. 17).

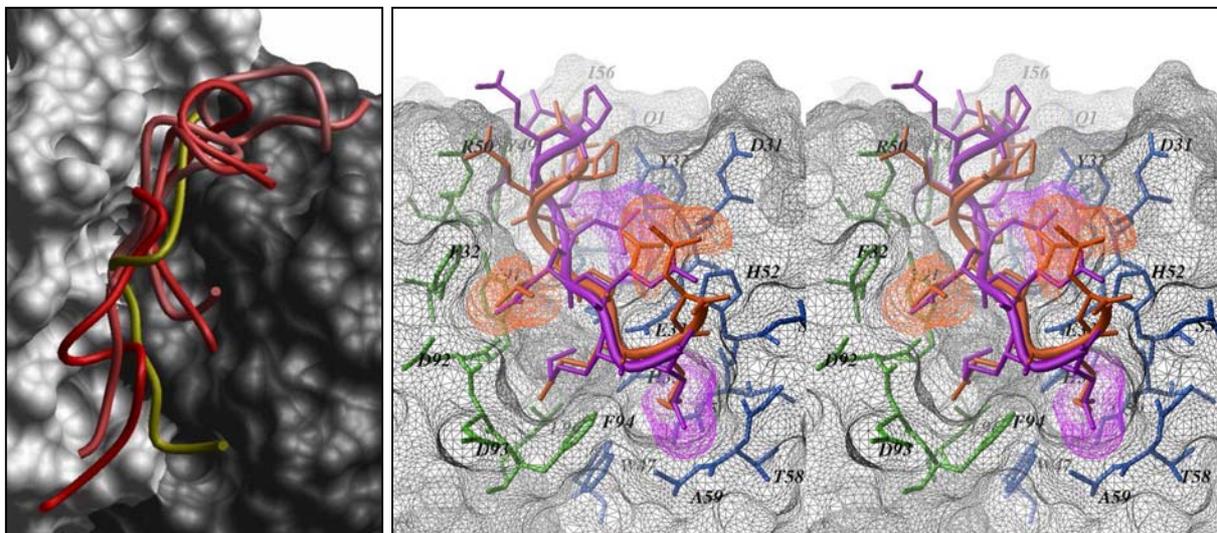


Abb. 17 (links). Rückgratstrukturen der Tiefstenergiestrukturen aus den Docking-Simulationen von h-pep GATPEDLNQKL an CB4-1 (abgestuft rot) im Vergleich zur Kristallstruktur (gelb). Die leichte Kette des Antikörpers erscheint weiß, die schwere Kette grau.

Abb. 18 (rechts). Stereobild der ähnlichsten Struktur aus den Docking-Simulationen des h-pep an CB4-1 (magenta) im Vergleich zur Kristallstruktur (orange). Bei nahezu identischen Rückgratkonformationen sind die Aminosäuren sequentiell um eins verschoben. Die bindungswichtigen Leucine 7 und 11 sind als Conolly-Oberflächen in den jeweiligen Farben dargestellt, die Antikörperoberfläche ist schwarz, die Residuen der leichten Kette (grün) und schweren Kette (blau) sind beschriftet. Weitere Erklärungen siehe Text.

Unter den energietiefen Strukturen gab es jedoch in jedem Fall solche, die eine relativ geringe Abweichung der Rückgrat-Konformation, besonders im C-terminalen Teil aufwiesen (Abb. 18). Die Gesamtabweichung aller Schweratome aber ist auch bei diesen Konformationen relativ hoch. Eine genauere Untersuchung des C-terminalen Teils zeigt, daß die gedockten Strukturen im Vergleich zum h-pep in der Kristallstruktur sequentiell um eine Aminosäure verschoben sind. Bei nahezu gleicher Rückgratkonformation in der C-terminalen Peptidhälfte (0,38 Å Abweichung) ergibt es sich daher, daß die Seitenketten in der gedockten Struktur nahezu dieselbe Position einnehmen, wie die der sequentiellen Vorgänger in der h-pep-

	Rückgrat-Rmsd der energietiefsten Konformation (Å)	Simulationsenergie der energietiefsten Konf. (kcal/mol)	Rückgrat-Rmsd der ähnlichsten Konformation (Å)	Rang der ähnlichsten Konformation	Akzeptanzrate
Simulation 1	13,1	-378,3	3,3	8	0,43
Simulation 2	13,4	-375,4	3,6	46	0,44
Simulation 3	13,4	-372,2	3,2	23	0,43
Simulation 4	13,6	-377,4	3,3	62	0,44
Simulation 5	11,3	-374,2	5,0	40	0,42

Tab. 5. Ergebnisse mehrerer unabhängiger, von Zufallskonformationen ausgehender Docking-Simulationen des h-pep an CB4-1.

Kristallstruktur. Dies ist insofern interessant, als daß sich Seitenkettenarrangements ergeben, wie sie aus den oben beschriebenen Komplex-Kristallstrukturen von pepI.4 und pepI.5 bekannt sind. So ist die aliphatische Kette des für die Bindung essentiellen Leucin 7 sehr ähnlich positioniert wie die in der pepI.4- bzw. pepI.5-Struktur und ist in Kontakt mit der schweren Kette des Antikörpers. Das endständige, ebenfalls sehr wichtige Leucin 11, befindet sich in der gedockten Struktur des h-pep in derselben Tasche zwischen CDR:H1 und CDR:H2, in der das äquivalente Leucin in der Struktur von pepI.5 zu finden ist.

Unter den energietiefen Strukturen sind viele mit α -helicalen Strukturelementen. Dabei erstrecken sich die helicalen Bereiche überwiegend von Prolin 4 bis Lysin 10 mit einem Verteilungmaximum bei Leucin 7, das in bis zu 40% der jeweils hundert besten Konformationen einer Simulation helicale Rückgratwinkel aufweist. Die statistisch gewichtete Gesamthelicität der Simulationen betrug ca. 4% (298 K).

3. 5. 1. 2 Docking-Simulationen von pepI.4/pepI.5 an CB4-1

Das Docking der beiden Transformationspeptide, deren Bindekonformationen in den Kristallstrukturen der CB4-1 Komplexe nahezu identisch zu der des h-pep sind, ergab ähnlich nicht-konvergente, weitgestreute Strukturen, die größtenteils unähnlich zu der des h-pep sind (Tab. 6 und 7). Allerdings ist die terminale Ausrichtung bei diesen beiden Peptiden in fast allen Niedrigenergiestrukturen korrekt. Bei pepI.4 sind von allen Konformationen in dem Niedrigenergie-Stapel 8 Strukturen mit einem Rückgrat-RMSD von weniger als 3 Å. Die ähnlichste Struktur hat auch nahezu identische Kontakte der Seitenketten, besonders auffällig ist, daß der Kontakt der essentiellen Leucin 7 und 11 richtig wiedergefunden wurde. Diese Struktur wurde auf den Rang 10 der Simulation plaziert, da die bestplazierte niedrigere intrapeptidische van-der-Waals-Energie aufwies. Eine Helicität war während der Trajektorie nicht mehr erkennbar.

	Rückgrat-RMSD der energietiefsten Konformation (Å)	Simulationsenergie der energietiefsten Konf. (kcal/mol)	Rückgrat-RMSD der ähnlichsten Konformation (Å)	Rang der ähnlichsten Konformation	Akzeptanzrate
Simulation 1	4,78	-377,45	4,71	88	0,43
Simulation 2	6,87	-376,88	3,53	79	0,43
Simulation 3	4,48	-379,51	2,38	10	0,44
Simulation 4	5,74	-379,56	2,76	33	0,42
Simulation 5	5,7	-373,11	3,61	68	0,42

Tab. 6. Ergebnisse der fünf unabhängiger, von Zufallskonformationen ausgehender Docking-Simulationen von pepI.4 an CB4-1.

	Rückgrat-RMSD der energietiefsten Konformation (Å)	Simulationsenergie der energietiefsten Konf. (kcal/mol)	Rückgrat-RMSD der ähnlichsten Konformation (Å)	Rang der ähnlichsten Konformation	Akzeptanzrate
Simulation 1	10,91	-399,72	4,78	92	0,42
Simulation 2	4,3	-410,61	3,77	67	0,41
Simulation 3	5,39	-401,46	3,46	6	0,42
Simulation 4	5,83	-399,14	4,5	19	0,41
Simulation 5	4,85	-401,49	4,03	11	0,40

Tab. 7. Ergebnisse mehrerer unabhängiger, von Zufallskonformationen ausgehender Docking-Simulationen von pepI.5 an CB4-1.

Die Streuung der strukturellen Parameter war im Falle des pepI.5-Docking noch größer als beim pepI.4, auch kann man hier nicht von energetischer Konvergenz reden, da sich die Tiefstenergiestrukturen bei verschiedenen Simulationen um bis zu 11 kcal/mol unterscheiden. Auch hier waren aber die Peptide in der korrekten Richtungspositionierung der Termini und meist in gestreckten Konformationen. Den größten Beitrag der strukturellen Streuung lieferten dabei die Aminosäuren des C-terminalen Abschnitts, während die N-terminale Hälfte in sehr vielen Fällen in zueinander ähnlicher Konformation, aber verschieden von der des pepI.5 in der Kristallstruktur waren. Die relative Lage des Tryptophan-Indolringes, wie sie in der Kristallstruktur des pepI.5 vorkommt, konnte in keiner Struktur identifiziert werden.

3. 5. 1. 3 Docking-Simulationen von ul-pep an CB4-1

Die Konvergenz der fünf durchgeführten Docking-Simulationen ist in energetischer Hinsicht etwas schlechter als für die des h-pep, auch in struktureller Hinsicht ergibt sich kein konvergentes Bild (Tab. 8, Abb. 19 und 20). Wie auch beim h-pep ergaben die Kontrollrechnungen, die je von einer anderen Zufallskonformation ausgingen, eine große Bandbreite an Niedrigenergie-Konformationen, darunter auch solche mit richtungsinvertierten Termini. Die mittlere Abweichung von der Kristallstruktur im Komplex ist bei allen Simulationen im N-terminalen Teil des Peptides kleiner als bei der C-terminalen Hälfte. In vielen Fällen ist der Abschnitt des Peptids von Glycin 6 bis Isoleucin 10 in einer der Kristallstruktur sehr ähnlichen Konformation (mit einer Abweichung von minimal 0,8 Å bei

den Rückgratatomen), besonders das Isoleucin findet sich in überdurchschnittlich vielen Konformationen (8-18%) der Niedrigenergie-Stapel in der engen Bindungstasche, die oben bereits beschrieben wurde. Im N-terminalen Abschnitt des Peptids dagegen finden sich teilweise große Abweichungen von der Zielstruktur. Es kann beobachtet werden, daß die Seitenketten von Leucin 2, Tyrosin 3 und Tryptophan 5 um einen engen hydrophoben Kontakt in der Bindungsspalte zwischen der leichten und der schweren Kette des Antikörpers

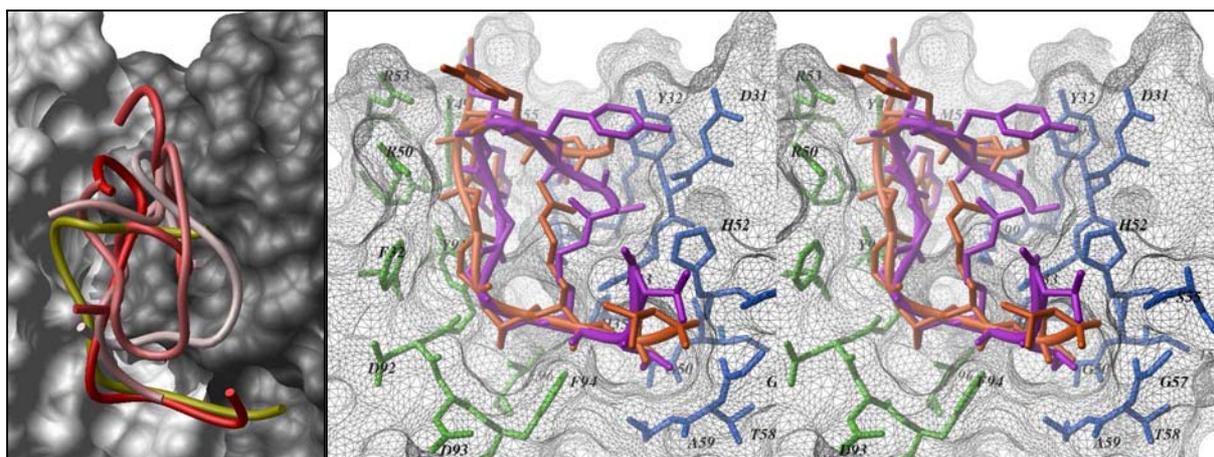


Abb. 19 (links). Rückgratstrukturen der Tiefstenergiestrukturen aus den Docking-Simulationen von u1-pep GLYEWGGARIT an CB4-1 (abgestuft rot) im Vergleich zur Kristallstruktur (gelb). Die leichte Kette des Antikörpers erscheint weiß, die schwere Kette grau.

Abb. 20 (rechts). Stereobild der ähnlichsten Struktur aus den Docking-Simulationen des u1-pep an CB4-1 (magenta) im Vergleich zur Kristallstruktur (orange). Die Antikörperoberfläche ist schwarz, die Residuen der leichten Kette (grün) und schweren Kette (blau) sind beschriftet.

konkurrieren. Die beschriebene „Sandwich“-Struktur des Leucin 2 zwischen dem aromatischen System von Tryptophan 5 und der schweren Kette des Antikörpers findet sich nur bei wenigen Strukturen des Konformationsstapels, darunter sind aber überwiegend solche, deren C-terminales Arrangement nicht mit der Kristallstruktur übereinstimmt. Die Seitenkette des Tryptophans 5 findet sich nur in maximal 8% aller Niedrigenergie-Konformationen eines Stapels in einer 2 Å-Toleranz von der Zielstruktur.

	Rückgrat-RMSD der energetiefsten Konformation (Å)	Simulationsenergie der energetiefsten Konf. (kcal/mol)	Rückgrat-RMSD der ähnlichsten Konformation (Å)	Rang der ähnlichsten Konformation	Akzeptanzrate
Simulation 1	3,5	-391,0	1,9	22	0,43
Simulation 2	11,3	-386,9	3,6	9	0,43
Simulation 3	9,3	-387,2	3,0	3	0,43
Simulation 4	10,7	-387,8	3,2	56	0,43
Simulation 5	7,4	-383,9	2,8	43	0,44

Tab. 8. Ergebnisse mehrerer unabhängiger, von Zufallskonformationen ausgehender Docking-Simulationen von u1-pep an CB4-1

3. 5. 2 Docking linearer Peptide aus dem Transformationsweg $h\text{-pep} \leftrightarrow u2\text{-pep}$

3. 5. 2. 1 Docking-Simulationen von $u2\text{-pep}$ an CB4-1

Da von diesem Komplex eine Kristallstruktur bisher nicht bekannt ist, wurde die Struktur des nativen Antikörpers für die Dockingsimulationen verwendet, wobei vor dem eigentlichen Docking eine Relaxation der Bindungstaschen-Seitenketten durch eine kurze Monte-Carlo-Rechnung stattfand. Vier von fünf Simulationen konvergierten bei dem Docking des $u2\text{-pep}$ in einer strukturell zueinander sehr ähnlichen konformationellen Familie (siehe Abb. 21), obwohl die energetische Konvergenz nicht sehr gut war (495,1/-493,6/-502,3/-500,1 kcal/mol). Bei diesen Strukturen liegt das Peptid in einer gestreckten, wellenförmigen Gesamtkonformation in der Bindungstasche zwischen den CDR's des Antikörpers (Abb. 22) mit der terminalen Orientierung, die auch das $h\text{-pep}$ in seiner Komplexstruktur zeigt, obwohl die zufälligen Ausgangskonformationen der Simulationen teilweise in der terminalen Ausrichtung umgekehrt waren. Wie die Substitutionsanalyse des Peptids zeigt (Abb. 2), gibt es sechs Schlüsselaminosäuren, die höchstens gegen eine andere Residue ohne Bindungsaffinitätsverlust ausgetauscht werden können: Lysin 3 und Glutamat 4 (nicht ersetzbar), Asparagin 6 (durch Arginin austauschbar), Leucin 7 und Isoleucin 8 (nicht substituierbar), und Asparagin 11 (gut durch Leucin ersetzbar). Die Strukturen der konvergenten Konformationsfamilie genügen in den Kontakten der einzelnen Aminosäuren größtenteils dem Substituierbarkeitsmuster (Tab. 9).

Die Konformation des $u2\text{-pep}$ -Rückgrates zeigt in dieser Familie eine erkennbare Ähnlichkeit zu der des $h\text{-pep}$ in dessen Komplexstruktur. Der N-Terminus ist allerdings zur Bindungsspalte hin gebogen, da die Seitenkette des Phenylalanin 1 in allen Strukturen der Familie zwischen der leichten und der schweren Kette des Antikörpers begraben liegt (Abb. 22). Lysin 3 leitet einen Turn in dem Peptidrückgrat ein, der bei Übereinanderlagerung der gedockten Struktur mit der $h\text{-pep}$ -Kristallstruktur genau dem Turn entspricht, der beim $h\text{-pep}$ von Prolin 4 initiiert wird. Die Seitenkette des Lysin 3 weist mit der $N\zeta$ -Aminogruppe auf einen polar-sauren Abschnitt an der Grenze zwischen den CDR:H1 und CDR:H2 der schweren Antikörperkette. Dabei wird ein polarer Kontakt zu Asp 31H hergestellt. Das sequentiell folgende Glutamat 4, das nicht gegen das kürzere Aspartat ausgetauscht werden kann, ist in Seitenkettenkontakt zur basischen Residue Arg 50L aus dem CDR:L2-Loop. Damit ergibt sich ein vergleichbarer Kontakt, wie es die Seitenketten von Glutamat 5 im $h\text{-pep}$, pepI.2, pepI.4 und pepI.5 in den jeweiligen Kristallstrukturen der Komplexe aufweisen.

Zumindest bei dem letztgenannten Komplex ist das Glutamat auch ein Schlüsselrest, der gleichwohl von Aspartat besetzt werden kann.

Für die beiden folgenden Aminosäuren im u2-pep, Tryptophan 5 und Asparagin 6, letzteres Schlüsselresidue, ergeben sich zwei deutlich unterscheidbare konformationelle Subfamilien, die beide aber die gleiche generelle Rückgratstruktur ermöglichen. In der ersten liegt das Ringsystem des Tryptophans in dem Bindungsspalt des Antikörpers begraben, etwa in der räumlichen Position des Tryptophans aus der Komplexstruktur des u1-pep. Dadurch ist die Asparagin 6-Seitenkette für das Lösungsmittel exponiert. Diese Konstellation ist auf Grund

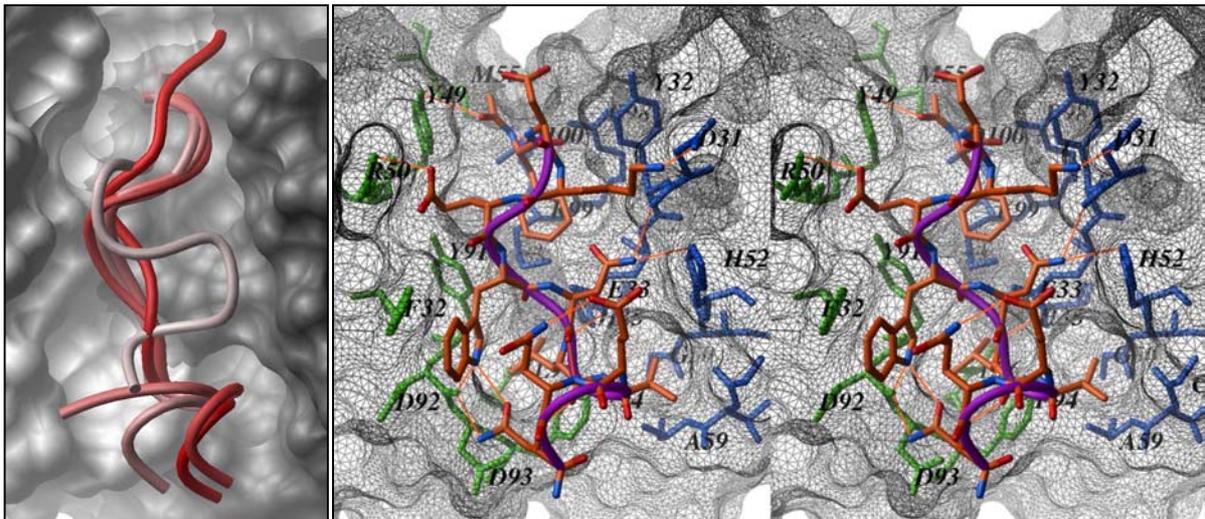


Abb. 21 (links). Rückgratstrukturen der Tiefstenergiestrukturen aus den Docking-Simulationen des u2-pep FDKEWNLIEQN an den Antikörper CB4-1. Die leichte Kette erscheint als weiße, die schwere Kette als graue Connolly-Oberfläche. Vier der Simulationen waren strukturell konvergent.

Abb. 22 (rechts). Stereobild des Modells der Bindekonformation von u2-pep im Komplex mit dem Antikörper CB4-1. Das Peptid erscheint orange mit der Rückgratstruktur in magenta, der N-Terminus ist oben, der C-Terminus unten. Zwischen Leucin 7 und Glutamin 10 ist eine α -Helix ausgebildet. Die umgebenden Residuen der leichten Kette sind in grün, der schweren Kette in blau. H-Brückenbindungen innerhalb des Peptids und zwischen Peptid und Antikörper sind als orange Striche dargestellt. Das Modell wurde durch Verfeinerung aus dem Gitterpotential-Docking erzeugt, indem die optimalen Konformationen der Seitenketten des Peptids und der Bindungstasche gesucht wurden.

der Substitutionsanalyse nicht wahrscheinlich. Einerseits ist im Gegensatz zum u1-pep das Tryptophan im u2-pep durch eine Reihe von hydrophoben und polaren Aminosäuren austauschbar. Andererseits ist bei mangelndem Kontakt zur Antikörperoberfläche die in der Substitutionsanalyse erkennbare Exklusivität des Asparagin 6 nicht eingängig. Bei der zweiten Subfamilie ist das aromatische System des Tryptophans in Kontakt zu Phe 32L, liegt aber größtenteils exponiert. Hingegen ist die Säureamidgruppe des Asparagin 6 in enger Nachbarschaft zu His 52H und zur Carbonylgruppe von Asp 31H und nimmt damit fast dieselbe Position in der Bindungstasche ein wie Asparagin 8 im h-pep, pepI.2 und pepI.4. Wie bei den letztgenannten Peptiden ist es nur durch Arginin austauschbar, obwohl die Bindung dadurch schwächer wird. Während die Asparagin 6-Seitenkette in der h-pep-Struktur durch

das C-terminale Leucin von der Umgebung abgeschirmt wird, geschieht dies in der gedockten Struktur durch die lange Lysin 3-Seitenkette.

Die folgenden beiden Residuen Leucin 7 und Isoleucin 8 sind wiederum in allen Strukturen der beiden konformationellen Unterfamilien in identischer Lage. Das essentielle Leucin ist tief in einer Falte der Bindungsgrube begraben und zeigt eine starke Interaktion mit Phe 94L. Das ebenfalls unentbehrliche Isoleucin ist in genau derselben kleinen hydrophoben Tasche der schweren Kette verankert wie das endständige Isoleucin des u1-pep. In beiden Fällen läßt es sich auch nicht durch das γ -verzweigte Leucin substituieren.

Die C-terminalen Residuen sind in sehr vielen Strukturen der Konformationsfamilie in einem kurzen Abschnitt α -helicaler Rückgratkonformation einbezogen, die selten mehr als eine

	<i>Hydrophob</i>	<i>Polar</i>	<i>Ionisch</i>
CDR:L1			
Phe 32	W5		
CDR:L2			
Tyr 49 O η		ace-N α O	
Arg 50 N η			E4 O ϵ
CDR:L3			
Tyr 91	F1, W5, L7		
Asp 92 O		W5 N ϵ , N11 N δ	
Phe 94	L7, I8		
CDR:H1			
Asp 31 O δ			K3 N ζ
Asp 31 O		N6 N δ	
Tyr 32	F1		
Glu 33 O ϵ		L7 N	
His 35	L7		
CDR:H2			
Gly 50	I8		
His 52	I8		
His 52 N ϵ		N6 N δ	
Gly 57	I8		
Ala 59	I8		
CDR:H3			
Lys 99	F1		
Asp 100 O δ		F1 N	

Tab. 9. Hydrophobe, polare und ionische Kontakte von u2-pep zu den Residuen der *complimentarity determining region* (CDR) von CB4-1 in der gedockten Struktur. CDR:L1 bezeichnet den CDR-Loop 1 der leichten Kette, CDR:H1 den CDR-Loop 1 der schweren Kette des Antikörpers usw.

Helixwindung umfaßt. Das endständige, durch Leucin ersetzbare Asparagin 11 schließlich ist in seiner Bedeutung aus der gedockten Struktur nicht widerspruchsfrei erklärbar, da es recht variable Positionen innerhalb der konformationellen Familie hat. In dem vorgestellten Modell ist die Säureamid-Seitenkette in einem komplexen polaren Netzwerk zu sehen, das das

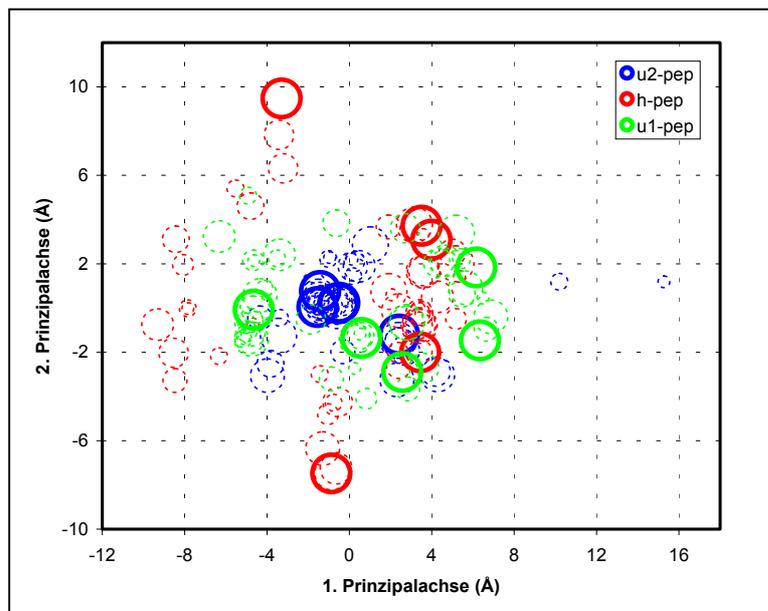


Abb. 23. Ähnlichkeiten der jeweils 10 energetiefsten Konformationen aus jeweils 5 unabhängigen Docking-Simulationen von h-pep, u1-pep und u2-pep zueinander. Der statische Rmsd der Rückgrat-Atome (ohne Superposition, berücksichtigt daher die relative Lage zum Antikörper) der je 50 Konformationen eines Peptids wurde ähnlich wie in Abb. 5 dem Raum der Hauptachsen zugeordnet, hier jedoch nur auf zwei Dimensionen. Jeder Kreis repräsentiert eine Konformation, die Fläche korrespondiert mit dem Betrag der Energie. Die energetiefsten Konformationen jeder Simulation sind fett dargestellt. Nur für das u2-pep sind diese strukturell konvergent.

Rückgrat-Carbonylatom von Asp 92L und das N ϵ -Atom von Tryptophan 5 umfaßt. In anderen Strukturen der Familie werden auch Kontakte zur Seitengruppen-Amidfunktion von Glutamin 10 beobachtet, wobei letztere ebenfalls eine H-Brückenbindung zu Tryptophan 5 aufbaut.

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß im Gegensatz zu den anderen gedockten linearen Peptiden beim u2-pep eine große Konvergenz unter den Niedrigenergiekonformationen in strukturellen Merkmalen beobachtet werden kann (Abb. 23). Die beobachteten Kontakte des konvergenten konformationellen Clusters können aus der Substitutionsanalyse in guter Weise nachvollzogen werden und stimmen teilweise mit denen überein, die bereits aus den Kristallstrukturen der Komplexe von h-pep und u1-pep bekannt sind. Mit dem h-pep hat die vorhergesagte Struktur des u2-pep die generelle Rückgratkonformation gemeinsam, sowie die polaren Kontakte von Glutamat 4 und Asparagin 6. Die vom C-terminalen Isoleucin des u1-pep okkupierte Bindungstasche wird auch vom Isoleucin des u2-pep eingenommen.

3. 5. 3 Zusammenfassung: Konvergenzschwierigkeiten beim Docking linearer Peptide

Die hier vorgestellten Konformationssuche-Simulationen beim Docking linearer Peptide an die Bindungsfläche von CB4-1 lassen erkennen, daß die Konvergenz mehrerer unabhängiger Rechnungen ein und desselben Peptids in der Regel nicht befriedigend ist. Von den beschriebenen Simulationen von h-pep, pepI.4, pepI.5, u1-pep und u2-pep resultierten nur die des letzteren in ähnlichen strukturellen Familien (Abb. 23). Auch die Simulationen anderer Transformationspeptide aus den Umwandlungswegen h-pep \leftrightarrow u1-pep bzw. h-pep \leftrightarrow u2-pep, die hier nicht vorgestellt wurden, zeigen, daß strukturelle Konvergenz selbst bei

befriedigender energetischer Konvergenz für lineare Peptide kaum beobachtbar ist. Es können zwar in nahezu allen Simulationen Peptidstrukturen identifiziert werden, die der Zielstruktur sehr nahe kommen, aber diese treten nur vereinzelt auf und sind in der Regel nicht besträngierend. Für die Vorhersage unbekannter Strukturen ist aber Konvergenz unverzichtbar, um Aussagen über Wechselwirkungen mit der Bindungsregion des Antikörpers treffen zu können. Zur Analyse der Bindungsmodi sequentiell eng verwandter linearer Peptide aus den Transformationswegen zwischen h-pep, u1-pep und u2-pep, deren differentielle Effekte potentiell sehr klein sind, ist die Vorhersage durch molekulare Modellierung daher wenig geeignet. Im folgenden soll nun untersucht werden, welches Konvergenzverhalten konformationell eingeschränkte Peptide bei Docking-Simulationen an Antikörper-Oberflächen aufweisen.

3. 6 Docking-Simulationen konformationell eingeschränkter Peptide

Unter den 38 Antikörper-Peptid-Komplexen, deren Koordinaten derzeit in der Protein Data Base Datenbank (PDB, (Berman et al., 2000)) deponiert sind, sind nur vier Strukturen mit konformationell eingeschränkten Peptiden zu finden (PDB Codes 1e4w, 1ikf, 1obe und 2f58). Von diesen eignet sich nur der Antikörper tAb2 im Komplex mit *cyclo*(N α -C δ ₇)-SHFNEYE (1e4w) zur Überprüfung der Identifizierbarkeit der gebundenen Konformation mit globalen Optimierungsmethoden. Der Bindungspartner des IgG1- κ Antikörper in der Struktur von 1ikf ist Cyclosporin, ein 11-meres, *head-to-tail* verbrücktes Peptid, das überwiegend N-methylierte und auch unnatürliche Aminosäuren enthält. Es ist daher nicht für ein Kraftfeld geeignet, das für Standard-Aminosäuren entwickelt wurde. Das Disulfid-verknüpfte 13-mer Peptid aus der Struktur von 1obe (mit dem anti-gp41 Antikörper 3D6) kann nur eingeschränkt als konformationsstabilisiert angesehen werden, da die Cyclisierung hier nur 7 Aminosäuren umfaßt (zwischen Cys 1 und Cys 7) und der Rest des Peptids linear ist. Darüber hinaus ist die Struktur ein theoretisches Modell und nicht durch Kristallstrukturanalyse verifiziert. Die Cyclisierung des 12-meren Peptids aus dem Komplex mit anti gp120-IgG1 Fab Fragment 58.2 (2f58) schließlich wurde durch eine Hydroxam-Bindung mit einem 1-Imino-5-pentanone-Linker erreicht, für die dabei entstehende N-C-Doppelbindung sind ebenfalls die Kraftfeld-Parameter ungenügend charakterisiert.

3. 6. 1 Docking-Simulationen *tAb2*-bindender, cyclischer Peptide

Der monoklonale anti-TGF α -Antikörper *tAb2* wurde in seiner Kristallstruktur mit dem linearen Wildtyp-Epitop VVSHFND (PDB Code 1e4x) und dem *head-to-sidechain* cyclisierten Peptid *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE (PDB Code 1e4w) charakterisiert (Winkler, 1996; Winkler et al., 1996). Beide binden in einer identischen Konformation in der engen und tiefen Antikörper-Bindungstasche. Es ist weiterhin bekannt, daß das lineare Peptid SHFNEYE nur sehr niedrigaffin an den IgG κ -Antikörper bindet ($K_D > 10^{-4}$ M). Das lineare, vom Wildtyp abgeleitete Peptid SHFN Δ YE dagegen bindet in etwa gleicher Stärke wie dessen cyclisierte Varianten *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFN Δ YE (Abb. 24) und *cyclo*(S γ_2 -S γ_8)-GCSHFND Δ C ($K_D = 10^{-6}$ - 10^{-7} M). Die strukturelle Ursache für dieses differenzielle Verhalten ist bisher unbekannt.

Von den Aminosäuren des kleinen cyclischen Epitops *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE sind bis auf Tyrosin 6 alle in engem Kontakt mit dem Antikörper, wobei der Imidazolring von Histidin 2 am tiefsten in dem Spalt zwischen leichter und schwerer Kette begraben ist. Wie aus den Substitutionsanalysen der linearen und cyclischen Peptidvarianten hervorgeht, gibt es subtile Unterschiede in der Bindungsspezifität der einzelnen Aminosäuren. Bei den Varianten des Peptids SHFN Δ YE ist Serin 1 im cyclischen Peptid viel wichtiger als im linearen, da es nicht ersetzbar ist. Hingegen ist Aspartat 5 für die lineare Entität essentiell und kann nicht wie im

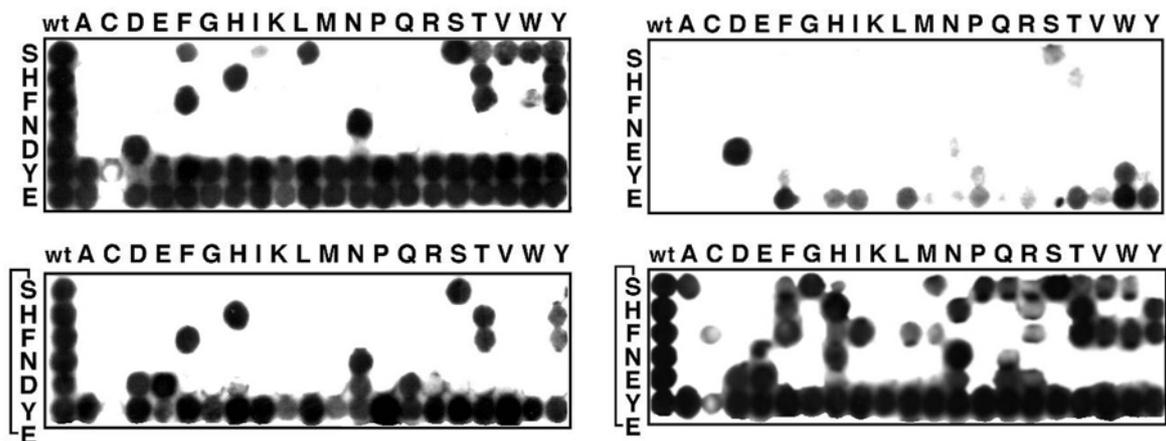


Abb. 24. Substitutionsanalysen von SHFN Δ YE (links oben) *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFN Δ YE (links unten), SHFNEYE (rechts oben) und *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE (rechts unten) (Abb. aus Winkler, 1996).

linearen Peptid gegen Glutamat ausgetauscht werden. Im Vergleich der beiden cyclischen Peptiden fällt auf, daß es im *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE weniger „harte“ Schlüsselaminosäuren gibt als in der Variante *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFN Δ YE. Das Substitutionsmuster des linearen Peptids SHFNEYE ist schwer einzuschätzen, da es überwiegend für die Position 5 eine starke Bevorzugung für Aspartat zeigt.

3. 6. 1. 1 Docking von SHFNEYE und *cyclo(N α -C δ 7)*-SHFNEYE an tAb2

Wiederum wurden für jedes Peptid je fünf Docking-Simulationen durchgeführt, die je von zufällig erzeugten Konformationen ausgingen. Die Lactam-Verbrückung zwischen der N-terminalen Aminogruppe und der C δ -Carboxyfunktion von Glutamat 7 wurde dabei durch ein zusätzliches Set von Distanz-Zwangsbedingungen erzeugt, diese virtuelle Bindung ermöglicht die Behandlung des cyclischen Peptids im Raum der internen Koordinaten, ohne mit der Molekülbaumstruktur zu interferieren. Die Zwangsterme wurden als starke harmonische Potentiale ausgedrückt, damit durch die lokale Minimierung nach jedem Monte-Carlo-Schritt die Geometrie der pseudo-Peptidbindung sofort wieder hergestellt wird.

Für das cyclische Peptid konvergierten alle Rechnungen in energetischer Hinsicht mit einer maximalen Energiedifferenz der energietiefsten Konformationen von 1,7 kcal/mol. Strukturelle Ähnlichkeit (<1,5 Å Rückgrat-RMSD von der Kristallstruktur des Peptids im Komplex, Abb. 25) wiesen die energietiefsten Strukturen von zwei der Rechnungen auf, die geringste Abweichung bei allen Simulationen war 0,7 Å. Bei weiteren zwei Durchläufen ist die generelle Orientierung des Peptids korrekt, d. h. Serin 1 und Histidin 2 sind tief in der Bindungstasche des Antikörpers begraben, die Ringstruktur ist aber gegenüber der Zielstruktur verzerrt und die übrigen Residuen gehen Kontakte ein, die verschieden von den im Kristall beobachteten sind. Die Variabilität der Abweichungen ist insgesamt kleiner als bei den oben beschriebenen Simulationen der linearen CB4-1-bindenden Peptiden, sie ist nie größer als 9 Å RMSD von der Zielstruktur. In nur einer der gedockten Strukturen (mit 1,4 Å Gesamt-RMSD der Rückgratotope) konnte jedoch die korrekte Position der Seitenkette von Glutamat 5 identifiziert werden, wobei diese Struktur aber nicht unter den besten rangierte wegen nicht optimaler Kontakte des Histidin 2.

Die Simulationen der linearen Variante des Peptids, SHFNEYE, konvergierten nur für drei der fünf Rechnungen in energetischer Hinsicht (allerdings mit 4,8 kcal/mol Differenz der energietiefsten Konformationen). Eine strukturelle Konvergenz war jedoch nicht festzustellen. Die Konformationsstapel der Simulationen beinhalten eine große Bandbreite an möglichen Konformationen, die sowohl untereinander als auch in Vergleich mit der Zielstruktur wenig Ähnlichkeiten aufweisen. Die kleinste beobachtete Abweichung von der Rückgratstruktur des cyclischen Peptids war 2,2 Å, allerdings sind die Kontakte der Seitenketten selbst in dieser Struktur verschieden von denen des Vergleichspeptids.

3. 6. 1. 2 Docking von SHFNDYE, *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNDYE und *cyclo*(S γ_2 -S γ_8)-GCSHFNDC an tAb2

Nach dem Aufbau der linearen Sequenzen aus Aminosäuremonomeren wurden wiederum, wie beschrieben, durch Zwangsterme Cyclisierungen emuliert, wobei für die Disulfid-Verbrückung ein anderes Set von Termen gewählt wurde (siehe Material und Methoden). Das

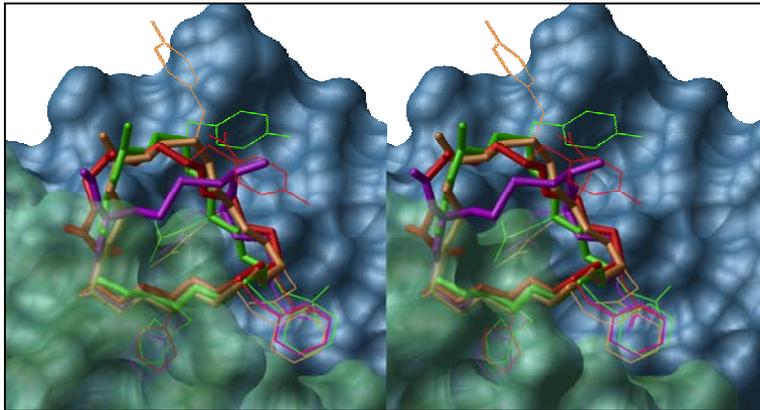


Abb. 25. Stereobild: Docking von cyclischen tAb2-bindenden Peptiden. Die Strukturen von *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNDYE (grün), *cyclo*(S γ_2 -S γ_8)-GCSHFNDC (magenta) und *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE (rot), die der Rückgratstruktur von *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE (braun) in der Kristallstruktur des Komplexes (PDB code 1e4w) am ähnlichsten sind, sind dargestellt. Der Blick geht seitlich von der leichten Kette (transparent grün) durch die Bindungstasche zur schweren Kette (blau), um die tief vergrabene Position der Histidin-Seitenkette sichtbar zu machen.

Docking erfolgte nach dem gleichen Protokoll mit 10^8 Funktionsaufrufen während der Simulation in Gegenwart der Antikörperpotentiale.

Sowohl das Lactam-verbrückte als auch das durch eine Disulfidbrücke cyclisierte Peptid lieferten konvergente Simulationen, bei denen die Rückgratstruktur des homologen Peptids *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE unter den energietiefsten Konformationen in befriedigender Näherung identifiziert werden konnte. Die maximalen Differenzen bei der internen Energie zwischen den bestrangierenden Lösungen betrug für das *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNDYE 2,3 kcal/mol, für *cyclo*(S γ_2 -S γ_8)-GCSHFNDC bei vier Simulationen 2,4 kcal/mol (eine nichtkonvergente Simulation hatte eine Differenz von rund 7 kcal/mol). Bei zwei (Lactamcyclus) bzw. drei Simulationen (Disulfidcyclus) war bei den energietiefsten Strukturen eine Abweichung von kleiner als 1,5 Å in Bezug auf die Rückgratatome des Vergleichspeptids zu beobachten. Hier konnte auch, im Gegensatz zu den Simulationsergebnissen von *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE, die annähernd korrekte räumliche Position der Aspartat 5-Seitenkette wiederhergestellt werden (1,4/0,9 Å RMSD zwischen den Atomen der jeweiligen Carboxyfunktionen für den Lactam-/Disulfidcyclus, Abb. 25).

Bei gleicher Ringgröße der beiden Cyclen (mit je 24 Atomen, die den Ring bilden) ist die molekulare Zusammensetzung unterschiedlich. Entsprechend finden sich auch für die nichtidentischen Aminosäuren in der Verbindungsregion unterschiedliche Konformationen. Während die rigide Amidverbrückung im *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNDYE nur eine relativ planare

Form des Ringes zuläßt, ist dieser im *cyclo*(S γ_2 -S γ_8)-GCSHFNDC verdreht. Hinzu kommt die in der Disulfidvariante fehlende Interaktion der Tyrosinseitenkette. Obwohl in der Kristallstruktur keine Kontakte des Tyrosins mit dem Antikörper beobachtet werden können, sind in einer Reihe von Konformationen des *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNDYE und *cyclo*(N α -C δ_7)-SHFNEYE polar-hydrophobe Interaktionen zu erkennen, die aber die Rückgratstruktur der Peptide nicht beeinträchtigen.

Die lineare Variante des Peptids, SHFNDYE, zeigte bei verschiedenen Kontrollrechnungen weder in energetischer noch in struktureller Hinsicht zufriedenstellende Konvergenz. Es konnten lediglich zwei Strukturen identifiziert werden, deren Rückgratabweichung von der erwarteten Struktur weniger als 2 Å betrug, diese wurden aber als energetisch ungünstig bewertet. Interessanterweise ist in diesen beiden Strukturen die Carboxygruppe des Aspartat 5 in der richtigen räumlichen Position.

3. 6. 2 Design und Docking von homo- und heterodetischen cyclischen CB4-1 bindenden Peptiden

Konformationell eingeschränkte Peptide führen bei Docking-Simulationen an den tAb2-Antikörper in Hinsicht auf energetische und strukturelle Konvergenz zu besseren Ergebnissen als ihre linearen Homologa. Da für den Antikörper CB4-1 keine cyclischen Peptidepitope bekannt sind, wurden, ausgehend von der linearen Sequenz des u1-pep GLYEWGGARIT, eine Reihe von cyclischen Analoga konstruiert, welche anschließend in Docking-Rechnungen simuliert und Bindungsstudien unterworfen wurden. Das u1-pep wurde als Templat gewählt, da es bereits als lineare Sequenz in einer schleifenartigen Konformation an den Antikörper bindet und so ideale Voraussetzungen für eine Cyclisierung bietet. Die bindende Konformation des u1-pep kann in der Tat als ein nichtkovalenter Cyclus angesehen werden, da sie durch eine H-Brückenbindung zwischen der Guanidinogruppe des Arginin 9 und der Carbonylfunktion von Glycin 1 intramolekular stabilisiert wird. Das Design von konformationell eingeschränkten Analoga dieses Peptids war zunächst darauf gerichtet, die nichtkovalente H-Brückenbindung durch eine kovalente Bindung zu ersetzen.

3. 6. 2. 1 Design der cyclischen u1-pep Analoga

Für die Cyclisierungen sollten ausschließlich chemische Reaktionen verwendet werden, die mit der Standard-Chemie in der Peptidsynthese verträglich sind. Einerseits sollte dies ermöglichen, durch Peptidsynthese an der Festphase sowie mittels Spotsynthese auf Cellulosemembranen die Bindungsspezifität der Peptidcyclen unmittelbar zu untersuchen und mit der des linearen Templats zu vergleichen. Andererseits ist das für die Molekülsimulationen verwendete ECEPP/3-Kraftfeld speziell für die in normalen Peptiden vorkommenden Bindungsarten und Atomtypen entwickelt worden; eine potentiell schwierige Anpassung des Kraftfeldes an andere chemische Bindungen kann somit entfallen. Für die Linkerchemie kamen deshalb nur Disulfid- (heterodetische Cyclen) und Lactamverbrückungen (homodetische Cyclen) in Frage.

In einem ersten Schritt wurde die Peptidkette mit der Sequenz des u1-pep aus Aminosäuremonomer-Bausteinen aufgebaut, wobei an Stelle des Arginin 9 entweder Lysin für eine Lactamverbrückung oder Cystein für eine Disulfidcyclisierung eingeführt wurde. Die Peptidkette wurde dann N-terminal um die Aminosäure ergänzt, die den jeweiligen Cyclisierungspartner (Aspartat/Glutamat bzw. Cystein) stellt. Die Atome der mit dem u1-pep identischen Residuen wurden dann mit einer harmonischen Kraft von $1 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$ auf die entsprechenden Atompositionen des u1-pep in der Komplexstruktur mit dem CB4-1 Antikörper gezogen. Nachdem die Cyclisierungsbindung durch die schon beschriebenen Zwangsterme emuliert wurde, erfolgte eine vollständige Energieminimierung des neuen Konstrukts *in vacuo* unter Einbeziehung der Zwangsterme für die Cyclisierung und die Atompositionen der identischen Residuen.

Wie sich herausstellte, war die Länge der homodetischen Linkerregion (d. h. die kombinierte Länge der Lysin- und Aspartat/Glutamat-Seitenketten) ausreichend für eine sterische und geometrische Relaxation, ohne daß es zu einer nennenswerten Abweichung von den vorgegebenen Atompositionen des Templatpeptids gekommen wäre. Im Falle der heterodetischen Cyclen kam es durch die kürzere Gesamtlänge der Cystin-Seitenketten dagegen zu einer Verzerrung des Ringes im Vergleich mit der Zielstruktur mit der Folge, daß die für die Bindung wichtigen Kontakte der Schlüsselaminosäuren (siehe oben) geschwächt wurden. Deshalb mussten zusätzliche Aminosäuren als Abstandshalter eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden L- und D-Prolin gewählt, da durch die eingeschränkten Freiheitsgrade von Prolin eine weitere Versteifung des Rückgratringes und damit eine potentiell stärkere Stabilisierung der bindenden Konformation erwartet wurde. Das D-Stereoisomer wurde verwendet, da aus sterischen Gründen eine scharfe Rückgratbeugung erforderlich ist. Auch

für die homodetische Cyclisierung wurden Abstandshalter-Aminosäuren eingeführt, um den Einfluß von Verlängerungen auf die Vorhersagbarkeit der gebundenen Struktur und die Bindungsaffinität zu untersuchen.

Aus einer Reihe von Modellen wurden sechs u1-pep-Analoga ausgewählt: *cyclo*(C γ_1 -N ζ_9)-DLYEWGGAKIT (**ho1-pep**), *cyclo*(C δ_1 -N ζ_9)-ELYEWGGAKIT (**ho2-pep**), *cyclo*(C γ_1 -N ζ_{10})-DGLYEWGGAKIT (**ho3-pep**) und *cyclo*(C γ_1 -N ζ_{10})-DpLYEWGGAKIT (**ho4-pep**) (homodetische Cyclen), *cyclo*(S γ_1 -S γ_{11})-CPGLYEWGGACIT (**he1-pep**) und *cyclo*(S γ_1 -S γ_{11})-CPpLYEWGGACIT (**he2-pep**) (heterodetische Cyclen). Diese Konstrukte wurden wie beschrieben ausführlichen Monte-Carlo Optimierungen in Gegenwart des Antikörperpotentials unterworfen.

3. 6. 2. 2 Docking-Simulationen der homodetischen cyclischen Analoga an CB4-1

cyclo(C γ_1 -N ζ_9)-DLYEWGGAKIT (ho1-pep)

Jeweils ausgehend von einer zufällig erzeugten Konformation, wurden wiederum fünf unabhängige Konformationssuch-Prozeduren mit Monte-Carlo basierter globaler Optimierung durchgeführt. Ein zusätzlicher Energieterm sicherte die Beibehaltung der als virtuell behandelten Lactambindung. Für drei Simulationen konvergierten die Rückgratstrukturen (<2,5 Å RMSD) bei den energietiefsten Strukturen, aber in allen Simulationen finden sich zum u1-pep sehr ähnliche Konformationen unter den zehn bestrangierten (Tab. 10). Die energetische Konvergenz ist ebenfalls zufriedenstellend. Die ähnlichste Struktur ist bis auf Leucin 2 und Tyrosin 3 nahezu identisch mit dem Templatpeptid und die wichtigen Kontakte von Tryptophan 5 und Isoleucin 10 sind wiederhergestellt (Abb. 26). Ohne Berücksichtigung von Leucin und Tyrosin hat das Rückgrat nur eine Abweichung von 0,8 Å vom u1-pep im CB4-1 Komplex. Tyrosin 3 zeigt auch im u1-pep weg von der Bindungstasche und ist nicht wichtig für die Erkennung des Peptids am Antikörper. Leucin 2 aber sollte gleich essentiell sein wie für das Ausgangspeptid. In der gedockten Struktur ist die Seitenkette des Leucins leicht verdreht und hat einen geschwächten intramolekularen Kontakt zu Tryptophan 5 ohne aber wesentliche Kontaktfläche zu Tyr 32H zu verlieren. Die Linkerregion der lactamverbrückten terminalen Aminosäuren Aspartat 1 und Lysin 10 ist nicht perfekt gestreckt, wie das aus dem ursprünglichen Konstrukt erwartet wurde, was vermutlich die Verzerrung des Leucin-Kontaktes mitbegründet.

In vielen energietiefen Strukturen wurden zwar im Vergleich zum Templatpeptid sehr ähnliche Rückgratkonformationen gefunden, aber die detaillierte Betrachtung der

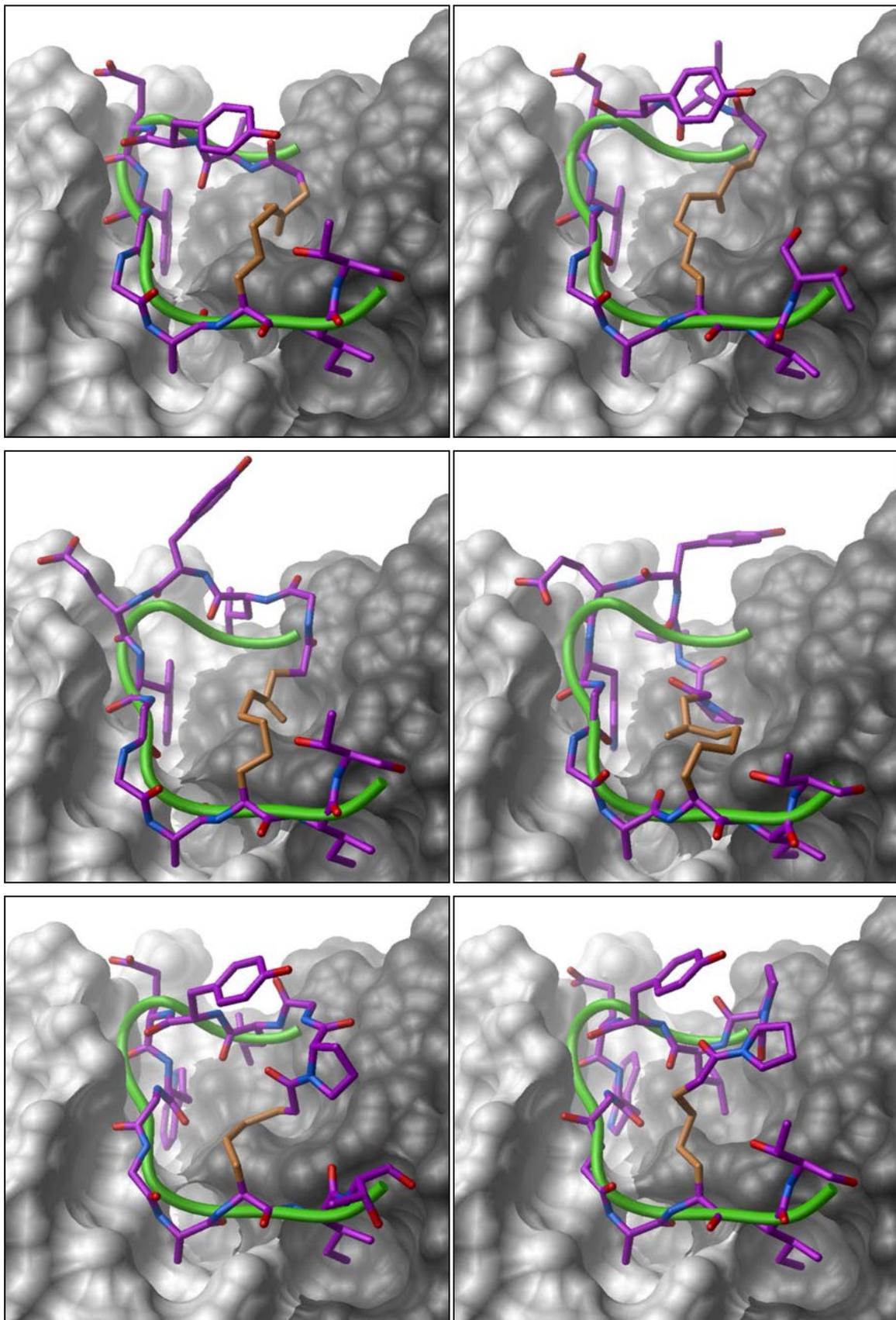


Abb. 26. Die zum u1-pep ähnlichsten Strukturen aus den Konformationsfamilien der Docking-Simulationen der sechs cyclischen Analoga. Ho1-pep (links oben), ho2-pep (rechts oben), ho3-pep (links Mitte), ho4-pep (rechts Mitte), he1-pep (links unten) und he2-pep (rechts unten) sind jeweils in magenta dargestellt mit der Linkerregion in braun. Termini sind aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die leichte Kette des Antikörpers erscheint weiß, die schwere grau. Zum Vergleich ist die Rückgratkonformation des u1-pep in grün dargestellt.

Seitenkettenkontakte ergibt, daß dort der Tryptophan-Ring in die Umgebung zeigt, während die tiefe, hydrophobe Einbuchtung der Bindungstasche, die von Tyr 49L, Thr 34L and Lys 99H begrenzt wird, durch die aliphatische Leucin-Seitenkette okkupiert wird. Dadurch ist der Bereich der N-terminalen Residuen verdreht, hingegen ist in fast allen solchen Fällen der C-terminale Teil des Peptids, von Glycin 6 angefangen, in sehr guter Übereinstimmung zur erwarteten Struktur.

cyclo(C δ_1 -N ζ_9)-ELYEWGGAKIT (ho2-pep)

Dieses Peptid hat in der Linkerregion im Vergleich zum ho1-pep nur eine Methylengruppe mehr, die Ergebnisse des Dockings an den Antikörper CB4-1 sehen sehr ähnlich aus. Auch hier sind die Simulationen konvergent in Hinblick auf Energie und m. E. auf die Rückgratstruktur (Tab. 10). In vielen Niedrigenergie-Strukturen kann das Ausklappen des Tryptophan 5-Indolringes aus der Bindungstasche beobachtet werden, auch die Verdrehung des N-terminalen Leucins aus der erwarteten Position tritt bei allen ähnlichen Strukturen auf. Der Kontaktbereich zur schweren Antikörperkette erscheint bei den gedockten Strukturen deutlich geschwächt. Die Linkerregion ist stärker aufgeweitet im Vergleich zum ho1-pep, was den N-Terminus mehr aus der Bindungstasche drückt (Abb. 26). In allen Simulationen aber, auch in der nichtkonvergenten, finden sich Strukturen, die eine dem u1-pep eng verwandte Rückgratstruktur aufweisen.

cyclo(C γ_1 -N ζ_{10})-DGLYEWGGAKIT (ho3-pep)

Drei der Simulationen konvergierten in einem Konformationscluster, das durchschnittlich 2 Å RMSD-Abweichung zu den Rückgratatomen des linearen Templatpeptids u1-pep aufwies (Tab. 10). Berücksichtigt man die terminalen Aminosäuren Glycin und Threonin nicht, weist die zum u1-pep im CB4-1-Komplex ähnlichste Struktur sogar nur eine mittlere Abweichung der Rückgratome von weniger als 1 Å auf (Abb. 26). In allen Strukturen der konvergenten Konformationsfamilie sind die Kontakte der als Schlüsselpositionen im u1-pep identifizierten Aminosäuren Tryptophan und Isoleucin in absolut identischer Weise wieder aufzufinden. Der Indolring von Tryptophan 6 ist in der tiefen Einbuchtung der Bindungstasche, die von Tyr 49L, Thr 34L and Lys 99H begrenzt wird, begraben, Isoleucin 11 in der kleinen CDR:H1-Bindungsmulde. Das im u1-pep wichtige identifizierte Leucin 3 ist allerdings auch hier im Vergleich zum Templatpeptid verdreht. Da durch die Abstandshalter- und Linkerregion der Ring außerdem leicht geweitet ist und die Termini dadurch im ho1-pep ca. 1,1 Å weiter voneinander entfernt sind als im u1-pep, haben die Leucin-Seitenketten von

ho3-pep und u1-pep eine mittlere Abweichung von mehr als 3 Å. Dadurch ist die Seitenkette des Leucin im ho3-pep mehr exponiert (73 Å^2 wasserzugängliche Oberfläche [solvent accessible surface, SAS] im Gegensatz zu 27 Å^2 im u1-pep). Der hauptsächliche hydrophobe Kontakt zu Tyr 32H bleibt zwar erhalten, die Kontaktfläche verringert sich aber um etwa 8 Å^2 , ebenso vermindert sich die intramolekulare Kontaktfläche zu Tryptophan 6 um etwa 16 Å^2 .

Die Linkerregion der kombinierten Seitenketten von Aspartat 1 und Lysin 10 verläuft nahezu parallel zu dem zentralen Peptidteil an der Oberfläche des CDR:H1-Loops. Der Ring erhält damit eine kompakte und längliche, nahezu planare Form.

cyclo(C γ_1 -N ζ_{10})-DpLYEWGGAKIT (ho4-pep)

In diesem Peptid wurde statt des nativen Glycins ein D-Prolin als Abstandshalter eingesetzt mit der Erwartung, daß dieses den erforderlichen scharfen Turn im Peptidrückgrat einleitet und die Struktur weiterhin versteift. Zwei der fünf unabhängigen Simulationen konvergierten mit einer Rückgrat-Abweichung von etwa 2 Å, eine dritte Rechnung zeigte einen RMSD von 3,1 Å bei der energietiefsten Konformation. Die nicht strukturell konvergenten Simulationen hatten eine Energiedifferenz zu den niedrigsten Energien von ca. 5 kcal/mol (Tab. 10).

Obwohl die zum Templatpeptid ähnlichste Struktur vom Tryptophan 6 bis zum C-Terminus nahezu identisch in der Rückgrat- und Seitenkettenkonformation ist, hat das gesamte Peptid eine mittlere Abweichung der korrespondierenden Rückgrat-atome von 1,6 Å (Abb. 26). Diese auf den N-terminalen Teil beschränkte Abweichung ist auf ein unerwartetes Verhalten der Linkerregion zurückzuführen. Entgegen der prognostizierten Annahme, das D-Prolin würde sich ähnlich wie Glycin 1 im u1-pep größtenteils lösungsmittlexponiert an der Oberfläche der CDR:H1-Region positionieren, ist es in der gedockten Struktur in der Bindungstasche vergraben. Daraus ergeben sich zwei strukturelle Folgen. Erstens nimmt das Prolin mit seiner Seitenkette nahezu dieselbe Position wie es im linearen Vergleichspeptid u1-pep das für die Bindung sehr wichtige Leucin hat. Das Leucin wiederum, dessen Seitenkette im Schnitt 4 Å von der erwarteten Position abweicht, macht jetzt überwiegend einen anderen hydrophoben Kontakt, und zwar zu Tyr 49L und nur noch schwach zur schweren Kette. Zum anderen ist die Öffnung der Rückgratschleife zwar wie beim ho1-pep größer als im u1-pep, aber durch einen doppelten Turn der N-terminalen Aminosäuren ist der Ring jetzt nicht mehr planar.

3. 6. 2. 3 Docking-Simulationen der heterodetischen cyclischen Analoga an CB4-1

cyclo(S γ ₁-S γ ₁₁)-CPGLYEWGGACIT (he1-pep)

Die im Vergleich zum Templatpeptid kürzere Gesamtlänge der Linkerregion, die aus je zwei Schwefelatomen der Disulfidbindung und den zwei C β -Atomen der Cystine besteht, machte eine N-terminale Verlängerung des Peptids erforderlich. Die Simulationen dieses Disulfidcyclisierten Derivats des u1-pep konvergierten ebenfalls in struktureller und energetischer Hinsicht (Tab. 10), allerdings mit einer größeren Streuung unter den Niedrigenergie-Strukturen in Bezug auf die mittlere Abweichung vom Templatpeptid. Wie auch schon bei den homodetischen Analoga ist diese Streuung überwiegend auf eine große konformationelle Vielfalt im N-terminalen Teil zurückzuführen, während die C-terminale Peptidhälfte in mehr als 50% aller Niedrigenergiestrukturen kaum Varianz zu der Konformation des u1-pep aufweist (Abb. 28). In der mit 1,44 Å Rückgrat-RMSD zum u1-pep ähnlichsten Konformation des he1-pep ist das zusätzlich eingeführte Prolin exponiert an der Oberfläche der Bindungstasche und hat einen hydrophoben Kontakt zu His 52H (Abb. 26). Dadurch ist der Ring nicht, wie in den homodetischen Cyclen, geweitet und das Leucin 4 ist in etwa an der erwarteten Position. In anderen Niedrigenergie-Strukturen ist das Prolin 2 dagegen, ähnlich wie beim homodetischen ho4-pep, in der Bindungstasche vergraben, was zur Folge hat, daß die anderen Kontakte der N-terminalen Aminosäuren nicht mehr identisch zu denen des u1-pep sind. So haben dort die Seitenketten des Tyrosins und des Leucins ihre Positionen ausgetauscht, während alle wichtigen Interaktionen des C-terminalen Peptidteils jedoch erhalten wurden.

cyclo(S γ ₁-S γ ₁₁)-CPpLYEWGGACIT (he2-pep)

Für die N-terminale Verlängerung des zweiten heterodetischen Peptidcyclus wurde wiederum ein D-Prolin an Stelle des nativen Glycins eingesetzt in der Erwartung, daß dieses den erforderlichen engen Rückgrat-Turn ebenso ermöglicht und gleichzeitig zu einer weiteren Einschränkung der Freiheitsgrade führt. Die dem u1-pep ähnlichste Tiefstenergiestruktur ist nach dem Docking auch nahezu identisch zu der Konformation, die für das he1-pep aufgefunden wurde (Abb. 26). Die Rückgratkonformation weist für das D-Prolin 3 ϕ - ψ -Werte im zweiten Quadranten des Ramachandran-Diagramms auf, also in einem Bereich, der für L-Aminosäuren verboten ist und nur von Glycin besucht wird. Die mittlere Abweichung der Rückgratatome im Vergleich zwischen den Strukturen des he1- und he2-pep beträgt nur ca. 1 Å, auch die Positionen der Leucin-Seitenketten weichen nur um diesen Betrag voneinander

ab. Wie auch schon beim he1-pep, sind die Rückgratwinkel in der Turnregion um Tryptophan 7 und Glycin 8 gegenüber dem u1-pep verzerrt, ohne daß es dadurch zu Beeinträchtigungen der Seitenketten-Interaktionen kommen würde. Die Differenz im ψ -Winkel von Tryptophan 7 (-140°) wird durch das folgende Glycin (ϕ -Differenz zum u1-pep 164°) wieder ausgeglichen, so daß sich für die Gesamtkonformation des Peptids keine Konsequenz ergibt.

3. 6. 2. 4 Variation der Ringplanarität durch den Einfluß von Abstandsresiduen

Die Bindung des u1-pep GLYEWGGARIT an den Antikörper CB4-1 wird überwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen von Leucin 2, Tryptophan 5 und Isoleucin 10 in Bindungstaschen zwischen den CDR's vermittelt, während andere Aminosäuren (Glycin 6

Cyclische u1-pep Analoga	Simulation	Simulationsenergie der energietiefsten Konf. (kcal/mol)	Rückgrat-Rmsd zu u1-pep der energietiefsten Konf. (Å)	Rückgrat-Rmsd zu u1-pep der ähnlichsten Konf. (Å)	Rang der zu u1-pep ähnlichsten Konformation
ho1-pep	1	-422,1	1,14	1,14	1
	2	-419,3	7,11	2,16	3
	3	-421,1	2,45	2,29	41
	4	-422,7	2,31	2,26	4
	5	-423	2,75	2,43	13
ho2-pep	1	-421,1	2,18	1,19	2
	2	-419,3	7,47	1,64	3
	3	-421,1	2,53	1,83	69
	4	-422,7	2,01	2,01	1
	5	-422,9	2,29	1,79	85
ho3-pep	1	-422,6	1,71	1,66	19
	2	-408,5	4,15	4,07	15
	3	-400,1	4,63	4,63	1
	4	-422,9	2,1	1,24	2
	5	-423,8	2,01	1,55	63
ho4-pep	1	-438,8	1,98	1,97	2
	2	-439,5	2,35	1,72	54
	3	-433,2	5,02	2,98	18
	4	-434,1	2,42	1,55	46
	5	-439,7	3,1	2,9	3
he1-pep	1	-422,5	5,53	5,52	5
	2	-423,1	1,7	1,6	2
	3	-423,6	2,23	1,57	38
	4	-422,8	1,44	1,44	1
	5	-424,4	2,15	2,15	1
he2-pep	1	-431,9	2,02	2,02	2
	2	-431,7	3,01	3,01	1
	3	-432,1	1,37	1,21	4
	4	-427,9	1,68	1,68	1
	5	-432,5	2,74	2,24	3

Tab. 10. Ergebnisse des Dockings von cyclischen u1-pep Analoga an den Antikörper CB4-1.

und 7 sowie Arginin 9) die bindende Konformation erst ermöglichen bzw. stabilisieren. In Folge des Arrangements der essentiellen hydrophoben Aminosäuren ist die Rückgratstruktur im u1-pep nahezu planar. In den gedockten Strukturen der konstruierten cyclischen u1-pep-Analoga werden die wichtigen hydrophoben Kontakte ebenfalls beobachtet, aber durch die N-terminalen Modifizierungen und die sterischen Anforderungen der Linkerregionen kommt es notwendigerweise zu Verzerrungen der Planarität der Ringstrukturen, die aus dem Rückgrat und den Seitenketten der Linkeraminosäuren bestehen. Eine bei allen cyclischen Modifikationen beobachtete Folge ist ein veränderter Kontakt des Leucins zum Antikörper, aber noch mehr eine deutlich geschwächte intramolekulare Wechselwirkung der Leucin-Seitenkette zum Indolring des Tryptophans, der im u1-pep-Komplex sehr ausgeprägt ist. Im Falle von *cyclo*(C γ ₁-N ζ ₁₀)-DGLYEWGGAKIT (ho3-pep), das nur eine N-terminale Verlängerung, aber keine sonstige Modifikation besitzt, ist die Abweichung der

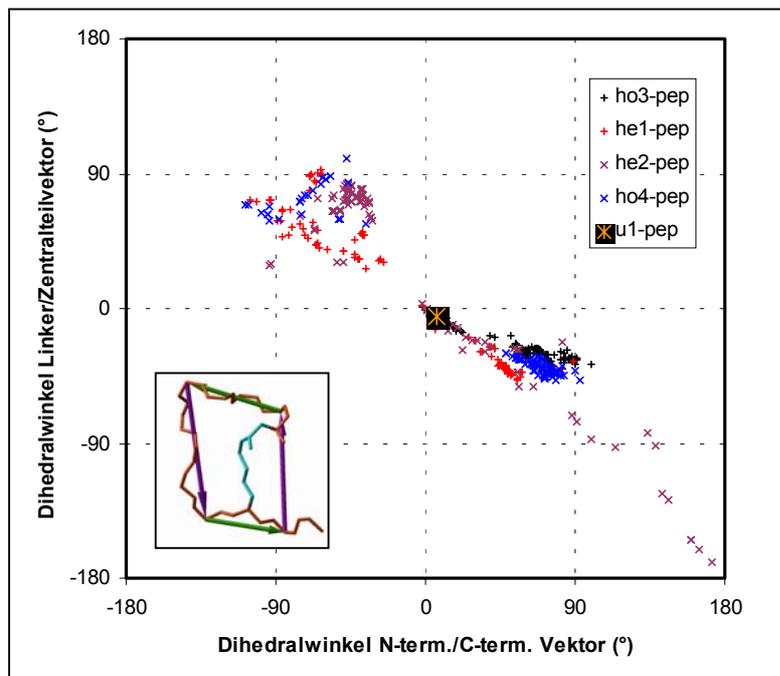


Abb. 27. Einfluß von Cyclisierungsbindung und Abstandsresiduen auf die Variabilität der Ringplanarität bei cyclischen u1-pep Analoga (ho3, ho4-pep – Lactam-verbrückt; he1, he2-pep – Disulfid-verbrückt). Gemessen wurden die Dihedralwinkel zwischen Vektoren, die den N-terminalen und den C-terminalen Teil (grün im kleinen Bild) bzw. die den zentralen Peptidteil und die Linkerregion (magenta) repräsentieren (Peptidrückgrat braun, Linkerregion cyan). Die Wertepaare für die 100 Strukturen aus je einem Konformationsstapel der Docking-Simulationen sind dargestellt. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Leucinposition einfach durch eine Aufweitung des Ringes bedingt. Bei den anderen cyclischen Peptiden, die eine oder mehrere Proline in der Verlängerungssequenz haben, nimmt das Rückgrat darüber hinaus auch noch einen turn-artigen, zusätzlichen Wirbel an, der die Leucin-Seitenkette aus der erwarteten Position drückt.

Zur Untersuchung der Streuung der Rückgrat-Planarität unter den Niedrigenergie-Strukturen der Docking-Simulationen wurden an alle Strukturen Vektoren an ausgewählte C α -Atome gelegt und die Dihedralwinkel zwischen den Vektoren gemessen. Der N-terminale Peptidteil wurde durch einen Vektor zwischen den C α -Atomen der Aminosäure, die Leucin vorausgeht, und von Glutamat dargestellt. Der C-terminale Abschnitt wird repräsentiert durch einen

Vektor zwischen den entsprechenden Atomen von Alanin und Isoleucin. Der zentrale Peptidteil wird als Vektor zwischen $C\alpha$ von Glutamat und $C\alpha$ von Alanin angesehen und entsprechend die Linkerregion als Vektor, der die Atome von Isoleucin und des Leucin-Vorgängers verbindet. Die Planarität definiert sich dann als Verhältnis des Dihedralwinkels zwischen den terminalen Vektoren und den Vektoren, die für den zentralen und Linkerteil stehen; die Ebene wird dabei durch vier in etwa equidistante Punkte aufgespannt. Das u1-pep selbst zeigt in seiner Komplexstruktur Dihedralwinkel von etwa 0° ($7.1^\circ/-5.1^\circ$), d. h. die Ebene, die durch das Rückgrat beschrieben wird, ist nahezu ideal planar.

In Abb. 27 ist für die jeweils 100 energietiefsten Strukturen der Dockingsimulationen der homo- und heterodetischen u1-pep-Analoga die Verteilung der die Planarität beschreibenden Dihedralwinkel zu sehen. Deutlich zu erkennen ist die geringere Streuung der Planaritätsverzerrung bei den Lactam-verbrückten Cyclen, im Falle von *cyclo*($C\gamma_1-N\zeta_{10}$)-DGLYEWGGAKIT beschränkt sich diese nur auf den zweiten Quadranten. Die überwiegende Anzahl der Niedrigenergie-Strukturen der homodetischen Analoga weist Werte um $70^\circ/-40^\circ$ auf. Die durch Disulfid-Bindungen verbrückten Analoga zeigen dagegen eine weite Streuung der Ringverzerrungs-Parameter in beiden möglichen Quadranten der Darstellung, wobei es besonders bei *cyclo*($S\gamma_1-S\gamma_{11}$)-CPpLYEWGGACIT Niedrigenergie-Lösungen gibt, deren Ringebene extreme Verdrehungen aufweisen. Die im Vergleich zur Lactambindung frei rotierbare Disulfidbindung ermöglicht offenbar eine größere Bandbreite an erlaubten

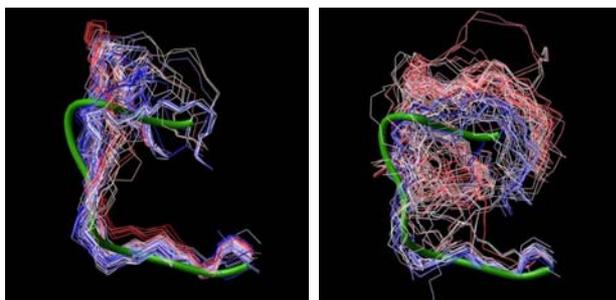


Abb. 28. Konformationsfamilien von *cyclo*($C\gamma_1-N\zeta_{10}$)-DGLYEWGGAKIT (ho3-pep, links) und *cyclo*($S\gamma_1-S\gamma_{11}$)-CPpLYEWGGACIT (he1-pep, rechts) in den Konformationsstapeln der konvergenten Docking-Simulationen. Je 100 Konformationen sind dargestellt mit Farben von blau (tiefste Energie) über weiß nach rot (höchste Energie). Zum Vergleich die Rückgratstruktur des u1-pep (grün).

Konformationen trotz der sterischen Anforderungen, die durch eine kovalente Verbrückung entstehen (Abb. 28). Diese breite Streuung der Ringplanarität ist jedoch auch abhängig von der Anzahl der in den Ring einbezogenen Atome (35 im Falle der Disulfid-Cyclen) und es kann erwartet werden, daß sich die Variabilität kleiner werdenden Ringen einschränkt.

Es ist außerdem bemerkenswert, daß die Einführung von rigiden Abstandshaltern unvorhergesehene Folgen für die bevorzugte Konformation haben kann. Während die Ringplanarität des Prolin-freien ho3-pep in einem sehr engen Bereich fokussiert ist, gibt es für die anderen cyclischen Analoga mit einem oder zwei Prolinen als Abstandshalter mindestens zwei bevorzugte Zonen in der Ringdeformations-Darstellung. Die Peptide mit einem Prolin

als Spacer, he2- und ho3-pep, zeigen im zweiten Quadranten eine Bevorzugung für einen engen Bereich der Dihedralwinkel-Landschaft, in dem die Mehrzahl der Niedrigenergie-Strukturen zu finden ist, und im vierten Quadranten eine weniger besuchte, weiter gestreute Verteilung. Umgekehrt verhält es sich dagegen im Fall des ho4-pep mit zwei aufeinanderfolgenden Prolinen, dessen mögliche Konformationen sich in einem schmalen Sektor des vierten Quadranten konzentrieren, während die Dihedralwinkelverhältnisse im zweiten Quadranten offenbar für dieses Peptid ungünstig sind und Lösungen ergibt, die der gebundenen Struktur des u1-pep nicht ähnlich sind.

3. 6. 2. 5 Bindungsstudien der cyclischen u1-pep Analoga

Von den konstruierten cyclischen Analoga des u1-pep wurden Bindungsstudien sowohl in löslicher Form als auch gebunden an der festen Cellulosephase durchgeführt. Die kompetitiven ELISA-Experimente, die in Anwesenheit des p24-Wildtyppeptids durchgeführt wurden, zeigen eine Verdrängung in der Größenordnung, wie sie auch beim linearen u1-pep beobachtet wird (Tab. 11). Dabei ergeben sich innerhalb der bei ELISA-Messungen zu erwartenden Ungenauigkeiten von bis zu 50% keine erkennbaren Unterschiede zwischen homo- und heterodetischen Peptidcyclen. Dies ist auch erkennbar an den festphasegebundenen Substitutionsanalysen, deren durchschnittliche Intensitäten bei gleichen Detektionsbedingungen ähnlich sind (Abb. 29). Die Austauschbarkeitsmuster der einzelnen Aminosäuren sind für alle Analoga identisch in der Hinsicht, daß die für die Bindung essentiellen Residuen in allen Konstrukten gleich sind und denen des u1-pep entsprechen. Unterschiedliche Signalintensitäten innerhalb einer Substitutionsanalyse, insbesondere auch bei den Wildtyp-Varianten (linke Spalte) erschweren eine differentielle Betrachtung von Spezifitätsunterschieden. So kann nicht mit Sicherheit über Spezifitätsunterschiede des Leucins bei den einzelnen Varianten geurteilt werden. Es ist allerdings ersichtlich, zumindest beim ho4-pep, daß D-Prolin in der Abstandshalterregion nicht optimal ist, wie dies auch an Hand der Docking-Simulationen vermutet wurde.

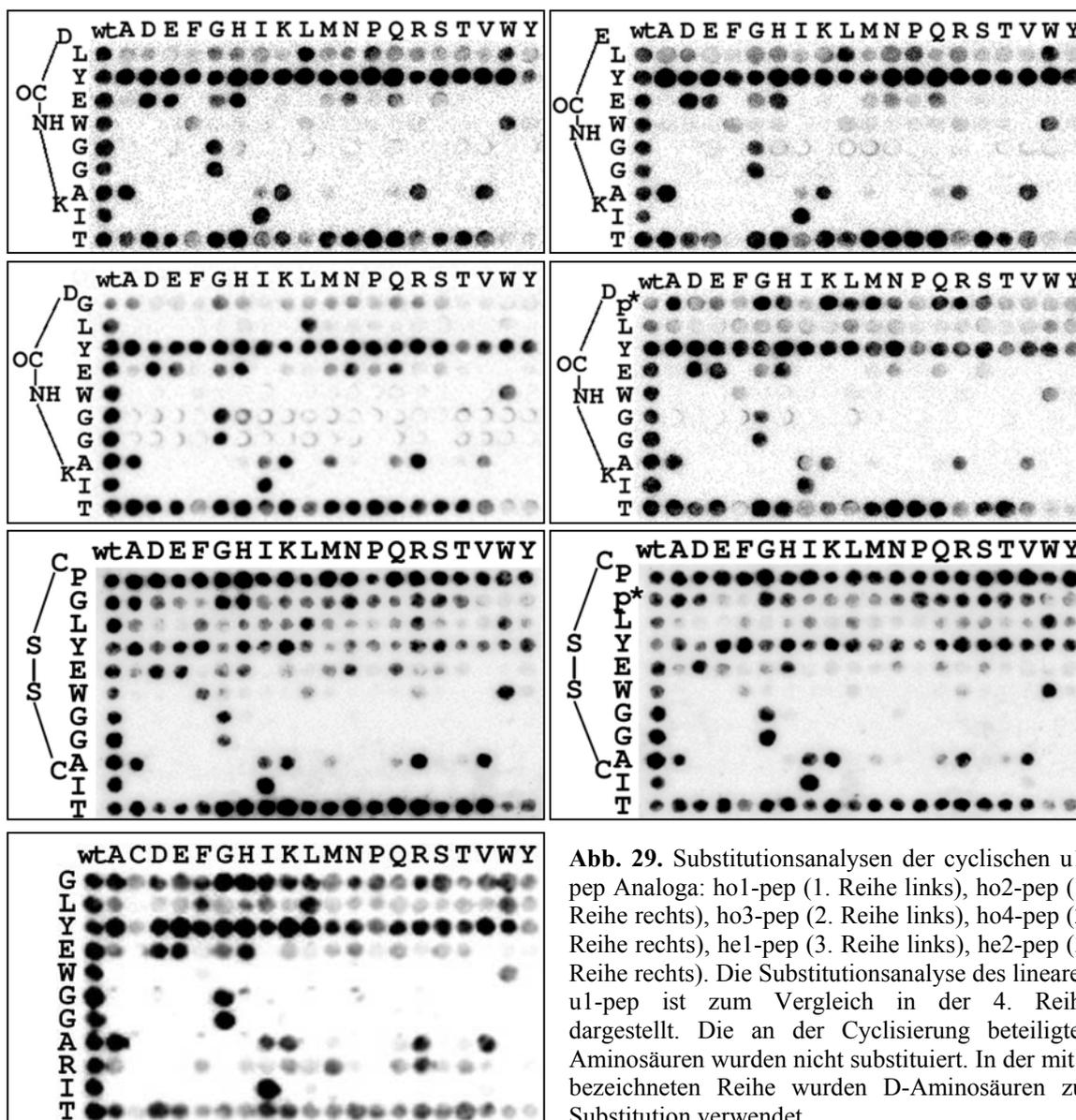


Abb. 29. Substitutionsanalysen der cyclischen u1-pep Analoga: ho1-pep (1. Reihe links), ho2-pep (1. Reihe rechts), ho3-pep (2. Reihe links), ho4-pep (2. Reihe rechts), he1-pep (3. Reihe links), he2-pep (3. Reihe rechts). Die Substitutionsanalyse des linearen u1-pep ist zum Vergleich in der 4. Reihe dargestellt. Die an der Cyclisierung beteiligten Aminosäuren wurden nicht substituiert. In der mit * bezeichneten Reihe wurden D-Aminosäuren zur Substitution verwendet.

Peptid	IC ₅₀ (M)
Templat: GLYEWGGARIT	3×10^{-7}
<i>cyclo</i> (S _{γ1} -S _{γ11})-CPGLYEWGGACIT	2×10^{-7}
<i>cyclo</i> (S _{γ1} -S _{γ11})-CPpLYEWGGACIT	2×10^{-7}
<i>cyclo</i> (C _{γ1} -N _{ζ10})-DpLYEWGGAKIT	3×10^{-7}
<i>cyclo</i> (C _{γ1} -N _{ζ10})-DpLYEWGGVKIT	9×10^{-8}

Tab. 11.

Bindungsaffinitäten einiger cyclischer u1-pep Analoga zu CB4-1.

Verdrängungskonstanten wurden mit kompetitivem ELISA gegen p24 gemessen. Die Herstellung der löslichen Peptide erfolgte in der Arbeitsgruppe.

3. 7 Simulationen an cyclischen und linearen TE33-bindenden Peptiden

Wie die bisher beschriebenen Antikörper CB4-1 und tAb2 konnte auch für den murinen monoclonalen anti-Choleratoxinpeptid 3 (CTP3) Antikörper TE33 (Anglister et al., 1988) polyspezifisches Verhalten nachgewiesen werden. TE33 bindet auch, wie der anti-p24 Antikörper CB4-1, ein Peptid aus D-Aminosäuren (Kramer et al., 1998), aber im Gegensatz zu diesem ist das D-Epitop des TE33 sequenzverwandt zum Wildtyp-Epitop; daher kann in diesem Fall nicht eindeutig von Polyspezifität gesprochen werden. Aus zwei Phagenbibliotheken mit 9-meren Zufallspeptiden, wovon die eine zusätzlich flankierende Cysteine aufwies, wurden aber zwei Familien von linearen und cyclischen Peptiden identifiziert, die keine Sequenzähnlichkeit zum Wildtyp-Epitop aufweisen und zum Teil affiner als dieser an den Antikörper binden (Otte et al., 2000). Durch kompetitive Bindungsstudien mittels ELISA-Experimenten und Substitutionsanalysen auf Cellulosemembranen wurde nachgewiesen, daß diese neuen Peptidbinder ein völlig anderes Set an Schlüsselaminosäuren zur Bindung an den Antikörper benutzen. Aus der linearen Peptidbibliothek wurde das Konsensus-Motiv *GEFXYXXXQ[T(S)/L(I)]GXDP*A abgeleitet (variable Positionen sind mit X markiert und kursive Residuen bedeuten flankierende Positionen aus dem pVIII-Protein der verwendeten f1-Phagen). Für die Disulfid-cyclisierte Peptidfamilie ergab sich die Supertop-Sequenz *EFCXQXFN[T/S]PPXCGD*.

3. 7. 1 Bindungsmodus des Wildtyp-Epitops im Komplex mit TE33

Das minimale bindende Epitop des TE33-Antikörpers, das aus dem CTP3-Protein abgeleitet wurde, hat die Sequenz VPGSQHID. Von diesen Positionen kann nur das Isoleucin 7 gegen eine große Anzahl an Aminosäuren ausgetauscht werden; die übrigen Positionen sind allesamt „harte“ Schlüsselreste in dem Sinne, daß sie gegen keine anderen Aminosäuren, auch nicht gegen physikochemisch ähnliche, ohne Bindungsverlust ausgetauscht werden können (Abb. 30). In der Kristallstruktur des Komplexes mit dem Peptid VPGSQHIDSQKK (PDB Code 1tet) ist zu erkennen, daß das Peptid in einer schleifenförmigen Struktur in der Bindungstasche des Antikörpers liegt (Abb. 34). Zwischen Valin 1 und Serin 4 nimmt das Peptidrückgrat einen β -Turn des Typs IV an, durch einen ungewöhnlichen ψ -Winkel von ca. 3° bei Glutamin 5 ergibt sich ein weiterer Knick im Rückgrat, während der Rest des Peptids bis zum C-Terminus in einer nahezu völlig gestreckten Form vorliegt. Valin 1 kontaktiert mit je einer $C\gamma$ -Methylgruppe die hydrophoben Residuen Tyr 32L und Trp 100aH, es ist

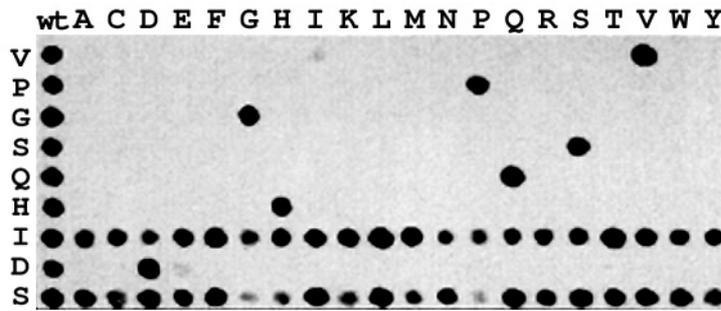


Abb. 30. Substitutionsanalyse des Minimaletops des Wildtyp-Binders von TE33 aus dem Cholera-Peptidtoxin 3. Deletion des C-terminalen Serins wird toleriert mit einer leichten Verringerung der Bindungsaffinität.

außerdem sterisch eingeschränkt durch das C-terminale Peptidteil, das sich ja auf den N-Terminus zurückfaltet. Prolin 2 und Glycin 3 ermöglichen den scharfen Turn im Rückgrat; sie sind durch die Seitenketten von His 31L, Ile 94L und Trp 50H so weit sterisch eingeschränkt, daß keine anderen Aminosäuren ihre Positionen einnehmen könnten. Das trifft besonders auf Glycin 2 zu, dessen Rückgratwinkel zwar auch für andere Aminosäuren erlaubt sind, dessen enger van-der-Waals-Kontakt des C α -Atoms mit Trp 50H an der Kontaktstelle zwischen den CDR:L1 und CDR:H2 aber den Besitz von Seitenketten verbietet. Die Hydroxylgruppe von Serin 4 weist in die Bindungstasche und etabliert eine H-Brückenbindung zum Carbonylatom von Ser 96H; die beiden Sauerstoffatome haben in der Kristallstruktur einen Abstand von 2,7 Å. Die Seitenkette von Glutamin 5 ist mit der Säureamid-Funktion in einer engen, polaren Einbuchtung zwischen den CDR:H1 und CDR:H2 begraben. Die Länge der Seitenkette scheint dabei entscheidend zu sein, da das um eine Methylengruppe kleinere Asparagin bei gleichem Seitenkettenkontakt die Peptidrückgratkonformation so weit stören würde, daß das folgende Histidin 6, das in einer schmalen hydrophoben Spalte zwischen Tyr 32H und Trp 100aH liegt, seinen Kontakt verlieren würde. Das sich anschließende Isoleucin, das als bindungsunwichtig bekannt ist, weist in die Lösungsumgebung. Die Carboxyfunktion des Aspartat 8 schließlich ist in einer markanten Salzbrücke mit der N ζ -Aminogruppe von Lys 50L verbunden. Beide Seitenketten sind in einer maximal gestreckten Konformation, eine Veränderung der Seitenkettenlänge durch Substitution mit Glutamat würde auch hier den idealen Kontakt stören.

Von den in der Kristallstruktur lokalisierbaren Wassermolekülen sind drei an der Bindung zwischen Peptid und Antikörper beteiligt. Die Carbonylatome von Prolin 2 und Glycin 3 sind mit je einem Wassermolekül im Abstand von 2,8 bzw. 3 Å koordiniert, die tief in der Bindungstasche fixiert sind, während die N-Atome des Rückgrates von Serin 4 und Glutamin 5 über ein Wassermolekül mit der Seitenkette von Asn 52H verbunden sind.

3. 7. 2 *Vorzugskonformation des lineares Phagenpeptids*

Die Substitutionsanalyse des aus der linearen Phagenbibliothek gewonnenen 15-meren Binders (Abb. 31) zeigt, daß die Schlüsselreste nahezu gleichmäßig mit Ausnahme der C-terminalen Positionen über die Peptidsequenz verteilt sind. Aus dem lineare Supertop wurde als stärkster Binder (mit 7×10^{-7} M) das 15-mere Peptid TEFVYQPWQTGFDPA (lin1-pep) entwickelt. Obwohl die vier C-terminalen Residuen unspezifisch in der Substitutionsanalyse erscheinen, führt ein Weglassen der Positionen zu erheblichem Bindeverlust (L. Otte, persönliche Mitteilung).

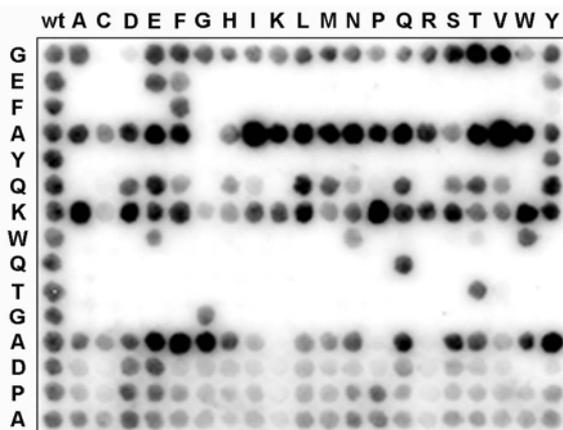


Abb. 31. Substitutionsanalyse des primären, aus der Phagenbibliothek gewonnenen linearen TE33-Binders GEFAYQKWQTGADPA. Aus diesem Peptid wurde das affiner bindende Motiv TEFVYQPWQTGFDPA abgeleitet, dessen Faltungssimulation in Abb. 32. gezeigt ist.

Die Faltungsuntersuchungen des lin1-pep, die mit einem identischem Protokoll wie bei den CB4-1 bindenden Transformationspeptiden, aber mit 10^8 Funktionsaufrufen durchgeführt wurden, resultierten in konvergenten Konformationsfamilien, zwei der fünf Simulationen führten sogar zu absolut identischen Strukturen bei den energietiefsten Lösungen (Abb. 32). In diesen nimmt das Rückgrat eine S-förmige Konformation von Threonin 1 bis Glycin 11 an mit einem Typ VIII- β -Turn zwischen Phenylalanin 3 und Glutamin 6 und einem doppelten (i,i+1)-Turn vom Typ III, die jeweils bei Glutamin 6 bzw. Prolin 7 beginnen. Der C-terminale Teil nach Glycin 11 ist gestreckt und faltet sich auf den N-Terminus zurück. Wie die große Anzahl hydrophober Aminosäuren, besonders aromatischer, bereits vermuten läßt, gibt es Cluster hydrophober Seitenketten. Eines umfaßt die beiden Proline sowie Phenylalanin 3 und Tryptophan 8, das andere Valin 4, Tyrosin 5 und Phenylalanin 12, wobei letzteres als zwischen beiden Clustern gelegen angesehen werden kann. Diese Arrangement findet sich in fast allen Niedrigenergie-Strukturen.

Es fällt bei dieser Konformation sofort ins Auge, daß fast alle bindungswichtigen Seitenketten tragenden Aminosäuren (Glutamat 2, Phenylalanin 3, Tyrosin 5, Tryptophan 8 bis Threonin 10) auf einer Fläche des Peptids liegen. Diese Fläche wird offensichtlich durch den gestreckten C-terminalen Teil stabilisiert.

Die Dockingsimulationen von lin1-pep an TE33 lieferten eine große Bandbreite an Konformationen und waren nicht konvergent. Auf eine vertiefte Analyse soll hier verzichtet werden. Von Interesse ist, daß stets ein großer Teil der Aminosäuren des Peptids in den Simulationen nicht in der Bindungstasche zwischen den CDR's lag und das Peptid häufig ein gestrecktes Rückgrat aufwies. Es ist allerdings unmöglich, das gestreckte Peptid vollständig in der Bindungstasche unterzubringen, da der Antikörper TE33 einen sehr kleinen Spalt zwischen den CDR's aufweist (mit einem Volumen von 785 \AA^3 im Gegensatz zu 1218 \AA^3 bei CB4-1 bzw. 1041 \AA^3 bei tAb2, berechnet mit dem Programm SURFNET (Laskowski, 1995; $0,8 \text{ \AA}$ Gitterweite, min./max. Kugelradius $1,4/5 \text{ \AA}$). Da aber die Schlüsselreste über die ganze Sequenz mit Ausnahme des C-terminalen Viertels verteilt sind, ist anzunehmen, daß

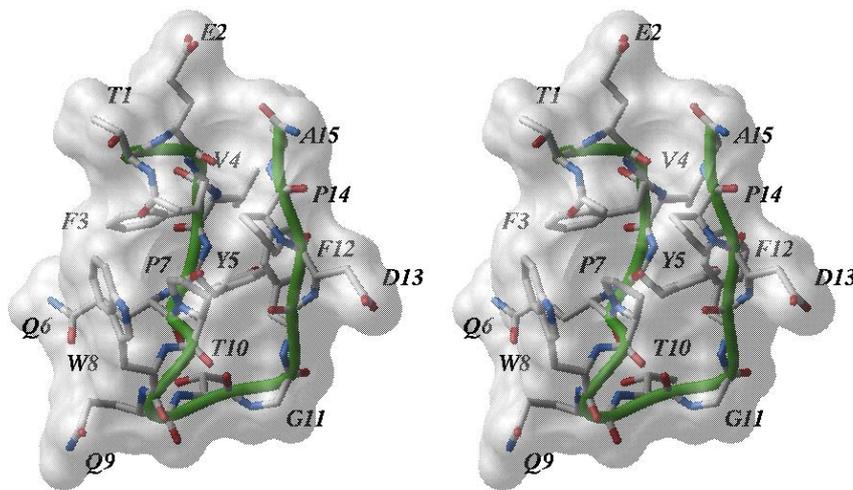


Abb. 32. Stereoabbildung der Faltungssimulation des linearen TE33-Binders TEFVYQPWQTGFDPA, der aus einer Phagenbibliothek ermittelt wurde. Ein Typ VIII-Turn erstreckt sich zwischen Phenylalanin 3 und Glutamin 6, ein doppelter Typ III-Turn zwischen Glutamin 6 und Glutamin 9 bzw. Prolin 7 und Threonin 10. Die bindungswichtigen Aminosäuren 8 bis 10 befinden sich in dieser Turn-Region. Der unspezifische C-terminale Abschnitt bildet eine stabilisierende Fläche über der N-terminalen Peptidhälfte, wo alle essentiellen Residuen konzentriert sind.

zumindest ein Teil dieser Schlüsselpositionen mit der intramolekularen Stabilisierung zu tun hat und das Peptid nicht in einer gestreckten, sondern kompakten Form bindet. Die Beobachtung, daß die Positionen 12 bis 15 bei der Faltung stabilisierend auf den Rest des freien Peptids wirken, fügt sich daher gut in diese Annahmen. Die Tatsache, daß bei N- oder C-terminaler Verkürzung die spezifische Bindung und kompetitive Inhibition rasch abnimmt, spricht außerdem dagegen, daß Teile des Peptids mit Aminosäuren außerhalb der aus den CDR's gebildeten Bindungstasche wechselwirken.

3. 7. 3 Vorhersage des Komplexes von TE33 mit dem cyclischen Phagenpeptid

cyclo(S_{γ1}-S_{γ11})-CNQLFNTPPSC (*cyc1-pep*)

Das mit einem K_D von 5×10^{-7} M um zwei Größenordnungen affiner als das lineare Wildtyp-Epitop-Peptid an den Antikörper bindende Disulfid-verbrückte Peptid *cyclo*(S_{γ3}-S_{γ13})-EFCNQLFNTPPSCGD konnte aus einer cyclischen Phagenbibliothek ermittelt werden, die

	<i>Hydrophob</i>	<i>Polar</i>
CDR:L1		
His 31 N _ε		Q3 N _ε
Asn 31d N _δ		S10 O
Tyr 32 O _η		C1 O, S10 O
CDR:L2		
Lys 50 N _ζ		S10 O _γ
CDR:L3		
Gly 91 O		N2 N _δ
Ile 94 N		Q3 O _ε
Phe 96	F5	
CDR:H1		
Thr 31 O		N6 N _δ , T7 O _γ
Tyr 32	T7 C _γ	
Gly 33	F5	
CDR:H2		
Trp 50	F5	
Asn 52 N _δ		N6 O _δ
CDR:H3		
Arg 95 N _ε		N2 O _δ
Arg 95	F5	
Trp 100a	T7 C _γ , P9	
Trp 100a N _ε		P8 O

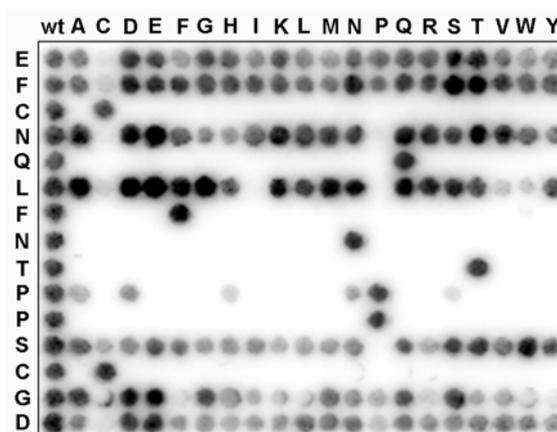


Abb. 33. (oben) Substitutionsanalyse des cyclischen TE33-Binders *cyc1-pep* (langes Epitop). Die zwei außerhalb des Cyclus liegenden N- und C-terminalen Aminosäuren können ohne größere Verluste an Bindungsaffinität weggelassen werden.

Tab. 11. (links) Kontakte von *cyc1-pep* zur hypervariablen Region von TE33 in der gedockten Struktur.

mehr als 10^7 unterschiedliche Sequenzen enthielt. Das Weglassen der nicht in den Cyclus einbezogenen N- und C-terminalen Aminosäuren senkt die Affinität zwar auf 1×10^{-6} M, damit ist das minimale cyclische Epitop *cyclo*-(S_{γ1}-S_{γ11})-CNQLFNTPPSC (*cyc1-pep*) aber immer noch 10-50 mal besser bindend als das lineare Minimalepitop VPGSQHID (Otte et al., 2000).

Von den 11 Aminosäuren des *cyc1-pep* sind bis auf Asparagin 2, Leucin 4 und Serin 10 alle „harte“ Schlüsselaminosäuren. Die Sequenz zeigt keine Ähnlichkeit mit der des linearen Wildtyp-Epitops und nur eine sehr schwache zum *lin1-pep* (X₄FNTX₄ vs. X₇WQTX₅ bei *lin1-pep*, W und Q sind konservative Austausche gegenüber F und N). Diese

beiden Triplets sind aber auch jeweils absolut essentielle Schlüsselresiduen in den jeweiligen Peptiden, die auch nicht konservativ ausgetauscht werden können (Abb. 31 und 33).

Bei den Konformationssuche-Simulationen in Gegenwart der Antikörper-Potentiale wurde wie bereits beschrieben vorgegangen. Von fünf Docking-Versuchen zeigten zwei strukturelle und energetische Konvergenz mit großen Abweichungen der Simulationsenergie zu den nichtkonvergenten Rechnungen, bei denen aber auch Strukturen vorkommen, die in der Rückgratkonformation der konvergenten Strukturfamilie entsprechen (Abb. 35 und 36).

Eine sehr überraschende Eigenschaft der gedockten Struktur von *cyc1-pep* ist, daß trotz der nicht vorhandenen Sequenzähnlichkeit zum Wildtyp-Peptid die Rückgratkonformationen beider Peptide im Komplex sehr ähnlich sind (Abb. 34). Die Schweratome des Rückgrates haben eine RMSD-Abweichung von 2,8 Å auf eine Länge von 9 Aminosäuren. Wie auch das *wt*-Peptid nimmt das *cyc1-pep* eine schleifenförmige Konformation in der Bindungstasche des Antikörpers ein; der räumliche Abstand der endständigen Aminosäuren in VPGSQHIDS entspricht dabei völlig der Länge der beiden verbrückten Cystin-Aminosäuren im *cyc1-pep*.

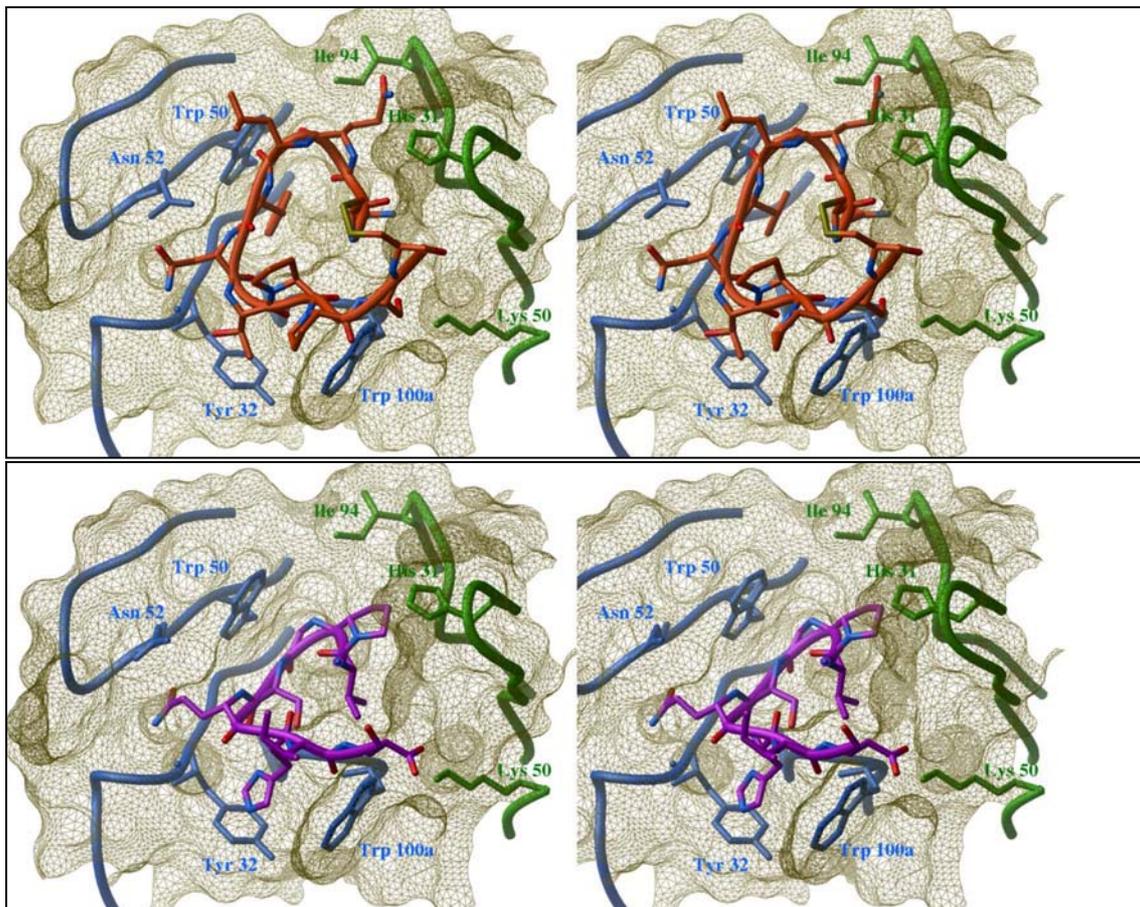


Abb. 34. Stereoabbildung: Gedockte Struktur von *cyc1-pep* an TE33 (oben) im Vergleich zum Komplex des Antikörpers mit dem Wildtyp-Peptid VPGSQHID (PDB Code 1tet). Der Antikörper ist als Conolly-Oberfläche dargestellt mit den Kontaktresiduen der leichten Kette in grün und der schweren Kette in blau. Termini sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt, vom Wildtyp-Peptid ist nur das Minimalepeptid abgebildet.

Asparagin 2 liegt mit seiner Seitenkette in ähnlicher räumlicher Umgebung wie Valin 1 im wt-Peptid. Während seine polare Wechselwirkungen entsprechend der Substitutionsanalyse nicht bindungswichtig sind, ist das bei Glutamin 3 der Fall. In der gedockten Struktur liegt dessen Seitenkette sehr ähnlich wie Prolin 2 im wt-Peptid, macht aber im Gegensatz zu diesem polare Kontakte in einer schmalen Spalte zwischen den CDR:L1 und CDR:L3 (Tab. 11). Die Spalte wird einerseits gesäumt von den Rückgrat-Atomen von Gly 91L bis Ile 94L und andererseits von der Seitenkette von His 31L. Das folgende Leucin 4 zeigt die stärkste Abweichung von Rückgratstruktur des wt-Epitops, denn im Gegensatz zu seinem Pendant, Glycin 3, ist das Rückgrat nicht in der Bindungstasche vergraben und die Seitenkette ist

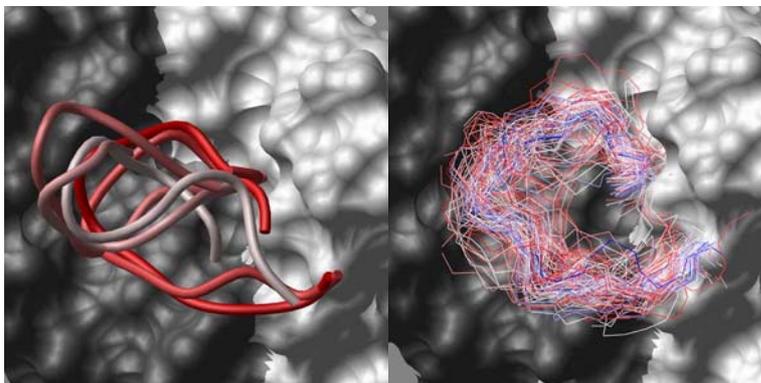
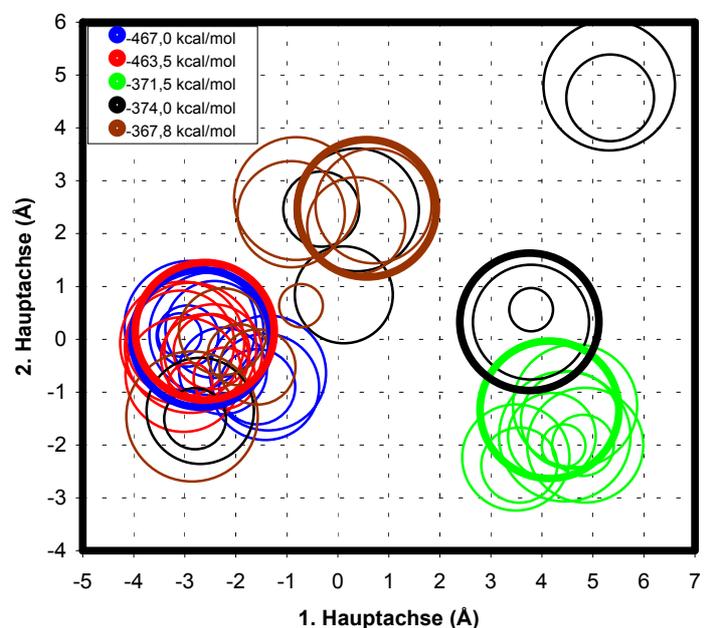


Abb. 35. Links: Tiefstenergie-Strukturen aus fünf unabhängigen, von Zufallskonformationen ausgehenden Docking-Simulationen von cycl-pep an TE33. Zwei der Simulationen sind strukturell konvergent. Rechts: Konformationsfamilie einer konvergenten Simulation. 100 Rückgrat-Strukturen des Konformationsstapel sind von blau (tiefste Energie) über weiß nach rot (höchste Energie) dargestellt. Die leichte Kette von TE33 erscheint weiß, die schwere grau.

Abb. 36. Strukturelle Konvergenz der Docking-Simulationen des cycl-pep an TE33. Ähnlich wie in Abb. 23 sind die statischen RMSD-Werte der Peptidrückgrate von den 10 energetiefsten Konformationen einer Simulation als Koordinaten im Raum zweier Prinzipalkomponenten dargestellt. Jeder Kreis repräsentiert eine Konformation, die Fläche korrespondiert dabei mit dem Betrag der Energie (relativ innerhalb einer Simulation), in der Legende ist die Simulationsenergie der jeweils besten Lösung gegeben (dicke Linie). Zwei der Simulationen (blau und rot) konvergierten strukturell und sind auch energetisch auf einem tieferen Niveau als die anderen Rechnungen, unter denen es aber auch Strukturen aus der konvergenten Konformationsfamilien gibt.



exponiert an der Oberfläche. Übereinstimmend damit ist die Unwichtigkeit des Leucins für die Bindungsaffinität. An der Position des Glycin-Rückgrats im linearen wt-Epitop aber findet sich in der gedockten cycl-pep-Struktur die aromatische Seitenkette des anschließenden Phenylalanins 5. Sie füllt völlig den engen Zwischenraum zwischen den Loops von CDR:H1 und CDR:H3 und zeigt einen ausgeprägten hydrophoben Kontakt zu Tryptophan 50. Diesen

Raum konnte im wt-Peptid nur das Glycin-Rückgrat und ein Wassermolekül füllen, da auf Grund anderer spezifischer Kontakte der restlichen Peptidkomponenten das Rückgrat an dieser Stelle entlangführen mußte; eine zusätzliche Seitenkette wäre daher im wt-Peptid störend. Wie auch Glycin im wt-Epitop ist die Seitenkette von Phenylalanin 5 im cycl-pep absolut unersetzlich, wie auch das sequentiell folgend Asparagin 6. Dieses hat trotz einer kürzeren Seitenkette die identischen polaren Kontakte wie Glutamin 5 im wt-Peptid. Das ist möglich, da das Rückgrat von cycl-pep an dieser Stelle im Vergleich zum wt-Peptid geweitet ist und zwar fast genau um die Länge einer Methylengruppe. Das folgende Threonin 7 ist ebenso wichtig für die Bindung. Die endständige Hydroxylgruppe baut eine H-Brückenbindung zum Carbonylatom von Thr 31 auf und ist damit in das polare Wechselwirkungsnetzwerk von Asparagin 6 einbezogen. Gleichzeitig interagiert die C γ -Methylgruppe mit den aromatischen Systemen von Tyr 32H und Trp 100aH. Diese doppelte polar-hydrophobe Wechselwirkung könnte erklären, warum Threonin nicht gegen andere Residuen austauschbar ist. Mit demselben Tryptophan der schweren Kette wechselwirkt auch das folgende Prolin 8, das mit dem nachfolgenden Prolin 9 ein kurzes Stück einer Polyprolin II-Helix (PPII-Helix) bildet. Die Polyprolin-Tryptophan-Wechselwirkung ist sehr spezifisch und häufig in der Natur anzutreffen, vor allem bei kleinen Proteindomänen, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, wie etwa WW- und SH3-Domänen (Kay et al., 2000). In der gedockten cycl-pep-Struktur ist Prolin 8 in einer relativen räumlichen Lage zu der Seitenkette von Trp 100aH, die zu einem statistisch signifikanten Cluster von Prolin-Tryptophan-Interaktionen gehört (Cluster 1 im „Atlas of Protein Side-Chain Interactions“ (Singh et al., 1992), <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/sidechains/index.html>, mit 10,84-facher Standardabweichung bei der Packungsgeometrie).

3. 7. 4 Kritischer Vergleich mit abgeleiteten TE33-bindenden linearen und cyclischen Peptiden

3. 7. 4. 1 Längenanalysen von cycl-pep, dessen linearisierter Variante und einem Hybridpeptid aus cycl-pep und dem Wildtyp-Peptid

Wie Abb. 33 zeigt, sind für die originale Variante des cycl-pep aus der Phagenbibliothek, wo außerhalb des eigentlichen Cyclus noch je zwei Aminosäuren N- und C-terminal sich befinden, die beiden Cysteine bindungswichtig und damit eine Cyclisierung unabdingbar.

Kürzt man jedoch das Peptid um diese außercyclischen Residuen, so ist eine Stabilisierung der Konformation durch Cyclisierung nicht mehr unbedingt nötig, wie Bindungsstudien an einer linearisierten Variante zeigen (Abb. 37, rechtes Bild, linke Spalte). Hier wurden die Cystein-Residuen durch das isosterische, nicht zur Oxidation fähige Serin ersetzt. Die Bindungsaffinität ist entsprechend der Lumineszenz-Stärke des Signals als vergleichbar mit der des cycl-pep anzusehen. In der originalen, längeren Sequenz des cycl-pep können bei fehlender Cyclisierung die zusätzlichen vier Aminosäuren Kontakte eingehen, die zu einer Verzerrung der bindenden Konformation führen würden oder es können sterische Hindernisse in der sehr kleinen Bindungstasche auftreten, woraus sich letztlich die Wichtigkeit der Verbrückung bei diesem Peptid ergibt.

Sowohl von dem verkürzten cycl-pep als auch von seiner linearisierten Variante wurden Längenanalysen durchgeführt, wobei systematisch N- bzw. C-terminal Residuen in der Sequenz weggelassen wurden (Abb. 37). Beide Analysen zeigen übereinstimmend, daß das Minimalepitop, das noch Bindungsaffinität aufweist, die Sequenz **QLFNTPP** hat. Für die Bindung dieser Minimalsequenz ist eine Cyclisierung über N- und C-terminal zugefügte

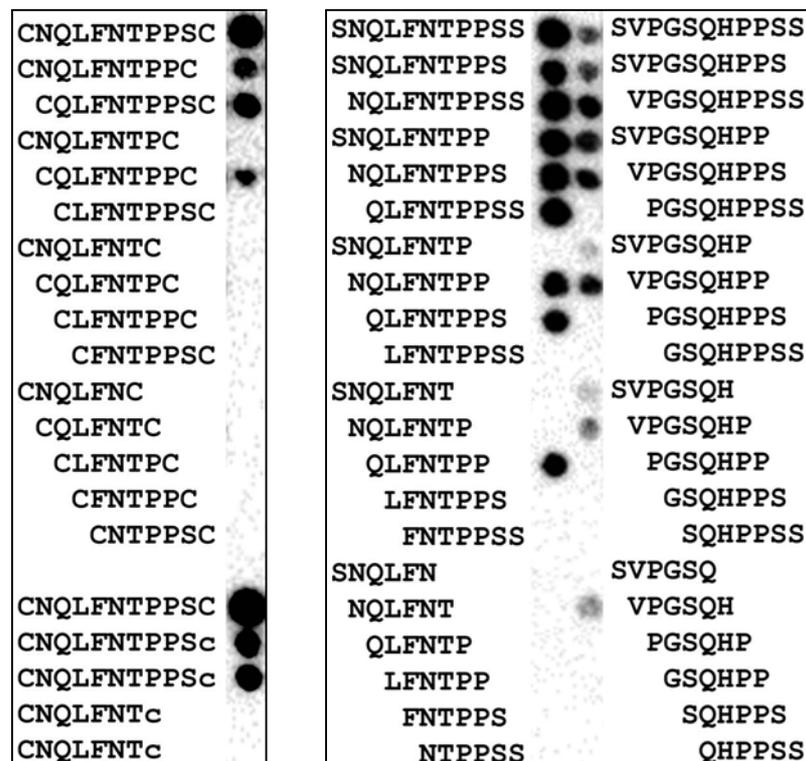


Abb. 37. Längenanalysen von cycl-pep und vom Wildtyp-Peptid und cycl-pep abgeleiteter linearen Varianten. Linkes Bild: Längenanalyse von *cyclo*-(S₇₁-S₇₁₁)CNQLFNTPPSC (cycl-pep). Alle verkürzten Peptide sind Disulfid-verbrückt. Außerdem sind C-terminale D-Cystein-Varianten von cycl-pep und einem verkürzten cycl-pep gezeigt (linkes Bild unten). Rechtes Bild: Längenanalysen der linearisierten cycl-pep Variante, wo Cystein durch das isosterische Serin ersetzt wurde (linke Spalte) und der aus der cycl-pep Sequenz und der Wildtyp-Sequenz zusammengesetzten linearen wt-Hybride (rechte Spalte).

Cysteine sogar abträglich. Absolut wichtig für die Bindung sind aber beide C-terminalen Proline. Deren Wechselwirkungen können bei Fehlen der Proline nicht durch eine die Konformation stabilisierende Cyclisierung kompensiert werden, weder mit L- noch mit D-Cystein.

Im linearen Wildtyp-Epitopeptid wird eine gestreckte Konformation im C-terminalen Teil durch eine Salzbrücke von Aspartat 8 mit Lys 50L stabilisiert (Abb. 34), entsprechend stellt sich dessen Wichtigkeit in der Substitutionsanalyse dar (Abb. 30). Um zu untersuchen, ob man diesen Effekt auch wie im *cyc1-pep* bzw. dessen linearisierter Variante durch zwei aufeinanderfolgende Proline erreichen kann, wurde die Sequenz VPGSQH (die praktisch nicht bindet) auf die *cyc1-pep* Sequenz projiziert. Die Bindungsstudien der resultierenden Sequenzen SVPGSQHPPSS bzw. *cyclo*-(S_{γ1}-S_{γ11})CVPGSQHPPSC (siehe unten) zeigen, daß diese in der Tat binden. Zumindest in der linearen Mischsequenz führt eine Verkürzung, besonders N-terminal, zu einer erhöhten Bindungsaffinität (Abb. 37), wie man das aus sterischen Gründen auch erwarten könnte (Abb. 35). Die Sequenz VPGSQHPP bindet deutlich besser an TE33 als N-terminal verlängerte bzw. C-terminal verkürzte Sequenzen.

3. 7. 4. 2 Substitutionsanalysen von linearisierten und cyclischen *cyc1-pep* und Wildtyp-Varianten

SNQLFNTPPSS

Die Substitutionsanalyse des linearisierten *cyc1-pep* (Abb. 38) zeigt, daß sich das Muster der bindungswichtigen Aminosäuren im Vergleich zur originalen Sequenz des *cyc1-pep* (Abb. 33) leicht verändert. Während Glutamin 3, Phenylalanin 5, Asparagin 6 und Prolin 9 auch weiterhin sich als „harte“ Schlüsselresiduen erweisen, kann Threonin 7 jetzt auch durch

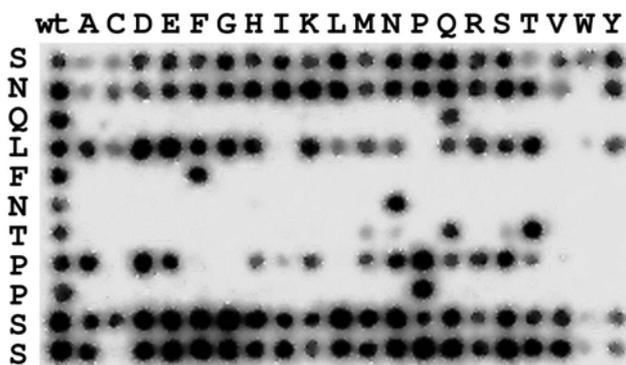


Abb. 38. Substitutionsanalyse des linearisierten *cyc1-pep*. Die N- und C-terminalen Cysteine von *cyc1-pep* wurden durch die isosterischen Serine ersetzt.

Glutamin ersetzt werden. Die weitestgehende Veränderung erfährt aber Position 8. Mit Prolin an dieser Stelle hat das Peptid zwar immer noch die stärkste Bindung, kann jetzt aber auch gut mit Asparagin, Serin, Alanin und mit sauren Aminosäuren substituiert werden, weniger gut auch mit einer Reihe weiterer Aminosäuren. Sehr bemerkenswert erscheinen die N- und C-terminalen Positionen des Peptids: Ohne Cyclisierung wirkt sich Cystein hier als nahezu einzige Aminosäure sehr nachteilig auf die Bindungsstärke aus. Besonders in der C-terminalen Position ist Cystein in seiner reduzierten Form dem Anschein der Substitutionsanalyse nach nicht erlaubt.

cyclo-(S_{γ1}-S_{γ11})CVPGSQHPPSC und SVPGSQHPPSS

Die linearen und cyclischen Hybridpeptide, bei denen ein Teil der Wildtyp-Sequenz auf die cycl1-pep Sequenz projiziert wurde, binden ebenfalls an den Antikörper TE33, wobei die Längenanalyse des linearen Hybrids ein Minimalepitop VPGSQHPP ausweist. Hier fehlt das für die Bindung des Wildtyp-Peptids wichtige Aspartat, und die Substitutionsanalyse des wt-Peptids (Abb. 30) läßt vermuten, daß dieses neue Minimalepitop gar nicht vom Antikörper erkannt werden würde. Der simultane Austausch der beiden endständigen Aminosäuren Isoleucin und Aspartat gegen Prolin führt aber dennoch zu einer Bindung. Die Substitutionsanalysen der cyclischen und linearen Hybridsequenzen zeigen aber, daß die Proline im Gegensatz zu den cycl1-pep Varianten nicht spezifisch an der Bindung beteiligt sind, sondern daß hier vielmehr ein Längeneffekt vorliegt. Interessanterweise sind basische Aminosäuren C-terminal für die Bindungsaffinität abträglich (im linearen Hybrid mehr), was auf eine zum wt-Peptid sehr ähnliche Bindekonformation hinweist (elektrostatische

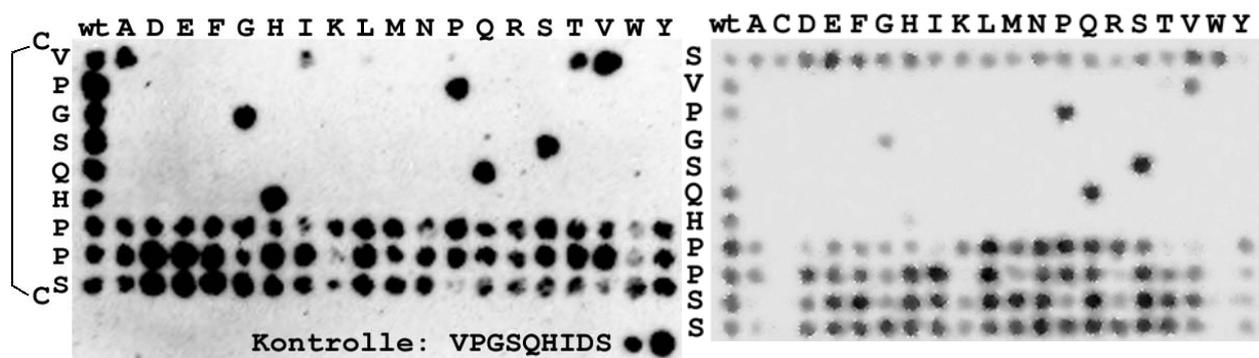


Abb. 39. Substitutionsanalysen von Mischpeptiden aus den Sequenzen von cycl1-pep und Wildtyppeptid. Links: Substitutionsanalyse des durch Projektion der Sequenz VPGSQH auf die cycl1-pep Sequenz entstandenen cyclischen Hybrids *cyclo-(S_{γ1}-S_{γ11})CVPGSQHPPSC*. Die Cysteine wurden nicht substituiert. Rechts: Substitutionsanalyse der linearisierten Hybrid-Variante.

Abstoßung zum Lys 50L). Bei dem cyclischen Hybridpeptid kann an erster Position nach dem N-terminalen Cystein jetzt nicht nur Valin, sondern auch Alanin und m. E. auch Threonin sein. Hier haben entweder leichte Veränderungen der Gesamtkonformation bzw. der Bindungstaschengeometrie stattgefunden oder sterische Faktoren verändern die Spezifität. Die Unspezifität der Prolin-Positionen im Gegensatz zu deren Spezifität im *cycl1-pep* ist möglicherweise durch sehr feine Unterschiede in der Konformation des Peptidrückgrates gegeben. Diese ist zwar ähnlich in beiden Peptiden, aber nicht identisch. Die Abweichung der Rückgratatom im Abschnitt Prolin 8/Prolin 9 im Modell des gedockten *cycl1-pep* und Isoleucin 7/Aspartat 8 im wt-Peptid der Kristallstruktur beträgt 1,9 Å. Das hat zur Folge, daß das Carbonylatom von Isoleucin 7 eine H-Brückenbindung zum N ϵ -Atom im Indolring des Trp 100Ha etabliert, daß aber eine solche Wechselwirkung im *cycl1-pep* nicht beobachtet werden kann. Entsprechend könnte die Spezifität der Proline im cyclisierten wt-Hybridpeptid verloren gehen, wenn die Wechselwirkung mit dem Rückgrat wichtiger wird.

Bei Annahme der generellen Stimmigkeit der gedockten Struktur des *cycl1-pep* im Komplex mit TE33 zeigt die Unterschiedlichkeit der Prolin-Spezifität, daß die Bindekonformation und die Spezifität der einzelnen Aminosäuren sehr sensitiv ist gegenüber kleinen Veränderungen. Sowohl Längenänderungen als auch multiple Austausche sind sehr schwierig einzuschätzen in Hinsicht auf sterische, entropische und enthalpische Folgen für das Bindeereignis.

cyclo-(S γ_1 -S γ_8)CVPGSQHc und cyclo-(N α -C δ_7)VPGSQHe

Zur Untersuchung, ob eine Wechselwirkung des cyclisierten wt-Peptides mit dem CDR:H3 des Antikörpers wirklich notwendig für eine Bindung ist, wurde die Sequenz innerhalb des Cyclus verkürzt, und zwar bis auf die nicht austauschbaren Residuen (VPGSQH). Diese verkürzten cyclischen Peptidderivate wurden, mit dem wt-Peptid der Kristallstruktur als Templat, im Computer modelliert (wie für die cyclischen Varianten des *u1-pep* bereits beschrieben), wobei eingeschätzt wurde, daß, eine identische Struktur der identischen Aminosäuren vorausgesetzt, L-Aminosäuren als C-terminale Cyclisierungspartner ungeeignet seien, da die Seitenketten nicht zu den N-terminalen Partner gerichtet sein würden. Deshalb wurden zwei Modelle generiert, die D-Aminosäuren am C-Terminus plazierten, zum einen D-Cystein für eine Disulfidverbrückung und zum anderen D-Glutamat für eine Lactambindung zum N-Terminus.

Auch diese beiden Minimalcyclen binden an TE33, das Disulfid-verbrückte Peptid aber sehr viel schwächer als das wt-Peptid oder das *cycl1-pep*. Diese beiden Cyclen sind jetzt sehr kleine Peptide, die ausschließlich hochspezifische Positionen besitzen. Interessant ist aber

auch hier die Position 1, die bereits im oben beschriebenen cyclischen wt-Derivat Veränderungen zeigte, indem sie auch Alanin zuließ. Hier nun ist Alanin wiederum nicht erlaubt, aber im Disulfid-Cyclus können Isoleucin und Prolin das native Valin gleichwertig ersetzen. In dem Lactam-cyclischen Peptid sind Isoleucin und auch Lysin zulässig. Dies sind wiederum Hinweise darauf, daß sich die Konformationen der beiden Minimalcyclen sowohl von dem linearen wt-Epitop als auch untereinander leicht unterscheiden. Denkbar ist aber auch, daß die verschiedenen sterischen Anforderungen der unterschiedlichen Linkerregionen für die veränderten Substitutionsmuster an der ersten Position verantwortlich sind.

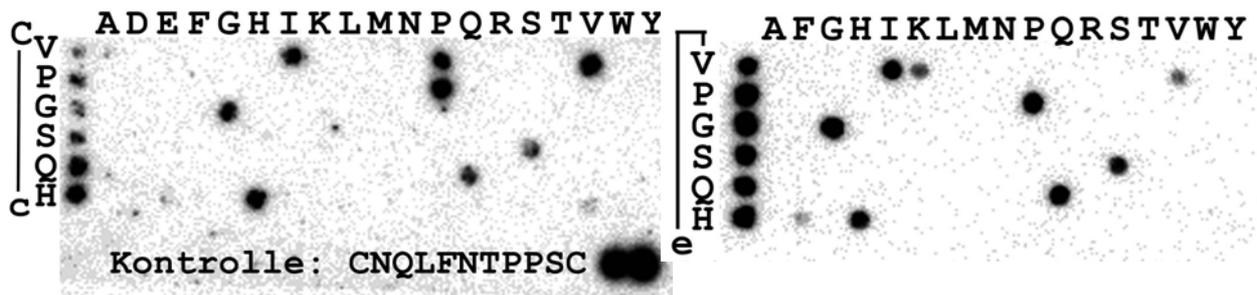


Abb. 40. Substitutionsanalysen von *cyclo*-(S γ ₁-S γ ₈)CVPGSQHc (links) und *cyclo*-(N α -C δ ₇)VPGSQHc (rechts). Für die Substitutionen des Lactamcyclus wurden Aspartat und Glutamat weggelassen, um konkurrierende Cyclisierungen zu vermeiden.

Die gezeigten Beispiele von rational abgeleiteten TE33-bindenden Peptiden verdeutlichen erneut, daß die Definition eines Epitops nicht eindeutig sein kann. Multiple Aminosäureaustausche als auch die Erzwingung einer bestimmten Ausgangskonformation können bis auf einen Satz von minimal notwendigen Residuen die Austauschbarkeitsmuster entlang einzelner Epitopsequenzen dramatisch verändern. So können Hybridsequenzen zweier nicht verwandter Epitoppeptide binden, obwohl deren Substitutionsanalysen dies dem Anschein nach verbieten; die Konformationsvorbildung kann den Wegfall ansonsten essentieller Positionen gestatten. Obwohl die gezeigten Hybridsequenzen im Vergleich zu den Ausgangssequenzen zum Teil verschiedene Spezifitäten in identischen Positionen aufweisen, kann dies nicht als Nachweis einer generell anderen Konformation gesehen werden. Umgekehrt kann die Bindung der Hybridsequenzen an den Antikörper nicht als Nachweis für die Stimmigkeit des vorgestellten cycl-pep Komplexmodells gesehen werden, das eine ähnliche Gesamtkonformation wie die des Wildtyp-Peptids vorschlägt.