

Effiziente Konformationsanalyse von Peptiden

Dissertation

Der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vorgelegt von

Eckhart W. Guthöhrlein

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Erster Gutachter: Prof. Dr. N. Sewald

Zweiter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. F. Kummert

Eingereicht am 28. März 2006.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 2006

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Norbert Sewald an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt. Ich danke Herrn Professor Sewald herzlich für die Betreuung während der vergangenen Jahre, sein stets offenes Ohr und seine Geduld auch in fachlich und menschlich schwierigen Phasen.

Herrn Professor Dr.-Ing. Franz Kummert danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitbegutachtung.

Herrn Thomas Huber gebührt mein besonderer Dank für zahllose fachbezogene und fachfremde Gespräche, die Durchführung der NMR-Messungen, das Korrekturlesen dieser Arbeit, die außergewöhnliche Atmosphäre in unserem Büro und nicht zuletzt für die Einblicke in die ostwestfälische Mentalität, welche er einem Hamburger Jung zuteil werden ließ.

Für die wissenschaftliche Zusammenarbeit danke ich Herrn Dr. Miroslav Malešević und Frau Sylwia Urman bei der Untersuchung der Cyclopeptide mit β -Homoamino-säuren sowie Herrn Dr. Dirk Bächle und Herrn Marco Wißbrock auf dem Gebiet der glykomimetischen Peptide.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Philippe Hünenberger an der ETH Zürich, insbesondere Herrn Vincent Kräutler, für die Ermöglichung des sehr lehrreichen einwöchigen Gastaufenthaltes, die Starthilfe bei der Durchführung von MD-Simulationen mit GROMOS und die Aufgeschlossenheit für meine Bedürfnisse im Zuge der Entwicklung des Torsionswinkelclusterings.

Für finanzielle Unterstützung während der ersten drei Jahre des Projekts danke ich der International NRW Graduate School in Bioinformatics and Genome Research, für die problemlose Anschlussfinanzierung der International Graduate School of Chemistry and Biochemistry Bielefeld.

Allen meinen Kollegen danke ich für das ganz besondere Arbeitsklima, das unsere Arbeitsgruppe auszeichnet.

Mit meinen Eltern fing alles an, und so gilt mein letzter und größter Dank ihnen für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Verständnis in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Peptide	3
2.1.1	Die Peptidbindung	4
2.1.2	Strukturelemente von Peptiden	5
2.1.3	β -Aminosäuren und β -Peptide	11
2.2	<i>Molecular Modeling</i>	16
2.2.1	<i>Modeling</i> in der pharmazeutischen Forschung	16
2.2.2	Molekülmechanik und -dynamik	20
2.3	NMR-Spektroskopie	34
2.3.1	Grundlagen	35
2.3.2	Impulsverfahren	39
2.3.3	Zweidimensionale NMR-Spektroskopie	41
3	Methodik der Konformationsanalyse	45
3.1	Zielsetzung	45
3.2	Konformationsrelevante Parameter	47
3.2.1	Resonanzfrequenzen	47
3.2.2	Temperaturgradient der Amidprotonen	48
3.2.3	Vicinale Kopplungskonstanten	49
3.2.4	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>	50
3.3	Generierung der Startstruktur	55
3.3.1	Systematische Suche	55
3.3.2	Distanzgeometrie	56
3.3.3	<i>Simulated Annealing</i>	57
3.4	Strategie der Konformationsanalyse	57
3.5	Torsionswinkelclustering	59
3.5.1	Vorüberlegungen	59
3.5.2	Das Paket TORCL	60
3.5.3	<code>property_cluster</code>	61
3.6	Validierung	65
3.6.1	RGD-Peptide	65

3.6.2	KDK-Peptide	71
3.7	Zusammenfassung	78
3.8	Experimenteller Teil	79
3.8.1	DG	79
3.8.2	RMD	79
3.8.3	FMD	80
3.8.4	Analyse	80
3.8.5	Sonstiges	81
4	Peptide als Glykomimetika	83
4.1	Das L2/HNK-1-Epitop	83
4.1.1	Struktur	83
4.1.2	Funktion	85
4.1.3	Molekulare Interaktionen	86
4.2	Mimikry von Kohlenhydraten durch Peptide	87
4.3	Ausgangsbasis und Zielsetzung der Untersuchungen	90
4.4	Ergebnisse der Konformationsstudien	91
4.4.1	cyclo(-Leu-Ser-Glu-Thr-Thr-D-Leu-) 6	91
4.4.2	cyclo(-Arg-Thr-Leu-Pro-Phe-Ser-) 7	95
4.5	Diskussion	106
4.6	Experimenteller Teil	108
5	Cyclopeptide mit β-Homoaminosäuren als Integrinliganden	113
5.1	β -Aminosäuren in cyclischen Peptiden	113
5.2	Integrine	119
5.2.1	Struktur und Funktion	119
5.2.2	Signalübertragung und Aktivierung	122
5.2.3	Erkennungssequenzen	124
5.2.4	$\alpha_4\beta_1$ und VCAM-1	125
5.3	Zielsetzung	127
5.4	Ergebnisse der Konformationsanalyse	127
5.4.1	cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-) 8	127
5.4.2	cyclo(-Ser-Pro-Leu- β^h Asn-Asp-) 9	133
5.4.3	cyclo(-Ser-Pro-Leu-Asn-Val-Asp-) 10	138
5.4.4	cyclo(-Ser- β^h Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) 11	149
5.4.5	cyclo(- β^h Ser-Pro-Leu- β^h Asn-Ile-Asp-) 12	154
5.4.6	cyclo(-Val- β^h Ala-Phe-Leu-Ile-) 13	159
5.5	Diskussion	163
5.5.1	Mimikry von VCAM-1	163
5.5.2	Einfluss der Strukturbildner	165

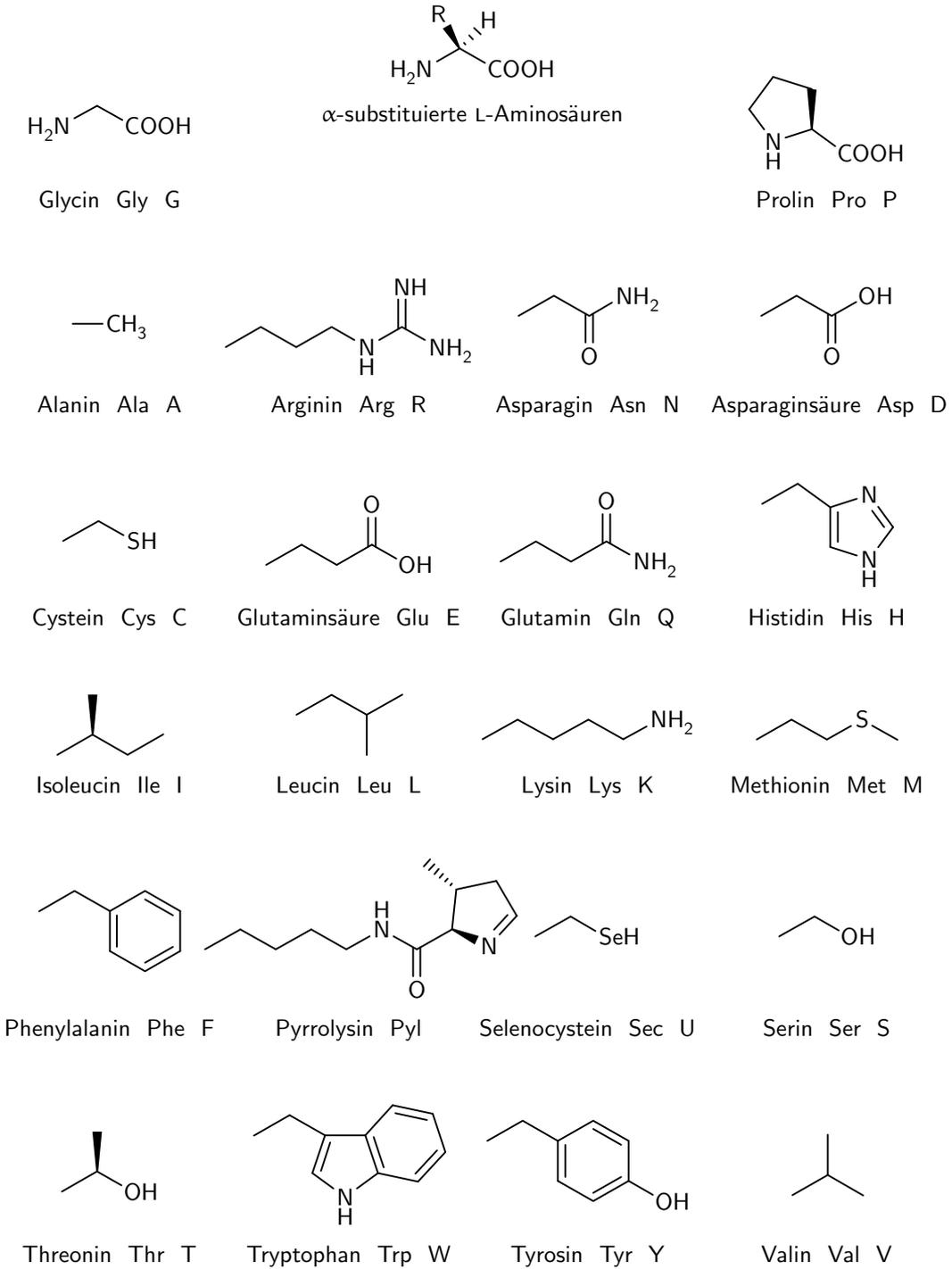
5.6 Experimenteller Teil	168
6 Zusammenfassung	177
Literaturverzeichnis	183

Abkürzungsverzeichnis

ACHC.....	Aminocyclohexancarbonsäure
ACPC.....	Aminocyclopentancarbonsäure
ADMET.....	<i>adsorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity</i>
AMBER.....	<i>assisted model building with energy refinement</i>
AS.....	Aminosäure
ATP.....	Adenosintriphosphat
CADD.....	<i>computer-aided drug design</i>
CAM.....	<i>cell adhesion molecule</i>
CD.....	Circulardichroismus
CFE.....	<i>consistent force field</i>
CHARMM...	<i>chemistry at Harvard molecular mechanics</i>
CNS.....	<i>central nervous system</i>
COSY.....	<i>correlated spectroscopy</i>
CSD.....	<i>Cambridge structural database</i>
CVFF.....	<i>consistent valence force field</i>
DG.....	Distanzgeometrie
DIPSI.....	<i>decoupling in the presence of scalar interactions</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DQF.....	<i>double quantum filtered</i>
ECM.....	<i>extracellular matrix</i>
EGF.....	<i>epidermal growth factor</i>
ETH.....	Eidgenössische Technische Hochschule
FID.....	<i>free induction decay</i>
FMD.....	freie Moleküldynamik
FTIR.....	<i>Fourier transform infrared</i>
GROMOS....	<i>Groningen molecular simulation</i>
HCMV.....	humanes Cytomegalovirus
HIV.....	humanes Immundefizienzvirus
HMBC.....	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC.....	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HNK.....	<i>human natural killer</i>
HSQC.....	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HTS.....	<i>high throughput screening</i>
IBM.....	<i>International Business Machines</i>
ICAM.....	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IUB.....	<i>International Union of Biochemistry</i>
IUPAC.....	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

JCBN *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*
 MAdCAM *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*
 MAG *myelin associated glycoprotein*
 MAPK *mitogen-activated protein kinase*
 MD *Moleküldynamik*
 MIDAS *metal ion dependent adhesion site*
 MM *molecular mechanics*
 MMFF *Merck molecular force field*
 MOG *myelin/oligodendrocyte glycoprotein*
 N-CAM *neural cell adhesion molecule*
 Ng-CAM *neuron glia cell adhesion molecule*
 NIH *National Institutes of Health*
 NILE *nerve growth factor-inducible large external glycoprotein*
 NMR *nuclear magnetic resonance*
 NO *nuclear Overhauser*
 NOE *nuclear Overhauser effect*
 NOESY *nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*
 Nr-CAM *Ng-CAM related CAM*
 NS *number of scans*
 OMGP *oligodendrocyte myelin glycoprotein*
 PFT *pulse Fourier transform*
 PMP-22 *human peripheral myelin protein 22*
 PNS *peripheres Nervensystem*
 QSAR *quantitative structure affinity relationships*
 RDC *residual dipolar coupling*
 RMD *restrained Moleküldynamik*
 RMSD *root mean square deviation*
 RNA *ribonucleic acid*
 ROE *rotating frame Overhauser effect*
 ROESY *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*
 SA *simulated annealing*
 SAG *Schwann cell membrane glycoprotein*
 TAG-1 *transiently expressed axonal surface glycoprotein 1*
 TFE *2,2,2-Trifluorethanol*
 TMS *Tetramethylsilan*
 TOCSY *total correlation spectroscopy*
 UFF *universal force field*
 VCAM-1 *vascular cell adhesion molecule 1*
 VLA *very late antigen*
 Ψ *pseudo*

DNA-kodierte Aminosäuren



1 Einleitung

Alle Lebensprozesse basieren letztlich auf der Interaktion zwischen Molekülen. Auf deren Vielzahl und auf den ausgeklügelten Mechanismen, die das korrekte Zusammenspiel ermöglichen, beruht die Komplexität der heutigen Organismen. Molekulare Erkennungsprozesse sind dabei von zentraler Bedeutung für die präzise Steuerung der Wechselwirkung zwischen definierten Partnern. Im Laufe der Evolution hat sich ein hochentwickeltes Netzwerk geformt, durch dessen reibungsloses Arbeiten die Maschinerie des Lebens ihr Fließgleichgewicht und damit ihren Fortbestand aufrechtzuerhalten vermag. Fehlfunktionen führen zu Störungen des Systems, die sich für das Lebewesen als pathologische Veränderungen bemerkbar machen.

Die Grundlage der Wechselwirkungen zwischen Molekülen liegt in deren Struktur. Schon 1894 postulierte Emil Fischer mit der Schlüssel-Schloss-Hypothese eine geometrische Komplementarität zwischen Enzymen und ihren Substraten als Voraussetzung für die Katalyse. Zwar haben sich Erweiterungen des Konzepts für ein akkurates Modell der Realität als nötig erwiesen, etwa durch die Einbeziehung konformationeller Änderungen in Protein und Ligand durch einen *induced fit* im Zuge der Bindung. Die fundamentale Bedeutung einer vorgeformten strukturellen Kompatibilität für den Bindungsprozess jedoch ist unumstritten.

Für ein Verständnis molekularer Interaktion ist es also unerlässlich, genaue Kenntnisse über die strukturellen Eigenschaften der beteiligten Partner zu erlangen. Bei der Strukturaufklärung mit atomarer Auflösung stehen zwei Methoden im Vordergrund: die Röntgenkristallographie und die Kernresonanz- oder NMR-Spektroskopie. Die Bedeutung der genannten Methoden sowie der Strukturaufklärung an sich wird durch mehrere Nobelpreise an Forscher aus beiden Bereichen unterstrichen. Die NMR-Spektroskopie kann dabei Einsichten ermöglichen, die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse nicht zugänglich sind. Insbesondere ist ein Studium der Struktur in Lösung möglich, also unter der physiologischen Umgebung ähnlicheren Bedingungen als in der für eine Untersuchung mittels Röntgenbeugung notwendigen Kristallform. Zudem erhält man kein starres Einzelbild des untersuchten Moleküls, sondern auch Informationen über die dynamischen Aspekte der Struktur. Neben experimentellen Techniken steht die computergestützte Modellierung und Visualisierung

im Mittelpunkt der modernen Chemie und Strukturbiologie. Gerade in Verbindung mit der NMR-Spektroskopie ist mit Hilfe der Moleküldynamik (MD) ein Studium molekularer Strukturen in Lösung möglich, das auch die jedem Molekül inhärente Dynamik abzubilden vermag.

Die Kombination von NMR-Spektroskopie und MD für die Konformationsanalyse ist Grundlage der vorliegenden Arbeit. Im Vordergrund stehen dabei methodische Weiterentwicklungen und deren Anwendung auf die Strukturaufklärung cyclischer Penta- und Hexapeptide im Zuge eines indirekten *drug design* Ansatzes. Die einzelnen Ergebnisteile dieser Arbeit umfassen jeweils eine genauere Darstellung der Grundlagen und Zielsetzungen des jeweiligen Teilprojektes. Im einleitenden Kapitel 2 werden zunächst die wesentlichen strukturellen Eigenschaften von Peptiden erläutert, wobei der Schwerpunkt auf Schleifenstrukturen und den für diese Arbeit als Strukturbildner eingesetzten β -Aminosäuren liegt. Anschließend werden die wichtigsten Konzepte des *computer-aided drug design* (CADD) vorgestellt, vor allem aber das *spatial screening* Prinzip als Basis des mit den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden verfolgten Designansatzes. Die theoretischen Grundlagen der MD und der NMR-Spektroskopie schließen den allgemeinen Teil ab.

Die Methodik der Konformationsanalyse durch NMR-Spektroskopie und MD ist Gegenstand von Kapitel 3. Im Mittelpunkt stehen in dieser Arbeit etablierte Fortschritte gegenüber früheren Vorgehensweisen, vor allem die Einführung eines Torsionswinkelclusterings anstelle des zuvor verwendeten Koordinaten-RMSD-Kriteriums. Ein Vergleich mit den Ergebnissen älterer Vorgehensweisen dient zur Validierung der angestrebten Verbesserungen. In Kapitel 4 kommt das Verfahren bei der Strukturaufklärung zweier cyclischer Hexapeptide zur Anwendung. Diese fungieren als Mimetika des L2/HNK-1-Epitops, einer Kohlenhydratstruktur, die für Erkennungsprozesse vor allem für Zellen des neuronalen Systems von Bedeutung ist. Die Kenntnis der Peptidstrukturen könnte Hinweise auf mögliche strukturelle Grundlagen der Mimikry geben. In Kapitel 5, dem umfangreichsten Abschnitt dieser Arbeit, werden die Strukturen von sechs Cyclopeptiden untersucht, welche nach dem Designprinzip des *spatial screenings* unter Einsatz von β -Homoaminosäuren als potentielle Liganden des Integrins $\alpha_4\beta_1$ ausgewählt wurden. Neben möglichen Struktur-Aktivitätsbeziehungen wird ein besseres Verständnis des strukturellen Einflusses von β -Aminosäuren in Cyclopeptiden und eine Aussage über deren Eignung als Strukturbildner angestrebt. Die Zusammenfassung in Kapitel 6 schließt die vorliegende Arbeit mit einer Gesamtbetrachtung der erzielten Ergebnisse ab.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Peptide

Peptide sind Polykondensationsprodukte von Aminosäuren. In Proteinen finden sich hauptsächlich die klassischen 20 proteinogenen Aminosäuren, deren Repräsentation im Drei- und Einbuchstabencode in der Tafel auf Seite x aufgeführt ist. Bis auf das achirale Glycin handelt es sich um C^α-substituierte L- α -Aminosäuren. In jüngerer Zeit wurden zwei weitere Aminosäuren gefunden, die auf DNA-Ebene kodiert und ribosomal in Peptide inkorporiert werden, Selenocystein^[1,2] und Pyrrolysin.^[3-6]

Die Monomere sind durch Amidbindungen (auch Peptidbindungen) zwischen der Carboxyfunktion einer Aminosäure und der Aminofunktion der folgenden verknüpft. Die Richtung der Sequenz ist per Konvention vom N- zum C-Terminus festgelegt. Für kleinere Peptide werden zur Bezeichnung der Anzahl der Aminosäureeinheiten die Vorsilben di-, tri-, tetra- etc. verwendet. Peptide mit weniger als 10 Aminosäuren werden auch als Oligopeptide, solche mit mehr Einheiten als Polypeptide bezeichnet, während man ab 50 Aminosäuren in der Regel von Proteinen spricht. Jedoch sind diese Termini nicht scharf gegeneinander abgegrenzt; die Übergänge sind in der Literatur fließend.^[7]

Es ist müßig, unter den drei großen Klassen der Biopolymere – Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Proteine – eine Rangfolge der Wichtigkeit festlegen zu wollen. Fest steht, dass Peptide und Proteine von zentraler Bedeutung für so gut wie alle Vorgänge in lebenden Organismen sind. Daher ist offenkundig, dass das Verständnis ihrer Funktion und, als deren Grundlage, ihrer strukturellen Prinzipien von herausragender Bedeutung für das Verständnis des Lebens an sich ist.

Im Hinblick auf den thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit, die Strukturaufklärung von Peptiden, sollen im Folgenden zunächst die zum Verständnis notwendigen allgemeinen Grundlagen dargestellt werden.

2.1.1 Die Peptidbindung

Schon die kleinste Struktureinheit von Peptiden, die Peptidbindung, weist strukturelle Merkmale auf, die das Erscheinungsbild der Polymere entscheidend prägen.

Wie Pauling *et al.* bereits 1951 in einer klassischen Arbeit zeigten, weist die C-N-Bindung in Folge von Resonanzstabilisierung partiellen Doppelbindungscharakter auf (Abbildung 2.1a).^[8] Dies zeigt sich in der gegenüber einer Einfachbindung kürzeren Bindungslänge von 0.147 nm sowie der Planarität der Amidgruppe.

Die Rotation um die C-N-Bindung ist stark erschwert; die Rotationsbarriere beträgt etwa 105 kJ mol^{-1} . Für den Torsionswinkel ω sind daher nur zwei Werte relevant. Die *trans*-Konfiguration ($\omega=180^\circ$) ist dabei gegenüber der *cis*-Konfiguration ($\omega=0^\circ$) um 8 kJ mol^{-1} begünstigt (Abbildung 2.1b). Eine Ausnahme stellt dabei die Xaa-Pro-Peptidbindung dar, bei der die Energiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Isomer reduziert ist (Abbildung 2.1c). Folgerichtig sind die meisten der beobachteten *cis*-Peptidbindungen in Proteinen Xaa-Pro-Bindungen.

Aufgrund der Starrheit der Amidgruppe genügen zur Beschreibung der Konformation des Peptidrückgrats die Torsionswinkel φ , ψ und ω . Seitenkettentorsionen werden mit χ_1, \dots, χ_n bezeichnet (Abbildung 2.2a). Dabei sind die meisten Kombinationen von φ und ψ aus sterischen Gründen nicht möglich

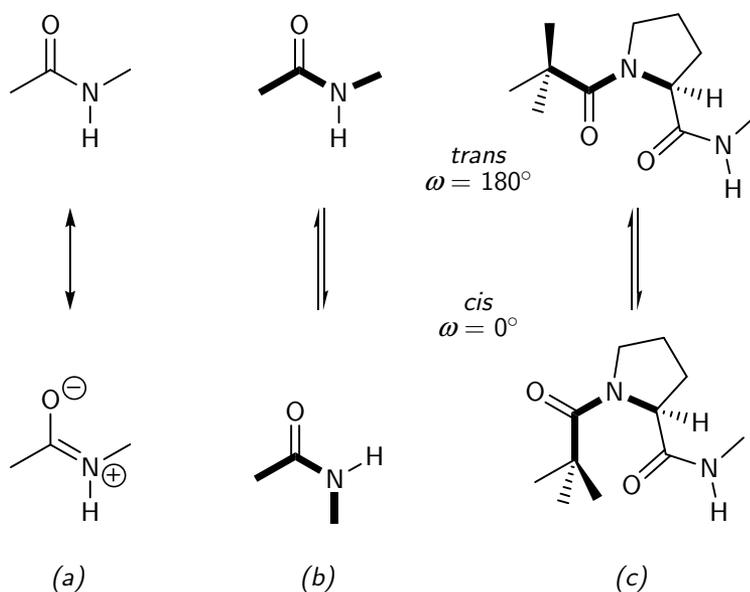


Abbildung 2.1: Resonanzstabilisierung (a) und *cis/trans*-Isomerisierung einer beliebigen (b) sowie der Xaa-Pro-Peptidbindung (c).^[9]

bzw. energetisch ungünstig. Die bevorzugten Kombinationen lassen sich im nach dem Erstbeschreiber benannten Ramachandran-Diagramm darstellen, in dem der ψ - gegen den φ -Winkel aufgetragen wird (Abbildung 2.2b).^[10]

2.1.2 Strukturelemente von Peptiden

Man unterscheidet verschiedene Strukturebenen von Peptiden: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur. Die Aminosäuresequenz wird als Primärstruktur bezeichnet. Unter der Sekundärstruktur versteht man die Anordnung räumlich benachbarter Aminosäurereste zu Strukturen wie Helix, Faltblatt und Turns (Schleifen), welche oftmals durch Wasserstoffbrücken stabilisiert sind. Als Tertiärstruktur bezeichnet man schließlich die dreidimensionale Anordnung der Sekundärstrukturelemente. Disulfidbrücken innerhalb einer Peptidkette sind ebenfalls Merkmale der Tertiärstruktur. Für mehrkettige Proteine verwendet man zusätzlich den Terminus Quartärstruktur für das Arrangement der einzelnen Polypeptidketten aufgrund nichtkovalenter oder, seltener, durch Disulfidbrücken zwischen den Ketten vermittelter Interaktionen. Als Bestandteil der Tertiärstruktur finden sich häufig Kombinationen von Sekundärstrukturelementen, die als Supersekundärstrukturen oder Motive bezeichnet werden. Sie sind meist mit einer bestimmten Funktion assoziiert. Beispiele sind die Ca^{2+} -bindende EF-Hand, ein Helix-Turn-Helix-Motiv, und der Zink-Finger, ein Motiv aus einer α -Helix und zwei β -Faltblattsträngen mit antiparalleler Orientierung, das ein Zn^{2+} -Ion komplexiert und in vielen RNA- und DNA-bindenden Proteinen zu finden ist. Viele weitere Motive sind beschrieben worden und werden in speziellen Datenbanken wie SCOP (*structural classification of proteins*) erfasst.^[13]

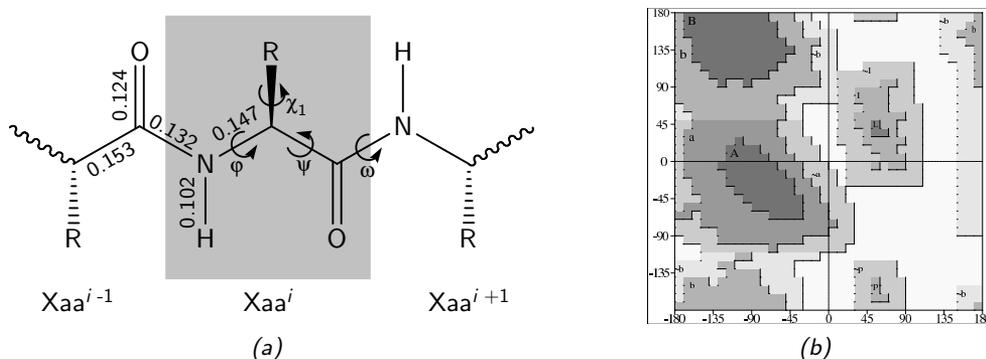


Abbildung 2.2: Bindungslängen in nm und Benennung der Torsionswinkel der Aminosäure Xaa^i in einem Peptid (a).^[9] Abbildung b zeigt die φ/ψ -Auftragung nach Ramachandran.^[10] Am stärksten eingefärbt sind die begünstigten Regionen: α -Helix (A) und β -Faltblatt (B) sowie einige weniger bedeutende Bereiche. Die Graphik wurde mit dem Programm PROCHECK^[11] gemäß Morris *et al.* erzeugt.^[12]

Für die in dieser Arbeit untersuchten cyclischen Penta- und Hexapeptide sind die auftretenden Sekundärstrukturen das entscheidende strukturelle Merkmal. Daher sollen im Folgenden die wichtigsten Sekundärstrukturelemente mit Schwerpunkt auf Turnstrukturen kurz vorgestellt werden.

Helices

Bei einer Helix windet sich das Peptidrückgrat schraubenförmig entlang einer imaginären Achse, wobei die Struktur durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird. Charakterisierende Parameter sind Anzahl der Reste je Umdrehung (n), Ganghöhe, Anzahl der Atome im durch die Wasserstoffbrücke gebildeten „Ring“ (r) sowie Händigkeit (H , P für plus bzw. rechtsgängig, M für minus bzw. linksgängig), in allgemeiner Notation n_r - H -Helix. Das bekannteste Beispiel ist die α -Helix aus L-Aminosäuren, eine 3.6_{16} - P -Helix mit einer Ganghöhe von 540 pm und den Torsionswinkeln $\varphi = -57^\circ$ und $\psi = -47^\circ$ (Abbildung 2.3a). Weitere Beispiele sind die 3_{10} -Helix (3_{10} - P , $\varphi = -60^\circ$, $\psi = -30^\circ$, Abbildung 2.3b), die π -Helix (4.4_{16} - P , $\varphi = -57^\circ$, $\psi = -70^\circ$, Abbildung 2.3c) sowie die Polyprolin-II-Helix, eine wegen des Fehlens von Amidprotonen nicht durch Wasserstoffbrücken stabilisierte 3 - M -Helix ($\varphi = -75^\circ$, $\psi = 145^\circ$, Abbildung 2.3d).^[9,14]

β -Faltblatt

Faltblattstrukturen sind durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen benachbarten Peptidketten charakterisiert. Je nach Orientierung der Peptidketten zueinander unterscheidet man zwischen parallelem und antiparallelem β -Faltblatt. Die Seitenketten der Aminosäuren sind dabei alternierend auf beiden Seiten der Faltblattebene angeordnet. Die Torsionswinkel weichen von der vollständig gestreckten Konformation mit $\varphi = -180^\circ$ und $\psi = 180^\circ$ ab; sie betragen $\varphi = -119^\circ$ und $\psi = 113^\circ$ für das parallele und $\varphi = -139^\circ$ und $\psi = 135^\circ$ für das antiparallele Faltblatt. Dies führt zu dem gefalteten Aussehen, durch das diese Struktur ihren Namen erhalten hat (Abbildung 2.4). Faltblätter weisen meist eine rechtsgängige Verdrehung auf, wodurch der Ausgleich zwischen Wasserstoffbrückenstabilisierung und Konformationsenergie einzelner Stränge optimiert wird. Vor allem im hydrophoben Kern von Proteinen sind β -Faltblätter häufige Strukturelemente, wobei antiparallele Faltblätter häufiger sind. Dabei werden die einzelnen Stränge oft unter einer Richtungsumkehr der Peptidkette durch Turns verbunden.

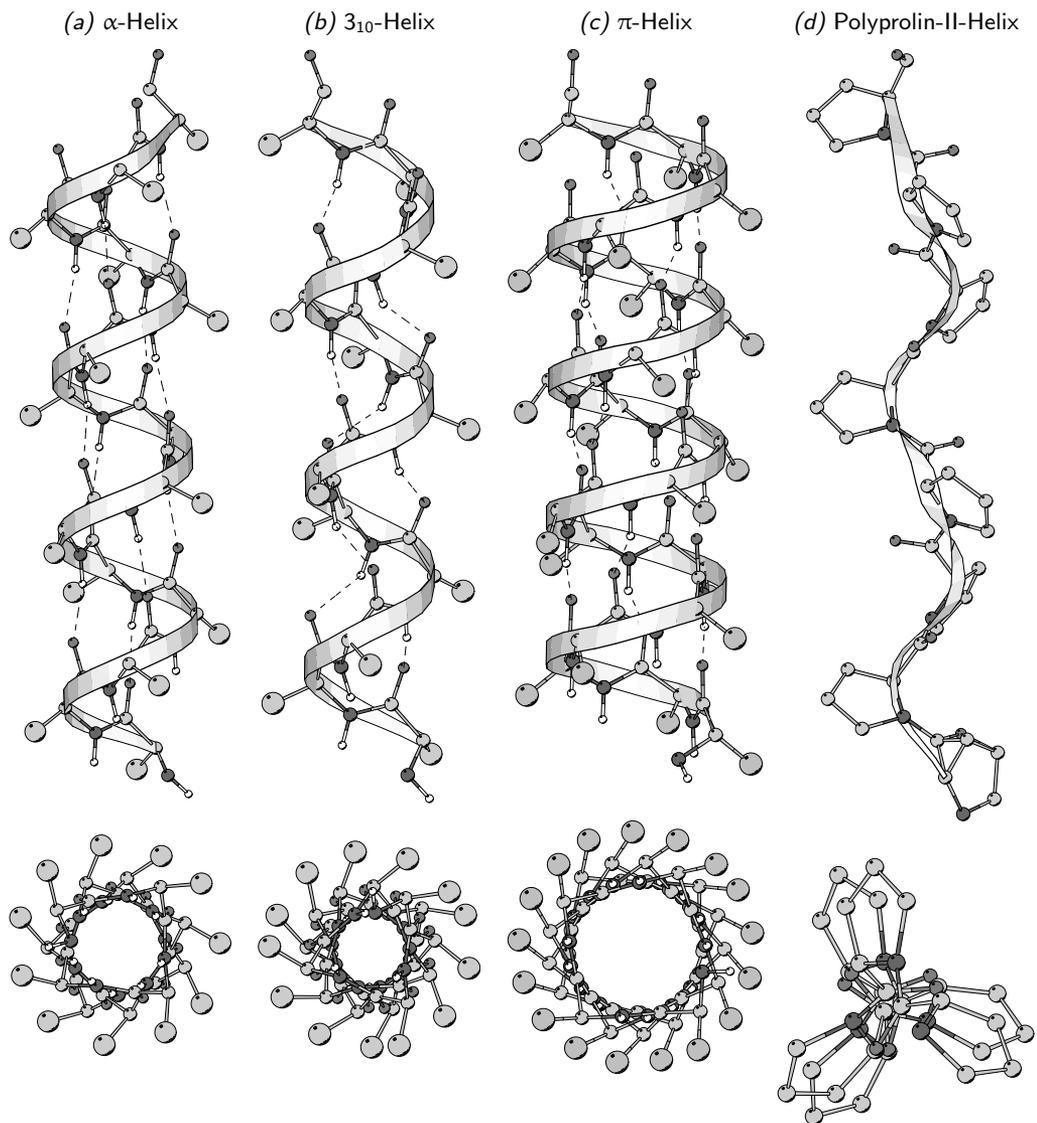


Abbildung 2.3: Die wichtigsten helikalen Sekundärstrukturen. Die α -Helix ist ein sehr häufiges Strukturelement in Proteinen, während die 3_{10} - und die π -Helix nur selten beobachtet werden. Die Polyprolin-II-Helix ist bisher nur in synthetischen Polypeptiden nachgewiesen worden.

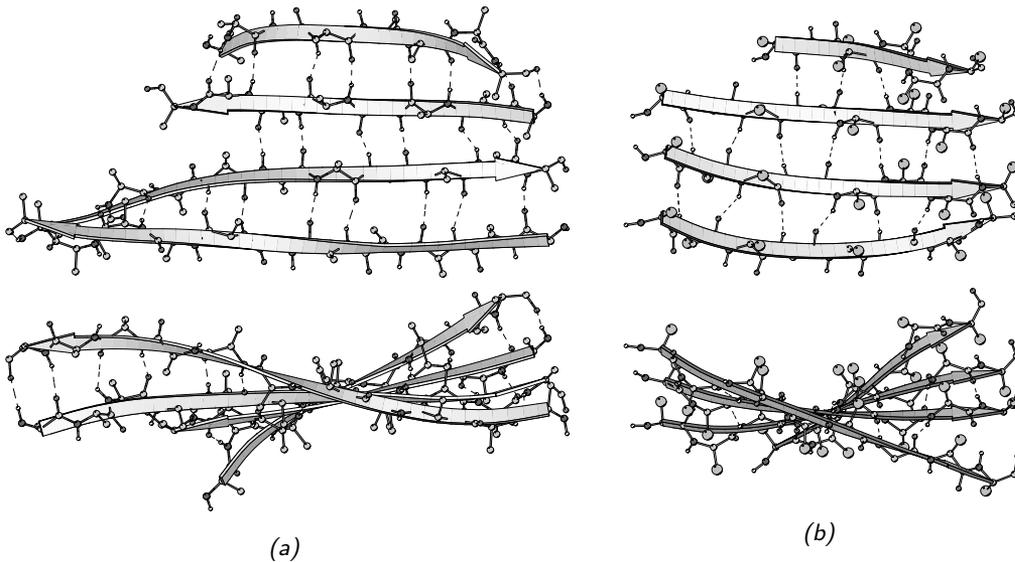


Abbildung 2.4: Antiparalleles (a) und paralleles (b) β -Faltblatt mit Blickrichtung senkrecht sowie in der durch die Stränge gebildeten Fläche. Die Koordinaten sind Ausschnitte aus der Struktur des Integrins $\alpha_V\beta_3$ (siehe Kapitel 5).

Turns

Wie der Name bereits impliziert, ist eine Richtungsumkehr auf engem Raum das Charakteristikum eines Turns. Vor allem an der Oberfläche von Proteinen finden sich zahlreiche Turns, die eine Faltung zu einer kompakten Struktur ermöglichen. Neben der strukturellen Bedeutung haben Turns auch oft eine funktionelle Aufgabe. Aufgrund ihrer Lokalisation an der Moleküloberfläche wird ihnen in vielen Fällen eine entscheidende Rolle bei intermolekularen Erkennungsprozessen zuteil. Dies macht sie zu besonders interessanten Ansatzpunkten bei der Suche nach peptidischen Wirkstoffen, die als Mimetika solcher Interaktoren fungieren. Gerade kleine cyclische Peptide eignen sich hierfür besonders, da ihre konformationelle Beschränktheit die Ausbildung von Turnstrukturen erzwingt.

Die Klassifikation von Turns erfolgt anhand der Anzahl der beteiligten Aminosäuren: Man unterscheidet δ -Turns (2 Aminosäuren), γ -Turns (3 Aminosäuren), β -Turns (4 Aminosäuren), α -Turns (5 Aminosäuren) sowie π -Turns (6 Aminosäuren).^[15] Eine weitere Unterteilung wird mittels der Rückgrat-torsionswinkel der inneren Aminosäuren eines Turns vorgenommen, für einen β -Turn z.B. also anhand der Torsionswinkel der Aminosäuren in den Positionen $i+1$ und $i+2$,^[16] für α -Turns zusätzlich unter Berücksichtigung der Position $i+3$.^[17] Die einzelnen Turns einer Familie unterscheiden sich dadurch sowohl in der Ausrichtung der CO- und NH- Funktionen als auch in

der Stellung der Seitenketten, was für eine eventuelle Rezeptorinteraktion entscheidend sein kann. In vielen Fällen wird der Turn durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert; dies ist jedoch nicht zwingend erforderlich. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Torsionswinkel der wichtigsten Turnstrukturen sowie weiterer Sekundärstrukturelemente. Einige ausgewählte Turns sind zur Verdeutlichung in Abbildung 2.5 dargestellt.

Unter Betrachtung der Rückgrat-atome verhalten sich die Paare $\beta\text{I}/\beta\text{I}'$ und $\beta\text{II}/\beta\text{II}'$ wie Bild und Spiegelbild. Die Bezeichnung βIII -Turn wird nicht mehr verwendet, da es sich bei diesem um das repetitive Strukturelement

Tabelle 2.1: Torsionswinkel (in $^\circ$) der wichtigsten Sekundärstrukturelemente.^[9]

Sekundärstruktur	φ_{i+1}	ψ_{i+1}	φ_{i+2}	ψ_{i+2}	φ_{i+3}	ψ_{i+3}
γ -Turn	75	-64				
γ^i -Turn	-79	69				
βI -Turn	-60	-30	-90	0		
$\beta\text{I}'$ -Turn	60	30	90	0		
βII -Turn	-60	120	80	0		
$\beta\text{II}'$ -Turn	60	-120	-80	0		
βIV -Turn	-61	10	-53	17		
βVIa -Turn (1)	-60	120	-90	0		
βVIa -Turn (2)	-120	120	60	0		
βVIb -Turn	-135	135	-75	160		
βVIII -Turn	-60	-30	-120	120		
I- α_{RS} -Turn	-60	-29	-72	-29	-96	-20
I- α_{LS} -Turn	48	42	67	33	70	32
II- α_{RS} -Turn	-59	129	88	-16	-91	-32
II- α_{LS} -Turn	53	-137	-95	81	57	38
I- α_{RU} -Turn	59	-157	-67	-29	-68	-39
I- α_{LU} -Turn	-61	158	64	37	62	39
II- α_{RU} -Turn	54	39	67	-5	-125	-34
II- α_{LU} -Turn	-65	-20	-90	16	86	37
I- α_{C} -Turn	-103	143	-85	2	-54	-39
3_{10} -Helix	-60	-30				
α -Helix	-57	-47				
π -Helix	-57	-70				
Polyprolin-II-Helix	-75	145				
antiparalleles β -Faltblatt	-139	135				
paralleles β -Faltblatt	-119	113				

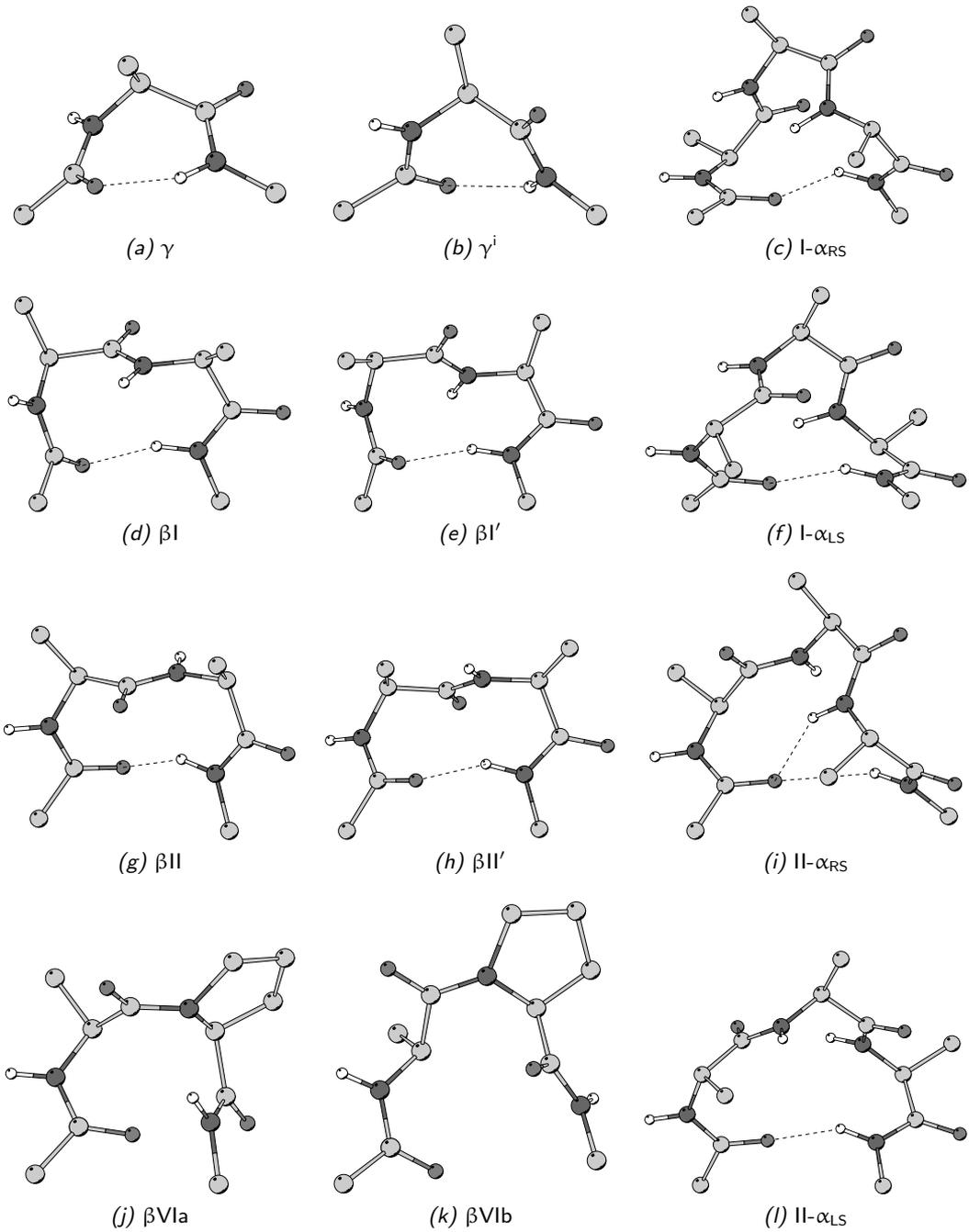


Abbildung 2.5: Ausgewählte Turns.

der 3_{10} -Helix handelt. Interessant sind die β VIa- und β VIb-Turns, bei welchen eine *cis*-Peptidbindung zur Aminosäure in Position $i+2$ auftritt. Hierbei handelt es sich meist um Prolin, weshalb diese Turns auch als Prolin-Turns bezeichnet werden.^[18]

Einige Aminosäuren werden bevorzugt in bestimmten Turns beobachtet. In *trans*-Konfiguration wird Prolin oft in $i+1$ -Position von β I- und β II-Turns vorgefunden. Glycin ist aufgrund seiner besonderen Flexibilität ein geeigneter Baustein vieler Turns und findet sich häufig in Position $i+1$ oder $i+2$. D-Aminosäuren schließlich haben eine ausgeprägte Tendenz, die $i+1$ -Position eines β III'-Turns einzunehmen.

Als ein allgemeines Kriterium für das Vorliegen eines β -Turns bleibt noch die von Lewis *et al.* eingeführte Definition zu nennen, nach der hierbei der Abstand zwischen den C^α -Atomen der Aminosäuren i und $i+3$ weniger als 0.7 nm beträgt, ohne dass die vier den Turn bildenden Aminosäuren Teil einer Helixstruktur sind.^[19] Der β IV-Turn ist eine Sammelkategorie für β -Turns, die sich anhand der Torsionswinkel nicht einem der anderen Typen zuordnen lassen, das Distanzkriterium jedoch erfüllen.^[15] Die Werte in Tabelle 2.1 sind Durchschnittswerte und kein formales Klassifikationskriterium.^[20] Turns unter Beteiligung von β -Aminosäuren werden als Pseudo-Turns bezeichnet, abgekürzt z. B. $\Psi\beta$ oder $\Psi\gamma$.

2.1.3 β -Aminosäuren und β -Peptide

Bei β -Aminosäuren befindet sich gegenüber α -Aminosäuren ein zusätzliches Kohlenstoffatom zwischen der Carboxyl- und der Aminofunktion. Daraus resultiert ein zusätzlicher Torsionswinkel μ , der durch die Atome N-C $^\beta$ -C $^\alpha$ -C definiert ist. Die einfachste β -Aminosäure ist das β -Alanin (Abbildung 2.6a). Ebenso leiten sich auch weitere Trivialnamen von β -Aminosäuren von entsprechenden α -Aminosäuren ab. Das Präfix „Homo“ zeigt dabei eine zusätzliche Methylengruppe zwischen C $^\alpha$ und der restlichen Seitenkette an. β -Leucin und β -Homovalin z. B. sind somit synonym. Je nach Substituenten an C $^\alpha$ und C $^\beta$ wird zwischen monosubstituierten β^2 -, β^3 - und disubstituierten $\beta^{2,3}$ -Aminosäuren unterschieden (Abbildung 2.6).

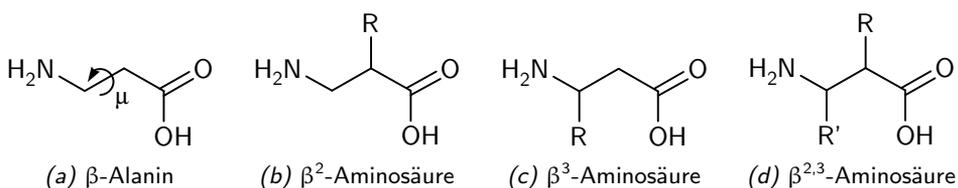


Abbildung 2.6: Typen von β -Aminosäuren.

Naturstoffe mit β -Aminosäuren

β -Aminosäuren sind in belebten Organismen zwar weit weniger verbreitet als α -Aminosäuren, finden sich aber in einer Vielzahl von Naturstoffen. Vor allem Mikroorganismen produzieren Substanzen, welche β -Aminosäuren enthalten, oft mit antibakterieller oder toxischer Wirkung auf andere Organismen. Auf einige Beispiele soll an dieser Stelle eingegangen werden.

β -Alanin als einfachste β -Aminosäure findet sich in marinen Algen und Schwämmen, höheren Pflanzen und auch im Muskelgewebe höherer Organismen, wo es in Form des Dipeptids Carnosin (β -Alanylhistidin) bereits 1900 isoliert und charakterisiert wurde.^[21]

Die Pilze *Oospora destructor* und *Metarrhizium anisopliae* sind die Quelle der Destruxine, einer Gruppe β -Alanin-haltiger cyclischer Hexadepsipeptide mit insektizider und immunsuppressorischer Wirkung.^[22]

Bei Efraeptinen handelt es sich um eine Klasse von Peptidantibiotika, welche von dem Pilz *Tolypocladium niveum* und anderen Arten dieser Gattung produziert werden, wobei in der Natur eine Mischung eng verwandter Sequenzanaloga vorliegt (Efraeptine C–G).^[23] Sie haben insektizide Wirkung, sind kompetitive Inhibitoren der mitochondrialen F_1 -ATPase und zeigen Aktivität gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*.^[24] Sie enthalten neben Pipecolinsäure und α,α -dialkylierten Aminosäuren auch β -Alanin (Abbildung 2.7).

Ein unter dem Namen Taxol[®] bekannter Naturstoff ist das Paclitaxel aus der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia*, das als Chemotherapeutikum in der Tumorthherapie verwendet wird.^[25] Es enthält (*2R,3S*)-*N*-Benzoyl-3-phenylisoserin, eine α -hydroxylierte β -Aminosäure (Abbildung 2.8). Wegen der geringen Verfügbarkeit des Naturstoffs wird er heute meist partialsynthetisch aus der Vorläufersubstanz Baccatin III aus Extrakten der Europäischen Eibe *Taxus baccata* gewonnen, wobei die β -Aminosäure synthetisch eingebracht werden muss.^[26]

Ebenfalls von potentielltem Interesse für die Tumorforschung sind Crypto-

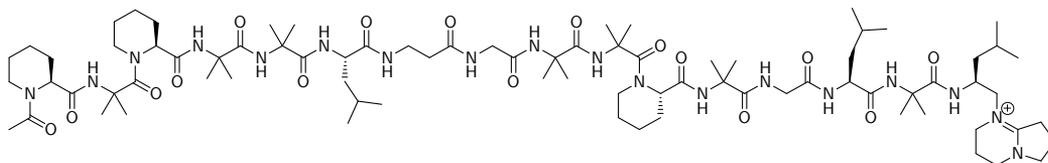


Abbildung 2.7: Struktur des Efraeptins C, Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- β Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X. Neben β -Alanin enthält das Peptid Pipecolinsäure (Pip) und α -Aminoisobuttersäure (Aib). Der N-Terminus ist acetyliert; der C-Terminus trägt eine ungewöhnliche, von Leucinol und DBN (1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en) abgeleitete Kopfgruppe.

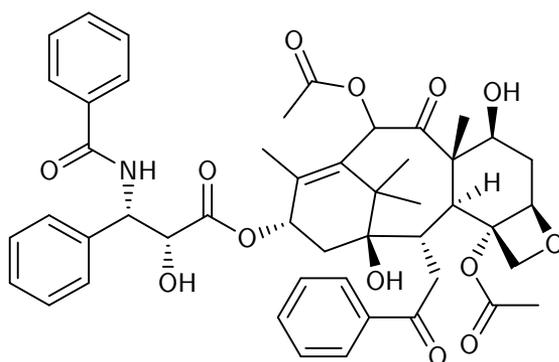


Abbildung 2.8: Struktur von Paclitaxel (Taxol[®]).

phycine, eine Familie von Depsipeptiden, die zuerst aus Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* isoliert wurden.^[27] Die verschiedenen Cryptophycine unterscheiden sich unter anderem in den Substituenten der enthaltenen β^2 -Aminosäure (Abbildung 2.9). Cryptophycine, vor allem die Typen 1 und 52, zeichnen sich durch eine hohe Zytotoxizität aus, insbesondere gegen Mäusen implantierte multiresistente Tumorzellen.^[28–30]

Es ließen sich noch zahlreiche weitere β -Aminosäure-haltige Naturstoffe aufzählen; hierfür sei auf umfangreichere Übersichten verwiesen, als sie an dieser Stelle gegeben werden können.^[31] Die meisten sind, wie die oben genannten Beispiele, Stoffe mit vielversprechenden Eigenschaften im Hinblick auf mögliche pharmakologische Anwendungen. Hierbei ist auch die erhöhte Stabilität von β -Peptiden gegenüber Proteasen und Mikroorganismen erwähnenswert.^[32,33] β -Aminosäuren stellen somit ein interessantes Forschungsgebiet dar, sowohl für die Bereitstellung von Bausteinen für Naturstoffsynthesen als auch für die Untersuchung synthetischer β -Peptide mit neuen Eigenschaften.

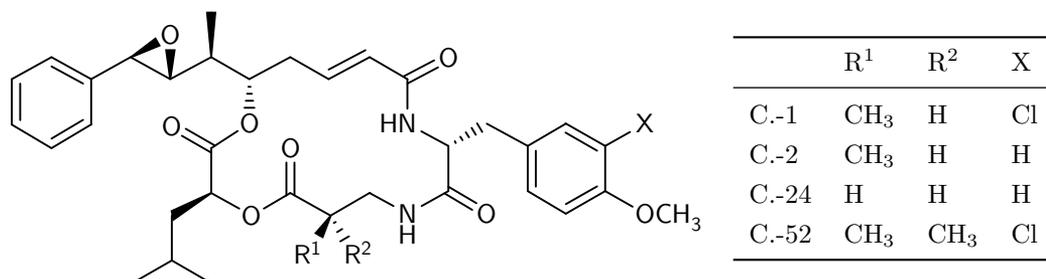


Abbildung 2.9: Grundgerüst der Cryptophycine sowie ausgewählte Beispiele. Bei weiteren Cryptophycinen findet sich auch eine Doppelbindung oder ein Chlorhydrin anstelle der Epoxidfunktion.

Sekundärstrukturen in β -Peptiden

Wie α -Aminosäuren sind β -Aminosäuren in der Lage, Polymere zu bilden, welche intramolekulare Wasserstoffbrücken unter Beteiligung der Amidbindungen enthalten können. Ähnlich den bei α -Peptiden dominierenden Strukturmustern sind auch bei β -Peptiden hauptsächlich Helix- und Faltblattstrukturen beobachtet worden, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen. Auf cyclische Peptide mit β -Aminosäuren wird in Kapitel 5 im Rahmen der dort diskutierten strukturellen Charakterisierung einer Reihe solcher Cyclopeptide näher eingegangen.

Helices Prinzipiell lassen sich für β -Peptide verschiedene Helixtypen konstruieren; einige sind in Abbildung 2.10 schematisch dargestellt. Die ersten experimentellen Hinweise auf eine Helixstruktur bei β -Peptiden wurden schon vor 40 Jahren von Kovacs *et al.* beschrieben. Sie postulierten eine 3.4_{14} -P-Helix für Poly-(L- β -aspartat).^[34]

NMR-spektroskopische sowie kristallographische Studien von Gellman und Appella *et al.* an Peptiden mit der konformationell eingeschränkten Aminosäure *trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) zeigten, dass die untersuchten Peptide im kristallinen Zustand und in organischen Lösungsmitteln 14-Helices ausbilden.^[36,37] Seebach *et al.* wiesen 14-Helices an einer Reihe von Peptiden aus acyclischen β -Aminosäuren nach, wobei die Polarität der Helix von der Chiralität der Monomere abhing.^[38–40] Die 14-Helix hat gegenüber der α -Helix einen größeren Durchmesser bei kleinerer Ganghöhe und wiederholt sich etwa alle 3 Reste. Offenbar ist die 14-Helix eine besonders bevorzugte

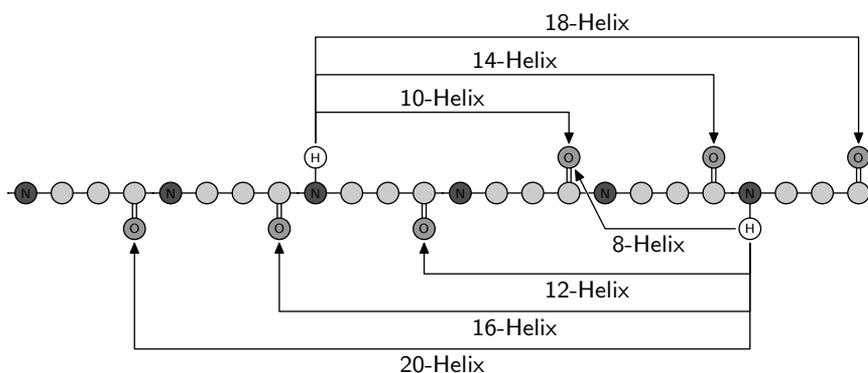


Abbildung 2.10: Sieben mögliche Helices in β -Peptiden. Wasserstoffbrücken-verknüpfte „Ringe“ aus 10, 14 und 18 Atomen entstehen bei einer Wasserstoffbrücke zwischen einem Amidproton und dem Carbonyl-Sauerstoff der Aminosäuren in den Positionen $i+1$, $i+2$ und $i+3$. Eine Verbrückung von Amidproton und Carbonyl-Sauerstoff in $i-2$, $i-3$, $i-4$ oder $i-5$ führt zu einer 8-, 12-, 16- oder 20-Helix.^[35]

Untersuchungen von Faltblattstrukturen beschreiben kurze β -Oligopeptide, bei denen zwei Stränge über einen $\Psi\beta$ -Turn verknüpft sind.^[49,54] Seebach *et al.* konnten nachweisen, dass β -Peptide zwei unterschiedliche Arten dieser Turns bilden können, wobei der durch die Wasserstoffbrücke gebildete Ring 10 oder 12 Atome umfasst.^[55] Hierin spiegelt sich die größere konformationelle Variabilität gegenüber α -Peptiden wider, bei denen durch die Wasserstoffbrücke eines β -Turns ausschließlich Cyclen aus 10 Atomen entstehen.

2.2 Molecular Modeling

Molecular modeling ist ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von Methoden, die ein besseres Verständnis molekularer Prozesse mit Hilfe von Modellen unterschiedlichen Abstraktionsgrades zum Ziel haben. Rein formal nicht an den Computer gebunden, sind die meisten dieser Verfahren praktisch nicht ohne dessen Unterstützung möglich. Die enormen Fortschritte auf dem Gebiet der Rechnertechnik haben bisher für die Theorie unzugängliche Fragestellungen handhabbar gemacht, so dass die computergestützte Visualisierung, Simulation und Manipulation aus der heutigen Chemie nicht mehr wegzudenken ist. Diese Entwicklung wird sich auch in Zukunft fortsetzen. Das berühmte Mooresche Gesetz, von Intel[®]-Mitbegründer Moore 1965 formuliert,^[56] sagt eine Verdopplung der Transistorenzahl pro Flächeneinheit alle zwei Jahre voraus. Die Realität bestätigt seit nunmehr 40 Jahren dieses Postulat, ohne dass gegenwärtig eine sich abschwächende Tendenz erkennbar wäre. Dennoch wird es weiterhin Grenzen der Modellierbarkeit geben, da dem exponentiellen Anwachsen der Rechenkapazität die exponentielle algorithmische Komplexität vieler Probleme gegenübersteht. Aus diesem Grund wird für die entsprechenden Methoden nur ein linearer Zuwachs bezüglich z. B. Systemgröße oder Simulationsdauer möglich sein.

Dieses Kapitel wird einen kurzen Abriss der wichtigsten Techniken des *Molecular modeling* geben, mit Schwerpunkt auf den für die Konformationsanalyse im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden.

2.2.1 Modeling in der pharmazeutischen Forschung

Die Entwicklung eines neuen Medikaments verläuft über mehrere Stufen: Formulierung des Therapieziels, Auswahl eines für das Therapieziel relevanten Zielmoleküls, Identifizierung einer Leitstruktur für den potentiellen Wirkstoff, Optimierung der Leitstruktur, präklinische Versuche sowie mehrere Phasen klinischer Tests. Es handelt sich um einen langwierigen, kostenintensiven Prozess, der nur für einen Anteil in der Größenordnung von $1:10^5$ der untersuchten

Kandidatenmoleküle tatsächlich zu einem Wirkstoff führt.^[57] Klassischerweise werden potentielle Ausgangsverbindungen über Aktivitäts- und Affinitäts-Screenings umfangreicher Stoffdatenbanken erhalten, die in der Regel aus natürlichen Quellen oder aus Synthesen mittels kombinatorischer Chemie stammen.

Oft erweisen sich vielversprechende Substanzen allerdings erst in der präklinischen oder klinischen Phase wegen schlechter ADMET-Eigenschaften als unbrauchbar (*adsorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity*). Da die Anforderungen an präklinische und klinische Tests durch gesetzliche Regelungen streng umgrenzt sind, ist eine Beschleunigung und Kostenreduktion in der Wirkstoffentwicklung nur vor dieser Stufe möglich. Zudem ist die Situation, auch angesichts der wachsenden Zahl durch Genom- und Proteomprojekte identifizierter Gene und Genprodukte, durch eine Verschiebung hin zu einer großen Auswahl möglicher Zielmoleküle für Therapien charakterisiert, denen nicht in ausreichendem Maße Leitstrukturen für Wirkstoffe gegenüberstehen.^[58]

Der Weg vom Therapieziel zur Substanz bedarf vor diesem Hintergrund besonderer Beachtung, wobei moderne rechnergestützte Verfahren entscheidende Beiträge liefern können. Das Schlagwort für die Schnittmenge von *Molecular Modeling* und medizinischer Chemie lautet dabei CADD, *computer-aided drug design*. Hierbei gibt es zwei Vorgehensweisen: Bei bekannter Struktur des Zielmoleküls kann diese in die Modellierung des Pharmakons einfließen, man spricht von direktem CADD. Liegen keine detaillierten Strukturinformationen des Wirkortes vor, ist man auf indirektes CADD beschränkt. Die beiden Strategien stehen nicht in Konkurrenz zueinander, sondern können komplementär eingesetzt und teilweise kombiniert werden.

Indirektes CADD

Bei unbekannter Rezeptorstruktur kann die Computermodellierung sich nur auf die Strukturen bekannter Liganden stützen. Durch Vergleich einer möglichst großen Anzahl solcher Strukturen wird versucht, anhand von Gemeinsamkeiten die für die Wirksamkeit verantwortlichen chemischen Charakteristika zu identifizieren. Das Resultat ist ein Pharmakophor-Modell, welches die dreidimensionale Anordnung struktureller Merkmale wie Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und -Donatoren, Ladungsverteilung und Raumerfüllung charakterisiert. Auf Basis dieses Modells können weitere die Vorgaben erfüllende Verbindungen vorgeschlagen werden. Nach Synthese und Test der biologischen Aktivität können diese wiederum das Pharmakophor-Modell verfeinern oder auch entkräften. Im besten Fall steht am Ende dieses iterativen Prozesses eine

Substanz mit hoher Wirksamkeit.

Im Zuge des Liganden-basierten CADD spielen Techniken eine große Rolle, die darauf abzielen, dessen strukturelle Eigenschaften quantitativ mit seiner Funktion zu korrelieren. Solche QSAR-Methoden (*quantitative structure affinity relationships*) versuchen neben einer Berechnung der Bindungsaffinität auch Aussagen über andere Parameter wie Lipophilie oder metabolische Stabilität zu ermöglichen, um spätere Enttäuschungen in klinischen Tests wegen schlechter ADMET-Eigenschaften zu vermeiden.

Ein gutes Pharmakophor-Modell kann dazu verwendet werden, dessen Negativabbild als Modell für die unbekannte Struktur des Rezeptors zu verwenden; man spricht von *receptor mapping*.^[59] Dieses Rezeptormodell kann dann auch für Methoden des direkten CADD eingesetzt werden, so dass es u. a. möglich wird, sich von den bekannten Ligandenstrukturen zu lösen und chemisch nichtverwandte, möglicherweise bessere Leitstrukturen zu finden.

Ein wichtiges Konzept, gerade im Hinblick auf die Peptidchemie, stellt das *spatial screening* dar, welches von Kessler *et al.* entwickelt wurde.^[60] Diese Technik bietet sich an, wenn die Erkennungssequenz eines peptidischen Liganden bekannt ist, nicht jedoch die aktive Konformation, die bei der Bindung an den Rezeptor vorliegt. Die Erkennungssequenz wird dabei durch den Einsatz strukturbildender Aminosäuren in Cyclopeptiden in definierten Konformationen fixiert. Die Reduktion der Freiheitsgrade durch die Cyclisierung und den Einsatz der Strukturbildner führt aus entropischen Gründen zu einer deutlich erhöhten Bindungsaffinität, falls die fixierte Konformation der Struktur des Rezeptor-Ligand-Komplexes ähnelt.^[61,62] Eine experimentelle Bestimmung der Affinitäten erlaubt dann durch Korrelation mit den typischerweise NMR-spektroskopisch verifizierten Strukturen die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen.

Als Strukturbildner finden vor allem D-Aminosäuren Verwendung; man spricht von einem D-Aminosäure-Scan. Jeweils eine der Aminosäuren der untersuchten Sequenz wird in einem cyclischen Penta- oder Hexapeptid durch ihr D-Enantiomer ersetzt, wobei die Sequenzfragmente die Zielsequenz überlappend abdecken. Größere Peptide sind aufgrund ihrer intrinsischen Flexibilität ungeeignet. Da die D-Aminosäure eine starke Präferenz für die $i+1$ -Position eines β II'-Turns besitzt, wird mit dieser Vorgehensweise ein großer Teil des zugänglichen Konformationsraumes der Zielsequenz durch definierte Strukturen erfasst. Das Konzept ist zur Verdeutlichung in Abbildung 2.12 schematisch dargestellt. Ein Anwendungsbeispiel ist das Design der glykomimetischen Peptide, deren Strukturen in Kapitel 4 untersucht werden.

Neben D-Aminosäuren besitzen auch β -Aminosäuren ein gewisses strukturrinduzierendes Potential, wie Untersuchungen von Schumann *et al.* zeigen.^[63]

Auf diese Thematik wird in Kapitel 5 näher eingegangen werden, in dem die Strukturen einer Reihe von Peptiden mit unterschiedlichem Anteil an β -Aminosäuren untersucht werden.

Direktes CADD

Im günstigen Fall liegt eine hochaufgelöste Röntgen- oder NMR-Struktur des Zielmoleküls vor, idealerweise sogar im Komplex mit einem bekannten Bindungspartner. Ist dies nicht gegeben, stehen aber Strukturen verwandter Proteine zur Verfügung, so kann versucht werden, mittels Homologiemodellierung zu strukturellen Informationen über das eigentliche Ziel zu gelangen. Freilich ist die modellierte Struktur und somit die abgeleiteten Ergebnisse mit zusätzlicher Unsicherheit behaftet. Eine *ab initio* Vorhersage von Proteinstrukturen nur anhand der Primärstruktur ist noch immer kaum mit brauchbarer Sicherheit möglich.^[64]

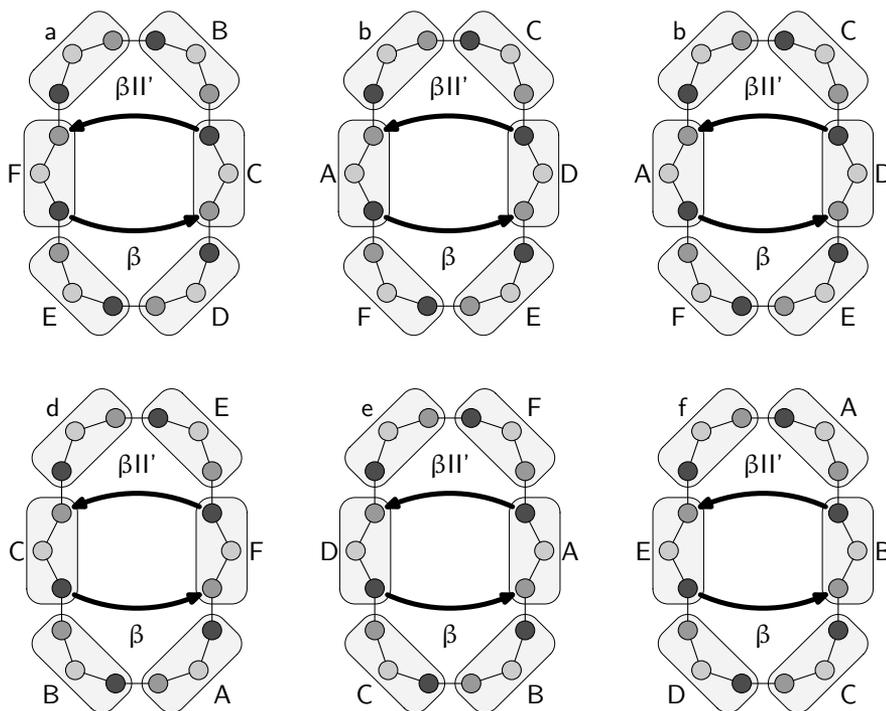


Abbildung 2.12: D-Aminosäure-Scan der Sequenz ABCDEF mit Hexapeptiden. Die jeweils übereinander dargestellten Paare von Peptiden lassen sich durch eine Drehung um 180° ineinander überführen, wobei zwar die Konfiguration einer Aminosäure abweicht, die Positionen im β -Turn jedoch übereinstimmen. Im Falle der glykomimetischen Peptide (Kapitel 4) wurde der Synthese- und Testaufwand daher noch weiter vereinfacht, indem nur jeweils eines der quasiidentischen Peptide untersucht wurde.

Ein Ansatz des direkten CADD ist das *in silico* Screening von Strukturdatenbanken, sozusagen die computergestützte Variante des chemischen HTS (*high throughput screening*). Die Datenbanken umfassen meist kleinere organische Verbindungen, darunter auch bekannte Pharmaka, die erfahrungsgemäß oft Potential für Anwendungen abseits ihrer ursprünglichen Funktion bergen.^[65] Zum Screening bedient man sich einer Reihe von Docking-Techniken, mittels derer ein Ligand in die Bindungsstelle des Rezeptors eingepasst werden kann. In Erweiterung der Schlüssel-Schloss-Hypothese von Fischer^[66] wird dem Liganden dabei in der Regel eine gewisse Flexibilität ermöglicht. Der Rezeptor kann von aktuellen Verfahren bisher nur als starre Struktur modelliert werden, so dass Phänomene wie *induced fit* kaum handhabbar sind.

Bei Kenntnis eines Rezeptor-Ligand-Komplexes ist es oft recht leicht allein durch chemische Intuition möglich, mit Hilfe kleiner Änderungen zu verbesserten Bindungseigenschaften zu gelangen. Die erhaltenen Verbindungen sind dabei dem ursprünglichen Liganden eng verwandt. Eine Möglichkeit zur Generierung völlig neuer Substanzen bietet die *de novo* Konstruktion eines Liganden in der Bindungstasche. Eine Reihe von Programmen wie LUDI,^[67] CLIX^[68] oder CAVEAT^[69] steht hierfür zur Verfügung. In einem ersten Schritt werden im Bereich der Bindungsstelle potentielle Interaktionsorte für entsprechende funktionelle Gruppen identifiziert. Diese werden in weiteren Schritten durch geeignete Linker miteinander verbunden. Im Zuge des inkrementellen Wachstums der Liganden werden deren Position und Konformation optimiert. Außerdem wird meist eine Optimierung bezüglich der ADMET-Charakteristika versucht, wobei QSAR-Techniken Anwendung finden, die aus dem indirekten CADD stammen.

Ein eindrucksvolles Beispiel für direktes CADD unter Zusammenspiel von Datenbank-Screening und *de novo* Konstruktion ist das Design eines Inhibitors der HIV-Protease durch Forscher der Firma Merck. Ausgehend von einer Reihe von Kristallstrukturen der Protease mit bekannten Inhibitoren konstruierten sie zunächst ein Pharmakophorprofil. Das Screening der CSD (*Cambridge structural database*) lieferte eine geeignete Ausgangssubstanz, deren Grundgerüst als Startstruktur einer inkrementellen Konstruktion verwendet wurde. Am Ende der Optimierung stand wie erhofft ein äußerst potenter Inhibitor der HIV-Protease.^[70]

2.2.2 Molekülmechanik und -dynamik

Mit Hilfe der Quantenmechanik ist es durch Lösen der Schrödinger-Gleichung^[71] prinzipiell möglich, die elektronische Struktur und Dynamik eines chemischen Systems – im Rahmen gewisser vereinfachender Annahmen bei

der mathematischen Handhabung – exakt zu berechnen. Theoretisch sind der Berechenbarkeit kaum Grenzen gesetzt, wie es Dirac 1929 formuliert: ^[72]

The underlying physical laws necessary for the mathematical theory of a large part of physics and the whole of chemistry are thus completely known, and the difficulty is only that the exact application of these laws leads to equations much too complicated to be soluble. It therefore becomes desirable that approximate practical methods of applying quantum mechanics should be developed, which can lead to an explanation of the main features of complex atomic systems without too much computation.

Praktisch jedoch ist der Rechenaufwand für die auch unter dem Namen *ab initio* bekannten Methoden so groß, dass mit ihnen bis heute nur kleinere organische Moleküle handhabbar sind. Wie eingangs des Kapitels bereits gesagt wurde, wird sich auch bei weiter fortschreitender Entwicklung der Computertechnik an der grundsätzlichen Notwendigkeit vereinfachender Ansätze mit geringerer algorithmischer Komplexität nichts ändern. Gerade wenn es um die Behandlung biologischer Systeme oder das Studium der Dynamik eines Moleküls in Lösung geht, sind *ab initio* und semiempirische Quantenmechanik-Rechnungen außerhalb der Reichweite des Forschungsalltags.

Die wichtigste Familie der empirischen Methoden ist die der Molekülmechanik- oder Kraftfeldmethoden. Zentraler Ansatz ist die Berechnung der Energie eines Systems allein auf Basis der Koordinaten der Atomkerne, unter genereller Vernachlässigung der Elektronen. Die Gültigkeit dieses Ansatzes beruht auf der Born-Oppenheimer-Näherung, die die Trennung der Elektronen von der Kernbewegung aufgrund der um Größenordnungen verschiedenen Geschwindigkeiten erlaubt. ^[73] Die Berechnung der Energie erfolgt mittels einer Reihe meist einfacher, der klassischen Physik entlehnter Funktionen zur Beschreibung des Einflusses von Bindungslängen, -winkeln, Torsionswinkeln und nichtkovalenter Wechselwirkungen. Zusammen mit einem geeigneten Satz an Parametern bilden diese Funktionen ein sogenanntes Kraftfeld. Aus der Energie lassen sich im Rahmen der klassischen Newtonschen Mechanik auf die Atome einwirkende Kraft und Beschleunigung berechnen, was sich im Namen „Molekülmechanik“ widerspiegelt.

Kraftfelder

Kraftfelder beschreiben die Gesamtenergie eines Systems mittels einer Zerlegung in Partialterme, die durch Summation zu einer Gesamtgleichung zusammengesetzt werden. Die einzelnen Komponenten repräsentieren in der Regel

das Abweichen von Bindungslängen und -winkeln von Referenzwerten, die Änderung der Energie in Folge von Rotation um Bindungen sowie die nicht-kovalenten Interaktionen zwischen Atomen (Abbildung 2.13).

Die jeweilige analytische Form ist abhängig vom verwendeten Kraftfeld, ebenso wie die zugehörigen Parameter. Dabei ist zu bedenken, dass ein Kraftfeld prinzipiell empirisch ist. Für verschiedene Zwecke existieren speziell entwickelte und parametrisierte Kraftfelder, deren Qualität in erster Linie daran gemessen wird, wie gut sie in diesem Bereich experimentelle Daten reproduzieren und vorhersagen können. Deshalb ist es wichtig, ein für die Fragestellung geeignetes Kraftfeld zu wählen.

Die Parametrisierung eines Kraftfelds ist in der Regel ein iterativer Prozess, in dessen Verlauf die Parameter immer wieder variiert werden, bis die zugrundeliegenden Datensätze zufriedenstellend reproduziert werden können. Oftmals ist die experimentelle Datenbasis unzureichend, weshalb für die Parametrisierung vielfach Resultate von *ab initio* Berechnungen Verwendung finden.^[74,75]

Aus Gründen des Rechenaufwandes verfolgen viele Kraftfelder für Biomoleküle einen sogenannten *united atom* Ansatz, bei dem nur die polaren Wasserstoffatome als explizite Atome simuliert werden, während an aliphatischen Kohlenstoff gebundene Wasserstoffatome mit diesem gemeinsam als spezieller Atomtyp behandelt werden. Bekannte Beispiele für den *united atom* Ansatz sind die Kraftfelder von YETI^[76] und GROMOS.^[77-79]

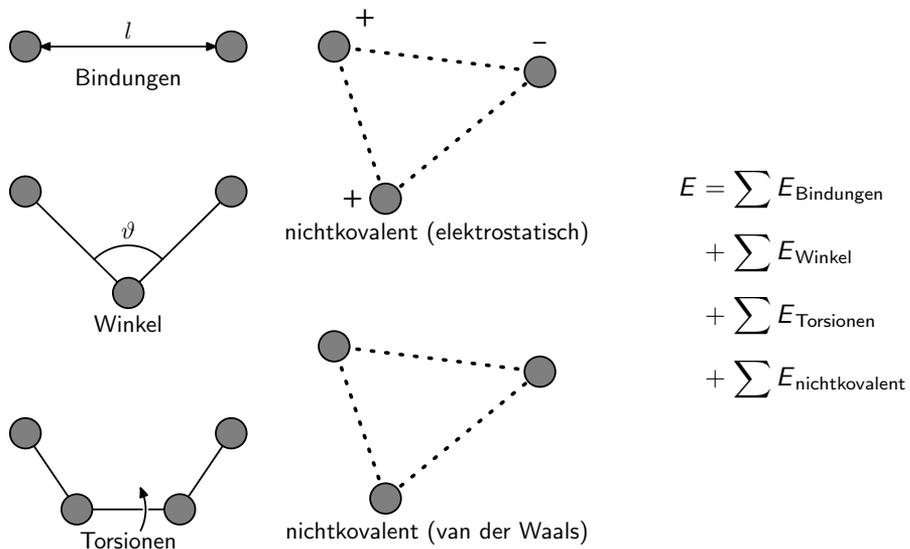


Abbildung 2.13: Die meisten Kraftfelder berechnen die Gesamtenergie durch Zerlegung in Komponenten für Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel sowie nichtkovalente Interaktionen.

Zur Klassifikation von Kraftfeldern wird häufig die von Hwang *et al.* vorgeschlagene und von Allinger *et al.* erweiterte Einteilung in drei Klassen verwendet. Das Hauptkriterium ist dabei das Vorhandensein von Kreuztermen zwischen den verschiedenen Energiebeiträgen.^[80,81]

- Kraftfelder der Klasse I sind auf harmonische Terme ohne Kreuzterme beschränkt.
- Die Klasse II zeichnet sich durch anharmonische Terme sowie Kreuzterme aus.
- In der Klasse III werden auch Einflüsse durch Elektronegativität und Hyperkonjugation berücksichtigt.

Eine Übersicht der zur Zeit meistverwendeten Kraftfelder für Biomoleküle gibt Tabelle 2.2. In der vorliegenden Arbeit wurde größtenteils das Programmpaket GROMOS96^[78] für Moleküldynamiksimulationen verwendet. Die folgende detailliertere Vorstellung der einzelnen Energierterme wird daher am Beispiel des GROMOS96-Kraftfeldes erfolgen.

Bindungslängen GROMOS96 verwendet zur Beschreibung der Bindungsenergie in Abhängigkeit vom Abstand zwischen den Bindungspartnern eine modifizierte harmonische Federgleichung, wobei die Verwendung des Quadrats der Bindungslängen intern eine leichtere Verarbeitung ermöglicht:

$$E(l) = \frac{1}{4}k(l^2 - l_0^2)^2 \quad \text{mit} \quad k: \text{Kraftkonstante des Bindungstyps}, \quad (2.1)$$

l : tatsächliche Bindungslänge,
 l_0 : Referenzbindungslänge.

Bindungslängen unterliegen in der Regel keinen größeren Schwankungen. Dies wird durch große Kraftkonstanten sichergestellt. Typische Werte im Kraftfeld von GROMOS96 liegen in der Größenordnung $10^7 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-4}$, was etwa einem Wert von $10^3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ einer Kraftkonstante für eine einfache Hookesche Gleichung entspricht.

In anderen Kraftfeldern kommen auch harmonische Funktionen mit Termen höherer Ordnung zum Einsatz:

$$E(l) = \frac{k}{2}(l - l_0)^2 [1 - k'(l - l_0) - k''(l - l_0)^2 - k'''(l - l_0)^3 - \dots]. \quad (2.2)$$

MM3 z. B. verwendet eine Gleichung vierter Ordnung. Unter Abwägung von benötigter Genauigkeit und Rechenaufwand ist eine Gleichung zweiter Ordnung für längere Simulationen biologischer Systeme eine gute Wahl.

Tabelle 2.2: Auswahl verbreiteter Kraftfelder in der organischen Chemie.

Kraftfeld	Besonderheiten
AMBER	<i>assisted model building with energy refinement</i> Ursprünglich Programm und <i>united atom</i> Kraftfeld für Proteine und Nukleinsäuren. ^[82,83] Mittlerweile umfangreiche Familie diverser Kraftfelder für Biopolymere einschließlich <i>all atom</i> Versionen. ^[84,85]
CHARMM	<i>chemistry at Harvard molecular mechanics</i> Wie AMBER zunächst ein Programm mit <i>united atom</i> Ansatz für Proteine und Nukleinsäuren. ^[86] Weiterentwicklung zu einer Reihe von Kraftfeldern inklusive <i>all atom</i> Versionen. ^[87] Auch das XPLOR-Kraftfeld ist ein <i>all atom</i> CHARMM-Kraftfeld mit kleinen Modifikationen.
GROMOS05 GROMOS96 GROMOS87	<i>Groningen molecular simulation</i> Programm und <i>united atom</i> Kraftfelder, vor allem für die Simulation von Proteinen und Nukleinsäuren. ^[77–79,88]
MM2/MM3/MM4	Speziell für die Simulation kleinerer organischer Moleküle geeignete <i>all atom</i> Kraftfelder. ^[89–93]
MMFF	<i>Merck molecular force field</i> Von Halgren entwickeltes Kraftfeld, das auch speziell für die Simulation kleinerer, organischer Arzneimittelkandidaten gedacht ist. ^[94–100]
UFF	<i>universal force field</i> <i>All atom</i> Kraftfeld mit Parametern für alle Elemente des Periodensystems. ^[101]
YETI	Auf die Simulation von Metalloproteinen und Metall-Liganden-Interaktionen spezialisiertes <i>united atom</i> Kraftfeld. ^[76,102]

Bindungswinkel Bindungswinkelenergien werden, ähnlich wie Bindungslängen, meist mit einer harmonischen Funktion beschrieben:

$$E(\vartheta) = \frac{k}{2}(\vartheta - \vartheta_0)^2[1 - k'(\vartheta - \vartheta_0) - k''(\vartheta - \vartheta_0)^2 - k'''(\vartheta - \vartheta_0) - \dots]$$

mit k : Kraftkonstanten des Winkeltyps, (2.3)
 ϑ : tatsächlicher Winkel,
 ϑ_0 : Referenzwinkel.

GROMOS96 verwendet aus Effizienzgründen den Cosinus des Winkels in einer harmonischen Funktion zweiter Ordnung:

$$E(\vartheta) = \frac{1}{2}k(\cos \vartheta - \cos \vartheta_0)^2. \quad (2.4)$$

Die Kraftkonstanten für Winkel sind deutlich kleiner als für Bindungslängen.

Torsionswinkel Die Rotation um chemische Bindungen wird in fast allen Kraftfeldern über eine Cosinus-Reihenentwicklung dargestellt. In den meisten Fällen genügt dabei ein Term für eine adäquate Repräsentation. GROMOS verwendet die Funktion

$$E(\omega) = k[1 + \cos \delta \cos(m\omega)] \quad \text{mit } \omega: \text{Torsionswinkel,}$$

k : Kraftkonstante des Torsionstyps,
 $\delta \in \{0, 180^\circ\}$ (Phasenverschiebung),
 $m \in \{1, 2, 3, 4, 5, 6\}$ (Periodizität).
(2.5)

Beispielsweise wird durch die Wahl von $\delta = 0$ und $m = 3$ für eine C–C-Einfachbindung ein Energieprofil mit drei Minima ($\pm 60^\circ, 180^\circ$) und drei Maxima ($0, \pm 120^\circ$) definiert. Für eine Peptidbindung erhält man mit $\delta = 180^\circ$ und $m = 2$ zwei Minima ($0, 180^\circ$) und zwei Maxima ($\pm 90^\circ$).

Improper torsions Definiert man einen Torsionswinkel für vier Atome, die nicht in der Reihenfolge A–B–C–D durch kovalente Bindungen verknüpft sind, spricht man von sogenannten *improper torsion angles*, kurz *impropers*. Anwendung finden *impropers* vor allem zur Fixierung einer planaren Geometrie oder der Chiralität in *united atom* Kraftfeldern. Wie fast alle Kraftfelder ver-

wendet GROMOS eine einfache harmonische Funktion zu diesem Zweck:

$$E(\zeta) = \frac{1}{2}k(\zeta - \zeta_0)^2 \quad \text{mit} \quad \begin{array}{l} \zeta: \text{Wert des } \textit{improper}, \\ \zeta_0: \text{Referenzwert des } \textit{improper}, \\ k: \text{Kraftkonstante.} \end{array} \quad (2.6)$$

Beispiele in GROMOS96 sind:

- die Planarität der Atome C, C^α, O und N in einem Aminosäurerest durch Definition eines *improper* C-C^α-N-O mit $\zeta_0 = 0$,
- ein *improper* C^α-N-C-C^β mit $\zeta_0 = 35.26^\circ$ fixiert die Chiralität von L-Aminosäuren.

Nichtkovalente Wechselwirkungen Räumliche Interaktionen, die nicht von bestimmten Bindungsverhältnissen abhängig sind, werden unter dem Begriff „nichtkovalente Wechselwirkungen“ zusammengefasst und typischerweise als Funktion einer negativen Potenz der Entfernung modelliert. In den meisten Kraftfeldern werden zwei Arten nichtkovalenter Wechselwirkungen berücksichtigt, elektrostatische sowie van der Waals Interaktionen.

Elektrostatische Interaktionen Der Standardansatz zur Modellierung der Ladungsverteilung in Molekülen, den auch GROMOS verfolgt, arbeitet mit Partialladungen. Reellwertige Punktladungen werden an den Koordinaten der Atomkerne lokalisiert, um die elektrostatischen Eigenschaften des Moleküls möglichst gut wiederzugeben. Mit dem Coulombschen Gesetz lässt sich dann die Interaktion zwischen zwei Punktladungen berechnen:

$$E(i, j) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}}. \quad (2.7)$$

Die Interaktion zwischen zwei Molekülen erhält man durch Summation aller paarweisen Wechselwirkungen. Die tatsächlich Verwendung findende analytische Gestalt der Formel ist etwas komplizierter, um noch eine Reihe weiterer Feinheiten zu berücksichtigen, entspricht jedoch prinzipiell Gleichung 2.7. Wie jeder Parameter unterliegen die Werte der Partialladungen eines Kraftfeldes einem iterativen Parametrisierungsprozess. Losgelöst von einem bestimmten Kraftfeld stellen die meisten *Modeling*-Programme eine Auswahl von Algorithmen zur Zuweisung von Partialladungen zur Verfügung. Besondere Bedeutung hat dabei die Methode von Gasteiger und Marsili, die sowohl rasch arbeitet und damit für größere Moleküle brauchbar ist, als auch lediglich die beteiligten Atomtypen mit Konnektivitätsinformationen für die Berechnung

benötigt.^[103]

Van der Waals Interaktionen Als zweite Kategorie nichtkovalenter Wechselwirkungen finden die nach van der Waals benannten Interaktionen Eingang in die Energieberechnung. Diese setzen sich zusammen aus einem dispersiven und einem repulsiven Anteil. Aufgrund der großen Anzahl der zu berücksichtigenden Atompaare ist eine rasch berechenbare Funktion unabdingbar. Üblich ist die Verwendung eines Lennard-Jones-Potentials, das wie folgt definiert wird:^[104]

$$E(r) = k\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^n - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^m \right] \quad \text{mit} \quad k = \frac{n}{n-m} \left(\frac{n}{m} \right)^{\frac{m}{n-m}}. \quad (2.8)$$

Der r^{-n} -abhängige Term repräsentiert dabei die repulsiven, der r^{-m} -abhängige Term die dispersiven Wechselwirkungskräfte. GROMOS verwendet wie die meisten Kraftfelder ein 12-6-Potential, d. h. $n = 12$ und $m = 6$, mit vom Atomtyp abhängigen Parametern:

$$E(r) = \left[\frac{k_{12}}{r^6} - k_6 \right] \frac{1}{r^6}. \quad (2.9)$$

Gesamtgleichung Insgesamt ergibt sich damit in GROMOS als Funktion für die Berechnung der potentiellen Energie eines Moleküls mit N Atomen in Abhängigkeit der Koordinaten \vec{r} dieser Atome:

$$\begin{aligned} E(\vec{r}^N) = & \sum_{i=1}^{N_{\text{Bind.}}} \frac{1}{4} k_i (l_i^2 - l_{i,0}^2)^2 + \sum_{i=1}^{N_{\text{Winkel}}} \frac{1}{2} k_i (\cos \vartheta_i - \cos \vartheta_{i,0})^2 \\ & + \sum_{i=1}^{N_{\text{Tors.}}} k_i [1_i + \cos \delta_i \cos(m_i \omega)] + \sum_{i=1}^{N_{\text{Impr.}}} \frac{1}{2} k_i (\zeta_i - \zeta_{i,0})^2 \\ & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(\left[\frac{k_{ij,12}}{r_{ij}^6} - k_{ij,6} \right] \frac{1}{r_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} \right). \quad (2.10) \end{aligned}$$

Energieminimierung

Das Auffinden energetischer Minimumkonformationen eines Moleküls ist eines der ersten Probleme, die mit Hilfe von Kraftfeld-Methoden angegangen wurden. Ausgehend von einer Anfangskonformation gilt es, ein Minimum der durch das verwendete Kraftfeld definierten Energiefunktion zu finden. In der Regel arbeitet man mit kartesischen Koordinaten, so dass die potentielle Energie eines N -atomigen Moleküls eine Funktion von $3N$ Variablen ist, die sogenannte Energiehyperfläche. Die bildliche Analogie schlägt sich auch in der Verwendung von Begriffen wie „abwärts“, „aufwärts“ oder „Tal“ zur Beschrei-

bung von Merkmalen der Energiehyperfläche und von Bewegungen auf ihr nieder.

Fast alle Minimierungsverfahren sind nur zu Abwärtsbewegungen in der Lage und reduzieren mit jedem Schritt die potentielle Energie des Systems; sie können also lediglich das der Startkonformation nächstgelegene Minimum auffinden. Jenes muss nicht mit dem globalen Minimum übereinstimmen. Bis heute ist kein terminierender Algorithmus bekannt, der das globale Minimum ausgehend von einer beliebigen Startkonformation berechnen könnte.

Da die Form der Energiefunktionen zu komplex ist und von zu vielen Variablen abhängt, um einer exakten analytischen Lösung des Problems zugänglich zu sein, arbeiten Energieminimierungsmethoden numerisch und iterativ. Ob, wie schnell und wie effizient ein Minimum gefunden wird, ist der Hauptunterschied der verschiedenen Minimierungsalgorithmen. Das Kriterium für das Erreichen des Minimums ist, dass durch weitere Schritte (fast) keine Änderung der potentiellen Energie mehr erfolgt.

Die Wahl der Methode hängt daher von der Fragestellung und vom untersuchten System ab. Für die Simulation von Biomolekülen sind zwei Verfahren besonders geeignet, die sich des Gradienten bedienen, d. h. der ersten Ableitung der Energie nach dem Ort: *steepest descent* und *conjugate gradients*. Beide Methoden wurden für die Rechnungen im Rahmen dieser Arbeit angewandt und sollen daher an dieser Stelle näher erläutert werden. Daneben existieren eine Reihe weiterer Algorithmen wie etwa die Newton-Raphson-Energieminimierung, die jedoch für größere Systeme aus Gründen des Rechenaufwandes seltener eingesetzt werden.

Steepest descent Die Richtung der Bewegung auf der Energiehyperfläche wird bei dieser Methode derart gewählt, dass sie so steil wie möglich abwärts erfolgt, woraus sich auch der Name *steepest descent* ableitet. Die Schrittweite wird dabei meist durch eine *line search* bestimmt, welche in Richtung des Gradienten das nächste Minimum unter Reduktion auf eine eindimensionale Bewegung findet, was mathematisch sehr einfach ist. Eine Konsequenz hieraus ist, dass der Gradient jedes Schrittes senkrecht zum Gradienten des vorangegangenen ist. Wegen der Beschränkung auf orthogonale Richtungen kann der *steepest descent* Algorithmus enge Täler nur mit vielen kleinen Schritten durchqueren, und in der Nähe des Minimums kann es zu Oszillationen kommen. *steepest descent* ist von der nötigen Anzahl der Minimierungsschritte nicht sehr effizient, dafür aber ausgesprochen robust auch für Startstrukturen fern eines Minimums. Somit ist der Algorithmus für die Korrektur etwa von manuell konstruierten Molekülen oder ein kurzes „Anminimieren“ einzelner Schnappschüsse aus MD-Simulationen gut geeignet.

Conjugate gradients Im Gegensatz zum *steepest descent* Algorithmus sind bei *conjugate gradients* die Richtungen aufeinanderfolgender Schritte nicht zwangsläufig orthogonal. Vielmehr berechnet er die Richtung \vec{v}_k der Bewegung vom Punkt \vec{x}_k mit dem Gradienten \vec{g}_k gemäß

$$\vec{v}_k = -\vec{g}_k + \gamma_k \vec{v}_{k-1} \quad \text{mit} \quad \gamma_k = \frac{\vec{g}_k \cdot \vec{g}_k}{\vec{g}_{k-1} \cdot \vec{g}_{k-1}}. \quad (2.11)$$

Auf diese Weise ist jeder Bewegungsschritt mit allen vorangegangenen Schritten konjugiert; steile Gradienten haben dabei aufgrund des Wichtungsfaktors γ_k stärkeres Gewicht. Gegenüber *steepest descent* arbeitet *conjugate gradients* vor allem in der Nähe des Minimums wesentlich effizienter und neigt nicht zu Oszillationen. Für größere Systeme eignet sich diese Methode daher besonders gut, sofern sie nicht zu weit vom Minimum entfernt sind.

Moleküldynamik

MD-Techniken ermöglichen es, das dynamische Verhalten von Molekülen im Lauf der Zeit zu simulieren. Die ersten MD-Simulationen wurden 1957 an einfachen Flüssigkeiten durchgeführt.^[105] Die erste Simulation eines kleinen Proteins, des bovinen pankreatischen Trypsin-Inhibitors, datiert aus dem Jahre 1977.^[106] Seitdem haben Methodik und Rechnertechnik große Fortschritte gemacht, so dass heute Rechnungen wie die in dieser Arbeit vorliegenden Studien kleiner Peptide in Lösung auf normalen Desktop-Computern durchgeführt werden können, während auf Hochleistungsparallelrechnern Proteinfaltungssimulationen im Mikrosekundenbereich möglich sind.^[107] Projekte wie IBM's Blue Gene zielen auf die Fortentwicklung massiv paralleler Hardware und speziell angepasster Software für die Anwendung im Bereich biomolekularer Simulationen.^[108]

Im Zuge der Entwicklung der MD erlebte auch der Strukturbegriff im Allgemeinen einen Wandel. Insbesondere Kristallstrukturen suggerieren ein statisches Bild der Molekülstruktur, während in der Realität ständige Fluktuationen um die im Mittel eingenommenen Positionen im Raum erfolgen. Die Betrachtung mittels MD ermöglicht eine Berücksichtigung der realen Dynamik und somit eine realistischere Modell der tatsächlichen Verhältnisse. Ein natürlicher Partner der MD ist die NMR-Spektroskopie. Diese ist in der Lage, experimentelle Daten über Strukturen und ihre Dynamik in Lösung zu liefern, welche als Randbedingungen und Validierungskriterien für MD-Simulationen verwendet werden können.

Der prinzipielle Ansatz der MD ist es, anhand der Newtonschen Bewegungsgleichungen die Änderung der Koordinaten eines Systems mit der Zeit zu be-

rechnen. Durch die Gleichung $F = ma$ ist die auf einen Partikel i wirkende Beschleunigung mit der einwirkenden Kraft verknüpft. Die Kraft ist dabei der Gradient der potentiellen Energie V im Rahmen des verwendeten Kraftfeldes, mit umgekehrtem Vorzeichen:

$$a = \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \frac{\vec{F}_i}{m_i} \quad \text{und} \quad \vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i}. \quad (2.12)$$

Mit diesen Gleichungen ist es möglich, die Bewegung aller Partikel eines Systems zu berechnen. Dabei ist die MD eine deterministische Methode: Alle zukünftigen (und vergangenen) Konfigurationen eines Systems ergeben sich eindeutig aus der gegenwärtigen Konfiguration.

Ein vollständige Diskussion aller Aspekte der MD ist hier nicht möglich. Einige fundamentale Konzepte mit Relevanz für diese Arbeit sollen aber im Folgenden beschrieben werden.

Integrationsmethoden Bei Verwendung eines Kraftfeldes zur Beschreibung der potentiellen Energie eines Moleküls sind alle auf die Atome einwirkenden Einzelkräfte miteinander verknüpft. Ein solches Vielkörper-Problem ist analytisch nicht lösbar, weshalb die Bewegungsgleichungen numerisch integriert werden müssen. Dabei wird die Simulation in viele, endlich kleine Zeitschritte δt mit fester Länge unterteilt (daher der englische Name *finite difference methods*). Zu einem Zeitpunkt t wird die auf ein Partikel wirkende Kraft als Vektorsumme der Interaktion mit allen anderen Partikeln gebildet, die Beschleunigung berechnet und aus den aktuellen Positionen und Geschwindigkeiten die Positionen und Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt $t' = t + \delta t$ berechnet. Es folgt der Integrationsschritt für $t'' = t' + \delta t$, usw. Die Kraft wird als konstant für die Dauer des Zeitschritts angenommen.

Für die Integration existiert eine Reihe von Algorithmen. Ihnen allen gemeinsam ist die Annahme, dass sich Koordinaten (sowie Geschwindigkeiten, Beschleunigungen und höhere Ableitungen ohne physikalische Bedeutung) mit Hilfe von Taylor-Reihen approximieren lassen:

$$\begin{aligned} \vec{r}(t + \delta t) &= \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \vec{b}(t) + \frac{1}{24} \delta t^4 \vec{c}(t) + \dots & (2.13) \\ \vec{v}(t + \delta t) &= \vec{v}(t) + \delta t \vec{a}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{b}(t) + \frac{1}{6} \delta t^3 \vec{c}(t) + \dots \\ \vec{a}(t + \delta t) &= \vec{a}(t) + \delta t \vec{b}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{c}(t) + \dots \\ &\vdots \end{aligned}$$

Die meistgebrauchten Algorithmen sind der Verlet-Algorithmus^[109] und seine Abkömmlinge. Er berechnet aus den Koordinaten des vorangegangenen

Zeitpunktes und den Koordinaten und Beschleunigungen des aktuellen Zeitpunktes die Koordinaten des nächsten Zeitpunktes mit den Gleichungen

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) + \dots, \quad (2.14)$$

$$\vec{r}(t - \delta t) = \vec{r}(t) - \delta t \vec{v}(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 \vec{a}(t) - \dots. \quad (2.15)$$

Durch Summation erhält man

$$\vec{r}(t + \delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t) + \delta t^2 \vec{a}(t). \quad (2.16)$$

Einer der Nachteile des Original-Verlet-Algorithmus ist das Fehlen eines expliziten Geschwindigkeitsterms; diese müssen aus den Koordinaten und Beschleunigungen berechnet werden. Die Addition des kleinen Terms $\delta t^2 \vec{a}(t)$ zu dem viel größeren Term $2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \delta t)$ führt zu Ungenauigkeiten aufgrund der rechnerinternen Darstellung.

Eine Variante des Verlet-Algorithmus, die diese Probleme behebt, ist der *leap-frog*-Algorithmus,^[110] der auch für die MD-Rechnungen in dieser Arbeit verwendet wurde. Er bedient sich der Beziehungen

$$\vec{r}(t + \delta t) = \vec{r}(t) + \delta t \vec{v}(t + \frac{1}{2} \delta t), \quad (2.17)$$

$$\vec{v}(t + \frac{1}{2} \delta t) = \vec{v}(t - \frac{1}{2} \delta t) + \delta t \vec{a}(t). \quad (2.18)$$

Zunächst erfolgt die Berechnung der Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt $t + \frac{1}{2} \delta t$ aus den Geschwindigkeiten zum Zeitpunkt $t - \frac{1}{2} \delta t$ und den Beschleunigungen zum Zeitpunkt t . Mit diesen werden dann aus den Koordinaten zum Zeitpunkt t die Koordinaten zum Zeitpunkt $t + \delta t$ berechnet. Diese Asynchronität zwischen den Koordinaten und den Geschwindigkeiten hat den Charakter eines Bocksprungs, was dem Algorithmus seinen Namen gab.

Systemtemperatur und -druck Die Systemtemperatur kommt bei MD-Simulationen eine entscheidende Bedeutung zu. Zum einen ist natürlich zu entscheiden, bei welcher Temperatur ein Studium des Systems von Interesse ist. Zum anderen ist zu bedenken, dass es dem System durch Umwandlung von potentieller und kinetischer Energie bei hohen Temperaturen eher möglich ist, lokale Minima zu verlassen, so dass ein größerer Bereich des Konformationsraumes abgesucht werden kann.

Bei der Definition der Startkonfiguration müssen zunächst die Anfangsgeschwindigkeiten festgelegt werden. Dies geschieht in der Regel gemäß der

Maxwell-Boltzmannschen Geschwindigkeitsverteilung

$$p(v_{ix}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{kT}}, \quad (2.19)$$

wobei $p(v_{ix})$ die Wahrscheinlichkeit angibt, dass ein Atom i der Masse m_i bei der Temperatur T die Geschwindigkeit v_{ix} in Richtung x hat.

Die meisten MD-Simulationen werden – nach einer Äquilibrationsphase – unter isothermen Bedingungen durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung oder Anpassung der Temperatur werden die Geschwindigkeiten mit einem Faktor λ skaliert. Dieser ergibt sich mit Hilfe der Beziehungen $E_{\text{kin}} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m v_i^2$ und $E_{\text{kin}} = \frac{3}{2} N k T$:

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i (\lambda v_i)^2}{Nk} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i v_i^2}{Nk} \quad (2.20)$$

$$\Delta T = (\lambda^2 - 1)T \quad (2.21)$$

In der Praxis wird das System nach Berendsen *et al.* an ein externes Wärmebad mit der gewünschten Temperatur gekoppelt.^[111] Die Geschwindigkeit des Ausgleichs ist dabei der Temperaturdifferenz zwischen Bad und System proportional:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_{\text{Bad}} - T). \quad (2.22)$$

Damit ergibt sich für die Änderung der Temperatur zwischen zwei Zeitschritten:

$$\Delta T = \frac{\delta t}{\tau} (T_{\text{Bad}} - T). \quad (2.23)$$

Zusammen mit Gleichung 2.21 erhält man für den Skalierungsfaktor λ :

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left(\frac{T_{\text{Bad}}}{T} - 1 \right). \quad (2.24)$$

Eine große Zeitkonstante τ führt also zu einer schwachen, eine kleine Zeitkonstante zu einer starken Kopplung.

In ganz ähnlicher Weise kann eine MD-Simulation unter isobaren Bedingungen vorgenommen werden. Auch hierfür ist die Kopplung an ein „Druckbad“ nach Berendsen *et al.* die gängigste Methode. Die Druckkopplung erfolgt durch Anpassen des Systemvolumens und entsprechendes Skalieren der Koordinaten.

Randbedingungen Die Behandlung der Grenzen des simulierten Systems ist ein wichtiger Aspekt einer MD-Simulation. Im einfachsten Fall wird ein Molekül im Vakuum simuliert. Allerdings ist dies gerade für Biomoleküle eine

sehr unrealistische Umgebung, die zu einer Überbetonung elektrostatischer und anderer nichtkovalenter Wechselwirkungen führt. Auch eine Simulation im Kontinuum, also in einem Medium mit konstanter Dielektrizitätskonstante, kann nicht als realistisches Abbild der Verhältnisse in Lösung betrachtet werden.

Heutzutage werden standardmäßig explizite Solvensmoleküle verwendet, die das untersuchte Molekül in einer Simulationszelle umgeben. Dabei ist es erstrebenswert, die Zelle und damit die Zahl der Solvensmoleküle möglichst klein zu halten, um den Rechenaufwand zu minimieren. Gleichzeitig sollen Artefakte vermieden werden, die an den Zellwänden entstehen könnten. Die am häufigsten verwendete Methode sind periodische Randbedingungen, bei denen die Simulationszelle in alle Raumrichtungen wiederholt wird. Partikel in der Nähe der Zellgrenze „spüren“ diese somit nicht, sondern durch Symmetrioperationen verwandte Partikel auf der gegenüberliegenden Seite der Zelle. Allerdings muss die Größe der Zelle sicherstellen, dass keine Partikel mehrfach miteinander oder mit ihrem eigenen Symmetrieabbild interagieren können. So sollte sichergestellt sein, dass der Abstand zwischen jedem Atom eines Moleküls und allen Symmetrieabbildern der Atome dieses Moleküls größer ist als die *cutoff* Distanz für die Berechnung der nichtkovalenten Interaktionen.

Die Form der Simulationszelle muss zu einer lückenlosen Parkettierung des Raumes geeignet sein. Von den raumfüllenden Polyedern finden für Computersimulationen der Kubus (oder allgemeiner das Parallelepiped), das hexagonale Prisma, das Rhombendodekaeder und das abgestumpfte Oktaeder Verwendung (Abbildung 2.14). Die Wahl der Zellform reflektiert oftmals die Form des untersuchten Systems; für globuläre Proteine z. B. eignet sich das näherungsweise sphärische abgestumpfte Oktaeder, während für Faserproteine das hexagonale Prisma oder ein Parallelepiped in Frage kommt. Für die Simulationen in dieser Arbeit wurde ausschließlich das abgestumpfte Oktaeder verwendet.

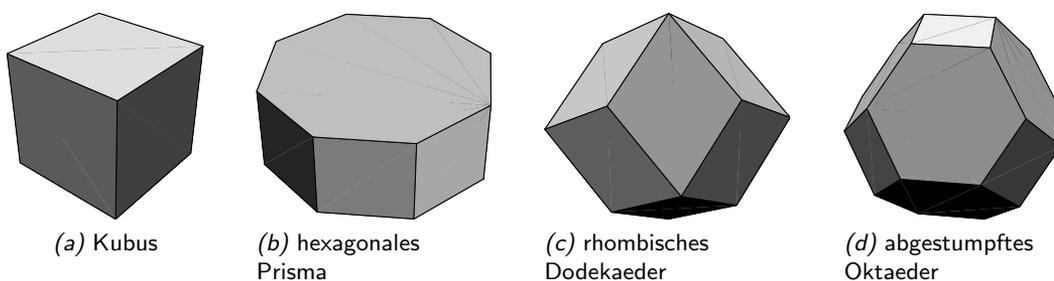


Abbildung 2.14: In Computersimulationen gebräuchliche Zellformen.

Constraint Dynamik Der Zeitschritt einer MD-Simulation muss klein gegenüber den schnellsten im simulierten System auftretenden Bewegungen sein, um das Verhalten des Systems korrekt wiederzugeben und Instabilitäten der Integration zu vermeiden. Umgekehrt wünscht man sich einen möglichst großen Zeitschritt zur Reduktion des Rechenaufwandes. Die schnellsten Bewegungen sind Bindungsschwingungen; so hat die C-H-Bindung eine Periode im Bereich von 10^{-14} s. Diese Bewegungen sind aber für das Simulationsziel nicht von Interesse, so dass es erstrebenswert ist, ihre Berücksichtigung zu vermeiden und damit ein größeres Integrationsintervall zu ermöglichen. Hierzu werden diese Schwingungen durch Abstandsvorgaben (*constraints*) fixiert.

SHAKE^[112] ist der verbreitetste Algorithmus zur Anwendung solcher *constraints*. Nach jedem Integrationsschritt werden die neuen Koordinaten so angepasst, dass alle gegebenen *constraints* mit einer definierten Toleranz erfüllt sind. SHAKE arbeitet iterativ, indem es die *constraints* sukzessiv solange durch Koordinatenanpassungen zu erfüllen sucht, bis alle Abweichungen unterhalb der Toleranzschwelle liegen.

Das SHAKE-Verfahren erfordert natürlich selbst einen gewissen Rechenaufwand, der aber durch die Ermöglichung längerer Zeitschritte mehr als wettgemacht wird. Während für MD-Simulationen ohne Bindungslängen-*constraints* ein Zeitschritt von höchstens 0.5 fs gewählt werden sollte, konnten die unter SHAKE-Fixierung aller Bindungslängen vorgenommenen Berechnungen mit GROMOS im Rahmen dieser Arbeit mit $\delta t = 2$ fs erfolgen.

2.3 NMR-Spektroskopie

Der erste Nachweis von Kernresonanzsignalen gelang unabhängig voneinander Bloch *et al.* und Purcell *et al.* im Jahre 1946.^[113,114] Für diese Entdeckung wurden Bloch und Purcell 1952 zu gleichen Teilen mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet. Seitdem hat sich die Technik zur wohl wichtigsten spektroskopischen Methode in der Chemie entwickelt. Während zunächst nur eindimensionale Experimente durchgeführt wurden, gehören heute zwei- und teilweise dreidimensionale Verfahren zum Standardrepertoire; in naher Zukunft dürfte dies auch für noch höherdimensionale Techniken gelten. Die weiterhin wachsende Bedeutung der NMR-Spektroskopie für die moderne Chemie wird durch die Nobelpreise für die NMR-Spektroskopiker Ernst im Jahre 1991 und Wüthrich im Jahre 2002 unterstrichen. Ernst gebührt das große Verdienst, als erster die Fourier-Transformation in der NMR-Spektroskopie angewandt zu haben, wodurch das Impulsverfahren und damit alle modernen Messmethoden überhaupt erst möglich wurden.

2.3.1 Grundlagen

Viele Atomkerne besitzen einen Kerndrehimpuls \vec{P} , der wie die meisten atomaren Größen gequantelt ist:

$$P = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad \text{mit} \quad \hbar = \frac{h}{2\pi}, \quad (2.25)$$

$$h : 6.6256 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$$

(Plancksches Wirkungsquantum).

I , die Kernspinquantenzahl oder vereinfacht der Kernspin, ist eine feste Eigenschaft einer bestimmten Kernsorte und kann ganz- und halbzahlige Werte zwischen 0 und 6 annehmen. Über das gyromagnetische Verhältnis γ als Proportionalitätskonstante ist ein magnetisches Moment $\vec{\mu}$ mit dem Drehimpuls verknüpft:

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{P}, \quad \mu = \gamma\sqrt{I(I+1)}\hbar. \quad (2.26)$$

Folglich haben Kerne mit dem Kernspin 0 kein magnetisches Moment, weshalb insbesondere die Isotope ^{12}C und ^{16}O NMR-spektroskopisch nicht nachweisbar sind. Die für die NMR-Spektroskopie wichtigsten Kerne in der organischen und bioorganischen Chemie, ^1H , ^{13}C und ^{15}N , haben einen Kernspin von $\frac{1}{2}$; ^2H hat einen Spin von 1 (Tabelle 2.3).

Unter Einfluss eines äußeren Magnetfeldes \vec{B}_0 orientiert sich der Drehimpuls

Tabelle 2.3: Auswahl von für die organische Chemie NMR-spektroskopisch wichtigen Kernen und einige ihrer Eigenschaften.^[115]

Isotop	Spin I	natürliche Häufigkeit/%	$\gamma/10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$	NMR-Frequenz ($B_0 = 14.0954 \text{ T}$)
^1H	1/2	99.985	26.75	600.13
^2H	1	0.015	4.11	92.13
^{11}B	3/2	0.17	8.58	192.59
^{12}C	0	—	—	—
^{13}C	1/2	1.108	6.73	150.90
^{15}N	1/2	0.001	-2.71	60.85
^{16}O	0	—	—	—
^{19}F	1/2	100	25.18	564.91
^{29}Si	1/2	4.70	-5.32	243.17
^{31}P	1/2	100	10.84	243.17

so im Raum, dass seine Komponente P_z in Feldrichtung z die Beziehung

$$P_z = m\hbar \quad \text{mit} \quad m = I, I-1, \dots, -I \quad (2.27)$$

erfüllt. Die magnetische Quantenzahl m kann somit $2I+1$ verschiedene Werte annehmen. Ein Kern mit Spin $\frac{1}{2}$ hat also zwei mögliche Orientierungen in einem äußeren Magnetfeld, ein Kern mit Spin 1 drei (Abbildung 2.15). Man spricht von Richtungsquantelung. Die Komponente μ_z des magnetischen Moments erhält man durch Kombination der Gleichungen 2.26 und 2.27:

$$\mu_z = m\gamma\hbar. \quad (2.28)$$

Die Kerndipole präzedieren dabei innerhalb der x, y -Ebene um die Feldrichtung (Abbildung 2.16). Die Präzessions- oder Larmor-Frequenz ν_L ist der Feldstärke und dem gyromagnetischen Verhältnis proportional:

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0. \quad (2.29)$$

Orientierungen in Richtung des äußeren Magnetfeldes sind energetisch günstiger als entgegen der Feldrichtung; es gilt

$$E = -\mu_z B_0 \quad (2.30)$$

und mit Gleichung 2.28

$$E = -m\gamma\hbar B_0. \quad (2.31)$$

Für zwei benachbarte Energieniveaus, also $\Delta m = 1$, bedeutet dies eine

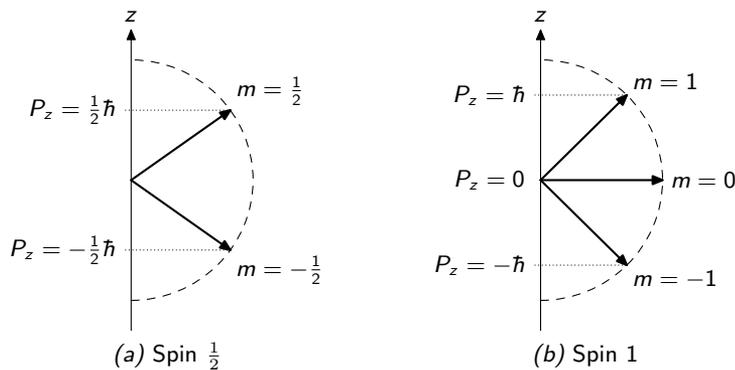


Abbildung 2.15: Mögliche Orientierungen von Kernen mit Spin $\frac{1}{2}$ und Spin 1 im äußeren Feld.

Energiedifferenz von

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (2.32)$$

und gemäß der Boltzmann-Statistik einen Besetzungsunterschied von

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{kT}. \quad (2.33)$$

N_α ist hierbei die Anzahl der Kerne im energieärmeren, N_β die Anzahl der Kerne im energiereicheren Niveau. Die Ungleichbesetzung resultiert ferner in einer makroskopischen Magnetisierung \vec{M}_0 der Probe in Richtung des äußeren Feldes (Abbildung 2.16).

Das NMR-Experiment beruht auf der Induktion und dem Nachweis von Übergängen zwischen den verschiedenen Energieniveaus durch ein Zusatzfeld \vec{B}_1 . Der Übergang zwischen zwei Energieniveaus ist in beide Richtungen gleich wahrscheinlich; aufgrund des Besetzungsunterschiedes überwiegt der Übergang ins energiereichere Niveau durch Energieabsorption aus dem Zusatzfeld. Für $N_\alpha = N_\beta$, den Sättigungszustand, ist kein Signal detektierbar.

Die Energie von \vec{B}_1 muss der Energiedifferenz zwischen den beteiligten Energieniveaus entsprechen:

$$h\nu_1 = \Delta E. \quad (2.34)$$

Erlaubt sind nach der Auswahlregel Übergänge, bei denen sich die magnetische Orientierungszahl um 1 ändert, also sogenannte Einquantenübergänge zwischen benachbarten Niveaus mit $\Delta m = 1$. Somit folgt als Resonanzbedin-

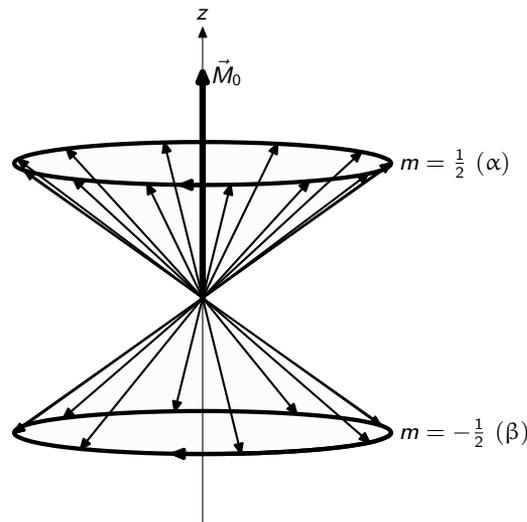


Abbildung 2.16: Besetzung der Energieniveaus α mit $m = \frac{1}{2}$ und β mit $m = -\frac{1}{2}$ auf dem Doppelpräzessionskegel.

gung aus den Gleichung 2.32 und 2.34, dass die Frequenz des Zusatzfeldes gleich der Larmor-Frequenz sein muss:

$$\nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 = \nu_L. \quad (2.35)$$

Bis zum Ende der 1960er Jahre wurde die *continuous wave* Technik verwendet, bei der das gesamte Spektrum kontinuierlich ohne Unterbrechung der Senderleistung aufgenommen wurde, wobei entweder die magnetische Flussdichte B_0 bei konstanter Senderfrequenz ν_1 (*field sweep*) oder die Senderfrequenz bei konstanter Flussdichte (*frequency sweep*) variiert wurde. Heute wird fast ausschließlich die von Ernst und Anderson entwickelte PFT-Technik (*pulse Fourier transform*) angewandt, auf die in Abschnitt 2.3.2 eingegangen wird.^[116]

Für den Chemiker wird die NMR-Spektroskopie erst dadurch interessant, dass aufgrund der Abschirmung der Atomkerne durch ihre elektronische Umgebung in Molekülen die effektive Feldstärke am Kernort gegenüber B_0 abgeschwächt wird. Infolgedessen haben auch Kerne desselben Isotops unterschiedliche, von ihrer chemischen Umgebung abhängige Resonanzfrequenzen:

$$\nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| (1 - \sigma) B_0. \quad (2.36)$$

σ , die Abschirmungskonstante, ist eine Molekülkonstante, die Abweichung der Resonanzfrequenz von derjenigen des isolierten Atomkerns ist jedoch von B_0 abhängig, wie aus Gleichung 2.36 hervorgeht. Um von der Spektrometerfrequenz unabhängige Aussagen machen zu können, definiert man die chemische Verschiebung δ unter Bezug auf eine Referenzsubstanz:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \cdot 10^6. \quad (2.37)$$

Als Bezugssubstanz mit $\delta = 0$ dient Tetramethylsilan (TMS). σ , und damit auch δ , ist klein; daher wird die chemische Verschiebung in *parts per million* (ppm) angegeben.

Eine weitere Aufspaltung der Signale erfolgt durch Kopplung zwischen Kernen. Für die Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie ist dabei hauptsächlich die indirekte Spin-Spin-Kopplung über Bindungen relevant. Je nach Zahl der miteinander koppelnden, chemisch nicht äquivalenten Kerne entstehen Aufspaltungsmuster verschiedener Multiplizität. Die Kopplungskonstanten J sind charakteristische Größen eines Moleküls und von der Messfrequenz unabhängig. Wie die chemischen Verschiebungen erlauben sie Rückschlüsse auf die chemische Umgebung der beteiligten Kerne, z. B. auf Torsionswinkel über die Karplus-Beziehung (siehe 3.2.3).

Die Darstellung der Grundlagen der NMR-Spektroskopie muss aufgrund des Umfangs der Thematik ein unvollständiger Abriss bleiben. Für detaillierte Informationen sei auf einschlägige Lehrbücher verwiesen.^[117,118] Im Folgenden soll jedoch noch kurz auf das Impulsverfahren sowie auf die für die Strukturaufklärung von Biomolekülen wichtigen zweidimensionalen Verfahren eingegangen werden. Mit Schwerpunkt auf der experimentellen Bestimmung für die Konformationsanalyse relevanter Parameter wird die NMR-Spektroskopie in Abschnitt 3.2 nochmals beleuchtet.

2.3.2 Impulsverfahren

Beim Impulsverfahren wird der Hochfrequenzgenerator jeweils nur für eine kurze Zeit τ_P eingeschaltet, wodurch man ein kontinuierliches Frequenzband symmetrisch zur nominellen Frequenz ν_1 erhält. Hierdurch ist es möglich, alle Kerne einer Probe simultan anzuregen. Die Breite des Frequenzbandes ist in etwa τ_P^{-1} proportional; typischerweise liegen die Impulslängen in der Größenordnung von 10^{-6} bis 10^{-5} s.

Durch die Wechselwirkung mit dem eingestrahlten Puls wird die makroskopische Magnetisierung M_0 aus ihrer im ungestörten Zustand zur z Achse parallelen Orientierung ausgelenkt. Aufgrund der Präzessionsbewegung ändert sich auch die Auslenkungsrichtung mit der Larmor-Frequenz. Für eine anschaulichere Beschreibung der Vorgänge ist es daher zweckmäßig, anstelle des x, y, z -Laborkoordinatensystems das ebenfalls mit der Larmor-Frequenz um z rotierende x', y', z -Koordinatensystem zu verwenden.

Die Auslenkung erfolgt senkrecht zur Richtung des Feldes \vec{B}_0 und des Pulses \vec{B}_1 . Erfolgt die Pulseinstrahlung also in Richtung der x' -Achse, resultiert eine Auslenkung in der y', z -Ebene. Der Impulswinkel Θ ist dabei der Impulsdauer sowie der Amplitude B_{1i} der anregenden Frequenz ν_i proportional:

$$\Theta = \gamma B_{1i} \tau_P. \quad (2.38)$$

Von entscheidender Bedeutung für fast alle Pulsexperimente sind insbesondere die Impulswinkel 90° und 180° . Wie in Abbildung 2.17 veranschaulicht ist, erreicht die Quermagnetisierung $M_{y'}$ für einen $90^\circ_{x'}$ -Puls ein Maximum und ist Null für einen $180^\circ_{x'}$ -Puls. Da sich die Empfängerspule in der y -Achse befindet, empfängt sie ein $M_{y'}$ proportionales Signal. Das Signalmaximum wird also für den $90^\circ_{x'}$ -Puls aufgezeichnet, während nach einem $180^\circ_{x'}$ -Puls kein Signal detektiert wird.

Nach dem Abschalten des Pulses kehrt das System mit der Zeit zum ungestörten Zustand zurück, in dem für die Komponenten der makroskopischen

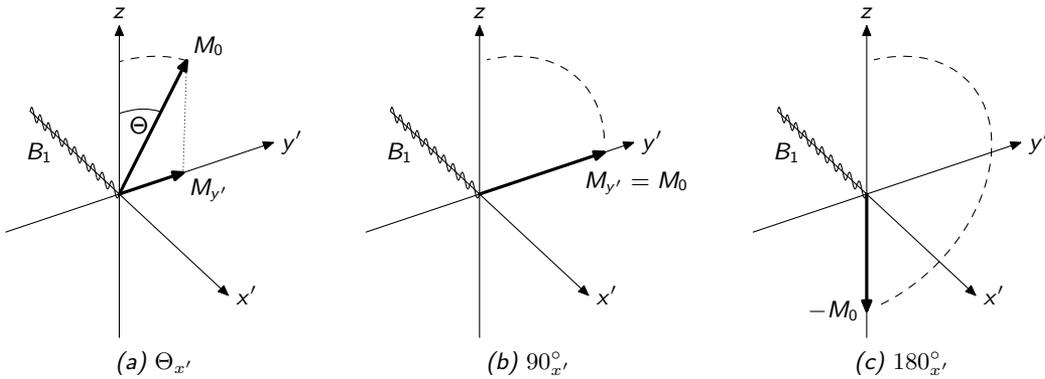


Abbildung 2.17: Makroskopische Magnetisierung allgemein nach einem Puls in x' -Richtung, nach einem $90^\circ_{x'}$ -Puls und nach einem $180^\circ_{x'}$ -Puls.

Magnetisierung \vec{M}_0 gilt: $M_z = M_0$, $M_{x'} = 0$, $M_{y'} = 0$. Zur Beschreibung dieser Relaxation dienen die Bloch-Gleichungen:^[119]

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.39)$$

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2} \quad (2.40)$$

$$\frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2} \quad (2.41)$$

T_1 ist die Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit, T_2 die Spin-Spin- oder transversale Relaxationszeit.

Wie bereits gesagt, hängt das im Empfänger detektierte Signal von der Quermagnetisierung $M_{y'}$ ab und verschwindet durch die Relaxation somit nach Abschalten des Pulses allmählich. Es handelt sich zudem um eine Überlagerung aller Signale der bei verschiedenen Frequenzen angeregten Kerne in der Probe. Das resultierende Interferogramm wird als FID (*free induction decay*) bezeichnet. Zur Umwandlung eines solchen FID von einem zeit- in ein frequenzabhängiges Spektrum bedient man sich der Fourier-Transformation. Hierfür ist ein erheblicher Rechenaufwand erforderlich, weshalb die enormen Fortschritte auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie durch die Impulstechnik eng an die rasante Entwicklung der Computertechnologie gekoppelt waren, wie Ernst in seinem Nobel-Vortrag eindrucksvoll beleuchtet.^[120]

Ein gewaltiger Vorteil des Impulsverfahrens gegenüber den zuvor genutzten *continuous wave* Techniken ist die ungleich kürzere Messzeit in Kombination mit der Möglichkeit zur Spektrenakkumulation. Hierbei addieren sich die Signale, während statistisches Rauschen umso effektiver herausgemittelt wird, je mehr FID aufsummiert werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis ($\frac{S}{N}$, *signal to*

noise) ist der Quadratwurzel der Anzahl der Einzelmessungen (NS , *number of scans*) proportional:

$$\frac{S}{N} \sim \sqrt{NS}. \quad (2.42)$$

2.3.3 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Ein eindimensionales NMR-Spektrum hat eine Frequenzachse, während auf der anderen Achse die Signalintensitäten aufgetragen werden. Ein zweidimensionales NMR-Spektrum hat zwei Frequenzachsen, gegen die die Intensitäten aufgetragen werden. Auch höherdimensionale Spektren sind möglich.

Im eindimensionalen Experiment schließt sich an den Anregungspuls unmittelbar die Detektion an; komplexeren 1D-Experimenten ist zusätzlich eine Präparationsphase vorgeschaltet. Bei 2D-Experimenten wird eine Evolutions- und Mischphase zwischen Anregung und Detektion geschaltet, in der sich das System „entwickeln“ und eine „Mischung“ der Spinzustände erfolgen kann. Das 2D-Experiment lässt allgemein also in folgende Blöcke unterteilen:

Präparation – Evolution (t_1) – Mischung – Detektion (t_2)

Während der Mischphase, die bei bestimmten Experimenten auch z. B. zum Zeitpunkt $\frac{t_1}{2}$ die Evolutionsphase unterbrechen kann, können je nach Art des Experiments zusätzliche Impulse geschaltet werden. Die Dauer der Mischphase ist während einer 2D-Messung konstant. Die Detektionszeit t_2 entspricht dem eindimensionalen Experiment; die Evolutionszeit t_1 hingegen wird im Verlauf des 2D-Experiments variiert. Für jedes t_1 wird ein FID aufgenommen, so dass am Ende der Messung durch eine Fourier-Transformation in den beiden Dimensionen t_1 und t_2 auch ein Spektrum in zwei Frequenzdimensionen erhalten wird.

Die mehrdimensionalen Verfahren beruhen auf dem Vorhandensein von Kopplungen zwischen Kerndipolen. Diese Kopplungen können skalarer Natur sein oder auch dipolarer Art wie beim NOESY-Experiment. Zwischen koppelnden Kernen sind im 2D-Spektrum Kreuzsignale zu beobachten. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Experimente kurz vorgestellt, wobei nicht die genaue Funktionsweise, sondern der für die Strukturaufklärung relevante Informationsgehalt im Vordergrund steht. Auf das NOESY-Experiment wird wegen seiner besonderen Bedeutung für die Strukturaufklärung ausführlicher eingegangen.

COSY

Im einfachsten und ältesten 2D-Experiment, dem COSY^[121] (*correlated spectroscopy*), werden Kreuzsignale zwischen skalar miteinander koppelnden Ker-

nen detektiert. Im $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY bedeutet das Auftreten von Kreuzsignalen also, dass die betreffenden Protonen über zwei oder über drei Bindungen miteinander koppeln. Es handelt sich folglich um ein geminales oder vicinales Paar.

TOCSY

Im TOCSY^[122,123] (*total correlation spectroscopy*) sind, abhängig von der *spin-lock* Zeit, neben den skalar miteinander wechselwirkenden Kernen auch solche korreliert, die gemeinsame Kopplungspartner haben. Somit kann in einem TOCSY bei ausreichend langer Mischzeit ein gesamtes Spinsystem abgebildet werden. Auf diese Weise können in einem $^1\text{H},^1\text{H}$ -TOCSY eines Peptids alle zu einer Aminosäure gehörenden Protonenresonanzen identifiziert werden.

HSQC und HMQC

HSQC^[124] (*heteronuclear single quantum coherence*) und HMQC^[125,126] (*heteronuclear multiple quantum coherence*) sind heteronukleare Experimente, bei denen Kreuzsignale zwischen direkt über eine Bindung verbundenen Kernen beobachtet werden. Mit Hilfe eines HSQC-Spektrums können ^{13}C -Resonanzen zugeordnet und überlagerte ^1H -Resonanzen entzerrt werden. Heteronukleare Experimente können invers gemessen werden, indem z. B. beim $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC die ^{13}C -Kerne angeregt, aber die wesentlich empfindlicheren ^1H -Kerne detektiert werden, wodurch eine erheblich verbesserte Sensitivität erzielt wird.

HMBC

Über das HMBC-Verfahren^[127] (*heteronuclear multiple bond correlation*) können Korrelationen zwischen Kernen sichtbar gemacht werden, die über mehrere Bindungen miteinander koppeln. 2J -Kopplungen werden in der Regel durch einen Tiefpassfilter unterdrückt, um das Spektrum zu vereinfachen; sie sind mittels HSQC oder HMQC zugänglich. Mit Hilfe eines $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrums können ^{13}C -Resonanzen von ganzen Spinsystemen zugeordnet werden.

NOESY und ROESY

Der NOE (*nuclear Overhauser effect*) basiert auf dipolarer Kopplung zwischen räumlich benachbarten Spins i und j und äußert sich in einer veränderten Signalintensität. Die Stärke des NOE von j auf i wird als relative Intensitätsänderung zur Intensität ohne Auftreten eines NOE definiert:^[117]

$$\eta_i\{j\} = \frac{I - I_0}{I_0}. \quad (2.43)$$

Kreuzsignale im 2D-Spektrum treten aufgrund longitudinaler Kreuzrelaxation auf.^[128,129] Die Kreuzrelaxationsrate σ_{ij} hängt von der Korrelationszeit τ_c und dem Kernabstand r_{ij} ab:

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2 \tau_c}{10r_{ij}^6} \left(\frac{6}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - 1 \right). \quad (2.44)$$

Die Korrelationszeit τ_c ihrerseits wird durch Viskosität und Temperatur des Lösungsmittels sowie die Größe des Moleküls beeinflusst; in größeren Molekülen sind die Korrelationszeiten länger. Bei langer Korrelationszeit (*slow tumbling, spin diffusion limit*, $\tau_c \gg \omega^{-1}$) ist der beobachtete NOE negativ, während bei kurzer Korrelationszeit (*extreme narrowing*, $\tau_c \ll \omega^{-1}$) ein positiver NOE auftritt. Insbesondere ist zu bemerken, dass σ_{ij} bei $\tau_c \omega = \sqrt{1.25}$ einen Nulldurchgang hat (Abbildung 2.18a); in diesem Fall wird kein NOE beobachtet.

Im Falle eines zu kleinen NOE kann der ROE (*rotating frame Overhauser effect*) genutzt werden.^[123,130] Dieser basiert auf transversaler Kreuzrelaxation und hat im Gegensatz zum NOE keinen Nulldurchgang (Abbildung 2.18b):

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2 \tau_c}{10r_{ij}^6} \left(\frac{3}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + 2 \right). \quad (2.45)$$

Der ROE ist wegen des *spinlock* Feldes frequenzabhängig, weshalb eine *offset*-Korrektur erforderlich ist.^[131]

Sowohl NOE als auch ROE sind zu r_{ij}^{-6} proportional. Durch Kalibrierung auf einen bekannten Referenzabstand, in der Regel ein geminales Protonenpaar mit einem Abstand von $r_{\text{ref}} = 178$ pm, können aus den Volumenintegralen der

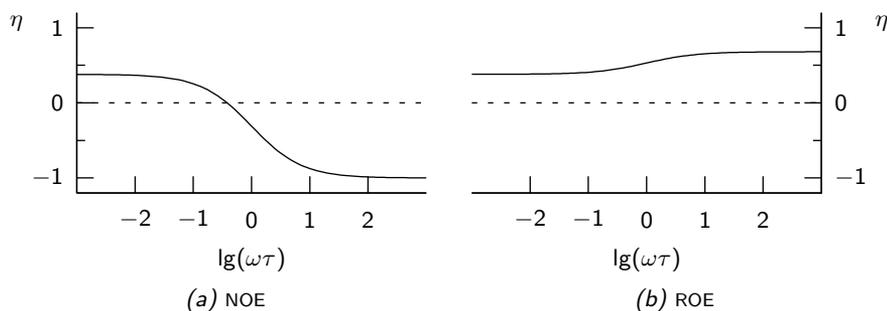


Abbildung 2.18: Stärke von NOE (a) und ROE (b) in Abhängigkeit von $\omega\tau_c$.

Kreuzsignale die interatomaren Abstände berechnet werden:

$$r_{ij} = r_{\text{ref}} \sqrt[6]{\frac{I_{\text{ref}}}{I_{ij}}}. \quad (2.46)$$

Diesem Vorgehen liegen einige vereinfachende Annahmen zugrunde:

- Der Aufbau des NOE bzw. ROE, der korrekt durch eine Exponentialfunktion wiedergegeben wird, wird linear approximiert. Die Aufbaurrate und mit ihr die Signalintensität wird dadurch der Kreuzrelaxationsrate proportional. Diese Näherung ist nur in einem bestimmten Bereich gültig, so dass die Mischzeit entsprechend zu wählen ist.
- Das Molekül wird als starr während des Austauschprozesses angenommen, d. h. die Korrelationszeiten sind unabhängig von der Position der Kerne im Molekül (z. B. Seitenketten oder Rückgrat).
- Es wird eine Wechselwirkung zwischen jeweils genau zwei Kernen angenommen (Zwei-Spin-Näherung).

Um diese Näherungen zu berücksichtigen, werden die aus dem NOE-Spektrum erhaltenen Abstände für *molecular modeling* Rechnungen üblicherweise mit einer Toleranz von 10% verwendet.

3 Methodik der Konformationsanalyse

Die Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Aufklärung dreidimensionaler Molekülstrukturen mit atomarer Auflösung hat in jüngerer Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie erlaubt die Anwendung von NMR-Techniken das Studium in Lösung, also in einer gerade für Biomoleküle realistischeren Umgebung. Auch liefert die Röntgenstrukturanalyse genau ein starres Bild des Moleküls, das der durchschnittlichen Struktur im Kristall entspricht. Die anhand von NMR-Experimenten gewonnenen Daten sind hingegen meist mit einer Reihe ähnlicher Konformationen des Moleküls konsistent und beinhalten somit potentiell auch Informationen über die Dynamik des Moleküls. Genau hier liegt die Erklärung für die Fruchtbarkeit der Symbiose zwischen NMR und MD: Die Simulation des untersuchten Moleküls, die ebenfalls in einer explizit modellierten Lösungsumgebung erfolgen kann, ermöglicht ein detailliertes Studium der dynamischen Struktur im zugänglichen Konformationsraum, wobei experimentelle Daten als Randbedingungen und zur Validierung Verwendung finden. Als Resultat erhält man ein Modell der Struktur, das zwar nicht so eingängig ist wie eine starre Momentaufnahme, dafür aber eine bessere Approximation der Wirklichkeit darstellt.

3.1 Zielsetzung

In diesem Kapitel wird es um methodische Erweiterungen der Konformationsanalyse mittels einer Kombination aus NMR, DG und MD gehen. Zunächst sollen in Abschnitt 3.2 die wesentlichen konformationsrelevanten Parameter erläutert werden, die aus den NMR-Spektren gewonnen und für die folgenden Berechnungen verwendet werden. Beim Übergang vom Experiment zur Simulation ist die Generierung einer geeigneten Startstruktur von ganz wesentlicher Bedeutung; die gebräuchlichsten Methoden zu diesem Zweck werden daher in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Eine Hauptmotivation für methodische Modifikationen an den in vorangegangenen Arbeiten verwendeten Konformationsanalyse-Protokollen ergibt

sich aus der Unzulänglichkeit des Clusterings von Peptidstrukturen in ähnliche Familien auf Basis eines Koordinaten-RMSD-Kriteriums, wenn das Studium ihrer Sekundärstruktur im Vordergrund steht. Es zeigt sich nämlich, dass zwischen Unterschieden in der Sekundärstruktur bzw. den Torsionswinkeln des Peptidrückgrats und dem RMSD der Atomkoordinaten keine hinreichende Korrelation besteht. Dies bedeutet, dass ein Clustering anhand eines der beiden Kriterien nicht geeignet für eine Aussage bezüglich des anderen ist.

Als Beispiel, stellvertretend für viele im Rahmen dieser Arbeit und von Kollegen bei ihren Berechnungen beobachtete, sei die Struktur des Pentapeptids c-(SPLND) **8** bzw. deren Verhalten während der RMD-Simulation genannt (die ausführliche Darstellung der Struktur erfolgt in Kapitel 5.4.1, Seite 127ff). Das Peptid bildet einen γ^i -Turn mit Asp in $i+1$ -Position, dem ein etwas verzerrter β I-Turn mit Pro in $i+1$ gegenüberliegt. Das Peptidrückgrat ist während der RMD weitestgehend starr, mit Ausnahme der Peptidbindungen zwischen Asn und Asp sowie zwischen Asp und Ser. Diese zeigen in Nebenkonformationen abweichende Orientierungen, durch die der γ^i -Turn nicht ausgebildet wird. Die Unterschiede in den Atomkoordinaten sind jedoch so gering, dass sie bei einem RMSD-Clustering durch die Mittelung über das gesamte Rückgrat nicht detektiert werden können. Dies gilt für den üblicherweise verwendeten *cutoff* von 0.08 nm bis zu einem *cutoff* von nur 0.05 nm. Unterhalb dieses Wertes erhält man zwar eine Aufspaltung in mehrere Cluster, die jedoch auch aufgrund anderer minimaler Unterschiede entstehen, welche bei Betrachtung der Rückgratkonformation nicht signifikant sind. Es handelt sich also um ein klassisches Dilemma: Die Verwendung eines normalen *cutoff* liefert falsch negative Homogenität der Konformation, die Verwendung eines sehr kleinen *cutoff* hingegen falsch positive Heterogenität.

Der offensichtliche Ausweg ist die Anwendung eines Torsionswinkelkriteriums als Abstandsmaß für das Clustering. Dies sollte zur Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Strukturstudien aufbauend auf GROMOS++ implementiert und in den Arbeitsablauf der Konformationsanalyse integriert werden. Neben dieser wesentlichen Änderung werden einige weitere Verbesserungen an der bisherigen Methodik vorgenommen. Es resultiert das in Abschnitt 3.4 vorgestellte Protokoll für die Konformationsanalyse, das für alle Strukturanalysen dieser Arbeit Verwendung fand. Die detaillierte Beschreibung des entwickelten Programms zum Torsionswinkelclustering folgt in 3.5.

Angesichts der signifikanten Unterschiede zu früheren Protokollen stellt sich die Frage, welchen Einfluss die veränderte Methodik auf die letztlich erhaltenen Strukturmodelle hat. Zur Validierung des neuen Arbeitsablaufs wird dieser Frage in Abschnitt 3.6 anhand von fünf Cyclopeptiden nachgegangen.

3.2 Konformationsrelevante Parameter

3.2.1 Resonanzfrequenzen

Die Zuordnung der ^1H -Resonanzfrequenzen ist für kleinere Peptide mit Hilfe von ^1H -, ^1H , ^1H -COSY- und ^1H -, ^1H -TOCSY-Spektren unproblematisch. Im Falle von Signalüberlagerungen helfen heteronukleare Experimente wie ^1H , ^{13}C -HSQC bzw. HMQC und ^1H , ^{13}C -HMBC, die zudem die einfache Zuordnung der ^{13}C -Resonanzfrequenzen ermöglichen.

Anhand der chemischen Verschiebungen ist unter Umständen bereits eine Wahrscheinlichkeitsaussage über die Sekundärstruktur im Bereich der betreffenden Aminosäure möglich. Durch Analyse einer Reihe von Proteinstrukturen wurde beispielsweise eine empirische Korrelation zwischen C^α - und C^β -Verschiebungen und der Ausbildung von α -Helices und β -Faltblättern deutlich,^[132] die auch als Randbedingungen für Rechnungen verwendet wurden.^[133] Dies ist vor allem für größere Oligopeptide und Proteine möglich, während für kleinere Cyclopeptide die statistisch erfassten Sekundärstrukturen Helix und Faltblatt nicht von Bedeutung sind.

Für die Strukturaufklärung im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem die ^{13}C -Resonanzfrequenz der Atome C^β und C^γ von Prolin-Resten von Bedeutung, die Rückschlüsse auf die Konfiguration der Xaa-Pro-Peptidbindung erlaubt. Wie in Abschnitt 2.1.1 bereits erläutert, ist um die C-N-Peptidbindung aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters keine freie Rotation möglich. Es wird fast ausschließlich die energetisch begünstigte *trans*-Konfiguration eingenommen. Besonders für Xaa-Pro-Peptidbindungen ist es jedoch wegen der gegenüber anderen Peptidbindungen kleineren Energiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Konformer wichtig, die Konfiguration der Peptidbindung experimentell abzusichern. NMR-spektroskopisch sind hierbei neben ^{13}C -chemischen Verschiebungen charakteristische NOE nützlich. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 3.1 Alaninprolin in beiden Konfigurationen dargestellt.

Wie anhand der Abbildung leicht zu erkennen ist, sind bei *trans*-Konfiguration kurze Distanzen bzw. starke NOE zwischen den δ -Protonen des Pro und H^{N} sowie H^α der vorangehenden Aminosäure zu erwarten. Hingegen erlaubt die *cis*-Konfiguration engere Kontakte des Pro- H^α mit H^{N} und H^α des Vorgängers.^[134]

Aus der Literatur ist bekannt, dass C^γ des Pro im *cis*-Konformer stärker abgeschirmt als im *trans*-Konformer, gegenüber diesem im NMR also hochfeldverschoben zu finden sein sollte. Ferner ist für eine *cis*-Peptidbindung mit einer größeren Differenz $\Delta\delta(\text{C}^\beta, \text{C}^\gamma)$ zu rechnen (8–10 ppm) als für die *trans*-

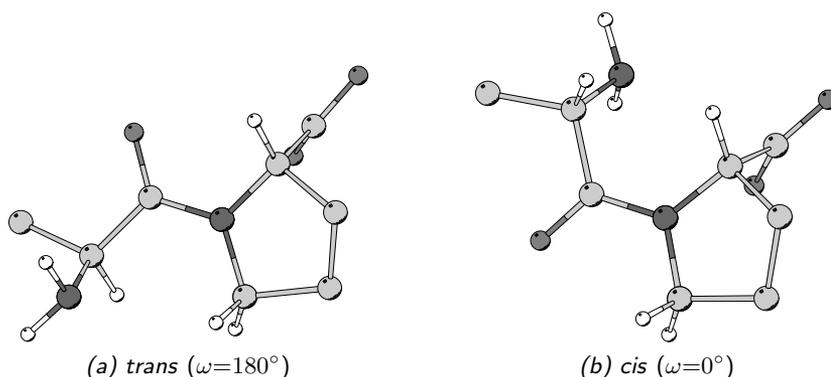


Abbildung 3.1: *cis/trans*-Konfiguration der Peptidbindung von Alanylprolin.

Konfiguration (5–6 ppm).^[135–137]

Mit Hilfe dieser Richtlinien ist in der Regel eine eindeutige Unterscheidung zwischen *trans*- und *cis*-Konfiguration möglich. Gute Beispiele für die Anwendung der genannten Betrachtungen sind die Prolin enthaltenden Peptide, welche in dieser Arbeit untersucht wurden. So erwies sich, dass die Ser-Pro-Bindung in *c*-(SPL ^{β} hND) **9** und *c*-(^{β} hSPL ^{β} hNID) **12** *cis*-Konfiguration aufweist, während *c*-(SPLND) **8** als *trans*-Isomer vorliegt. Für *c*-(RTL PFS) **7** sowie für *c*-(SPLNVD) **10** konnte gezeigt werden, dass eine auf der NMR-Zeitskala langsame *cis/trans*-Umwandlung für das Auftreten zweier Konformere und einhergehend die Beobachtung zweier Signalsätze verantwortlich ist.

3.2.2 Temperaturgradient der Amidprotonen

Der Temperaturgradient $\Delta\delta/\Delta T$ von Amidprotonen ermöglicht eine Aussage über die wahrscheinliche Ausrichtung des N-H-Bindungsvektors. Ist das Proton dem Lösungsmittel exponiert, findet man in der Regel Gradienten von weniger als -4 ppb K^{-1} . Wenn das Proton hingegen intern orientiert und gegenüber dem Lösungsmittel abgeschirmt ist, findet man Werte von mehr als -3 ppb K^{-1} . Dies kann ein Hinweis auf die Beteiligung des Protons an einer intramolekularen Wasserstoffbrücke und somit auf Sekundärstrukturen sein.^[61] Der genannte Wertebereich gilt für DMSO; in Wasser werden betragsmäßig größere Gradienten beobachtet.^[138]

Die in den Temperaturgradienten enthaltene Information über mögliche Wasserstoffbrücken kann als Randbedingung in die DG- und MD-Rechnungen einfließen^[139] oder, wie in dieser Arbeit, als nicht für die Verfeinerung benutztes Validierungskriterium verwendet werden.

3.2.3 Vicinale Kopplungskonstanten

Der Betrag von 3J -Kopplungskonstanten ist mit dem Torsionswinkel ϑ korreliert, der durch die vier an den drei Bindungen beteiligten Atome definiert ist. Der Zusammenhang wird durch eine Karplus-Funktion beschrieben:^[140,141]

$${}^3J = A \cos^2 \vartheta + B \cos \vartheta + C. \quad (3.1)$$

Die Parameter A , B und C sind dabei von den beteiligten Atomen abhängig und werden empirisch bestimmt.

Die Größe der ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten kann direkt dem ${}^1\text{H}$ -Spektrum entnommen werden. Sie ist mit dem Rückgrattorsionswinkel φ über die Karplus-Funktion

$${}^3J_{\text{HNH}\alpha} = (6.4 \cos^2 \vartheta - 1.4 \cos \vartheta + 1.9) \text{ Hz} \quad \text{mit} \quad \begin{aligned} \vartheta &= \varphi - 60^\circ \text{ (L-AS),} \\ \vartheta &= \varphi + 60^\circ \text{ (D-AS).} \end{aligned} \quad (3.2)$$

verknüpft.^[142] ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten können als *restraints* der Torsionswinkel für die Konformationsanalyse verwendet werden.^[143] Die Form der Karplus-Funktion impliziert allerdings die Schwierigkeit, dass für die meisten Werte der Kopplungskonstanten mehrere Torsionswinkel die Beziehung erfüllen. Die Berechnung einer Kopplungskonstante aus einem gegebenen Torsionswinkel liefert hingegen nur einen Wert. In dieser Arbeit werden die ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten daher nicht für die Rechnungen selbst, sondern als anschließendes Validierungskriterium verwendet.

Vicinale Kopplungskonstanten sind auch für die Zuordnung diastereotoper Protonen relevant, die für eine möglichst genaue Konformationsanalyse wünschenswert ist. Dabei sind besonders die β -Protonen von α -Aminosäuren bzw. die α -Protonen von β -Aminosäuren von Bedeutung. Werden mehrere Konformationen populiert, wie es für Aminosäureseitenketten aufgrund der geringen Rotationsbarriere um χ_1 oft der Fall ist, wird dies im NMR-Spektrum bei Raumtemperatur nicht aufgelöst. Ist jedoch ein Rotamer bevorzugt, so ist in vielen Fällen eine Unterscheidung zwischen diastereotopen Protonen mittels 3J -Kopplungskonstanten sowie NOE-Abstandsinformationen möglich. Mit Hilfe der Pachler-Gleichungen kann ferner eine Abschätzung der relativen Bedeutung eines jeden Rotamers erfolgen.^[144,145]

Zunächst sei die Zuordnung der β -Protonen einer L- α -Aminosäure betrachtet. Die energetisch bevorzugten Rotamere sind in Tabelle 3.1 dargestellt, zusammen mit den zu erwartenden ${}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}$ -Kopplungskonstanten, Proton-Proton-Distanzen und zugehöriger Pachler-Gleichung. Für das Rotamer mit

$\chi_1 = 60^\circ$ stehen beide β -Protonen *gauche* zu H^α , während für die Rotamere mit $\chi_1 = 180^\circ$ bzw. $\chi_1 = -60^\circ$ jeweils eine *gauche*- und eine *anti*-Anordnung vorhanden ist. Die ${}^3J_{H^\alpha H^\beta}$ -Kopplungskonstante ist stark vom Torsionswinkel $H^\alpha-C^\alpha-C^\beta-H^\beta$ abhängig. Sie variiert zwischen weniger als 4 Hz bei *gauche*-Konformation und mehr als 10 Hz für *anti*-Anordnung; die Extremwerte betragen ${}^3J_g = 2.60$ Hz und ${}^3J_a = 13.56$ Hz.^[145] Liegen also beide ${}^3J_{H^\alpha H^\beta}$ -Kopplungskonstanten unter 4 Hz, ist in jedem Fall $\chi_1 = 60^\circ$ bevorzugt. Zur Unterscheidung zwischen $\chi_1 = 180^\circ$ und $\chi_1 = -60^\circ$ müssen zusätzlich die NOE-Distanzen herangezogen werden.

Für D- α -Aminosäuren lässt sich analog das in Tabelle 3.2 dargestellte Zuordnungsschema aufstellen. Entsprechende Schemata für die Zuordnung diastereotoper α -Protonen von β -Aminosäuren sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 zu finden.

3.2.4 Nuclear Overhauser Effect

Der NOE ist die wichtigste Quelle experimenteller Informationen für die Konformationsanalyse mittels NMR-Spektroskopie. Wie in Abschnitt 2.3.3 bereits dargelegt, können durch Kalibrierung an ein geminales Protonenpaar mit dem Referenzabstand 178 pm aus den Volumenintegralen im NOESY oder ROESY direkt Interprotonenabstände erhalten werden (siehe Gleichung 2.46, Seite 44). Typischerweise können dabei NOE nur zwischen Protonen beobachtet werden, die nicht mehr als 500 pm voneinander entfernt sind.

Da die Approximation des NOE-Aufbaus durch eine lineare Funktion nur

Tabelle 3.1: Schema zur Zuordnung diastereotoper β -Protonen von L- α -Aminosäuren. Es ist ${}^3J_g = 2.60$ Hz und ${}^3J_a = 13.56$ Hz.^[145]

	$\chi_1 = 60^\circ$	$\chi_1 = 180^\circ$	$\chi_1 = -60^\circ$
${}^3J_{H^\alpha H^\beta 2}/\text{Hz}$	< 4	< 4	> 10
${}^3J_{H^\alpha H^\beta 3}/\text{Hz}$	< 4	> 10	< 4
$d_{H^\alpha H^\beta}$	$\beta^2 \approx \beta^3$	$\beta^2 < \beta^3$	$\beta^2 > \beta^3$
$d_{H^N H^\beta}$	$\beta^2 > \beta^3$	$\beta^2 \approx \beta^3$	$\beta^2 < \beta^3$
$P(\chi_1)$	$1 - P(-60^\circ) - P(180^\circ)$	$\frac{{}^3J_{H^\alpha H^\beta 3} - {}^3J_g}{{}^3J_a - {}^3J_g}$	$\frac{{}^3J_{H^\alpha H^\beta 2} - {}^3J_g}{{}^3J_a - {}^3J_g}$

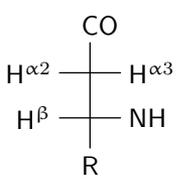
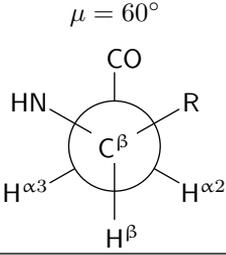
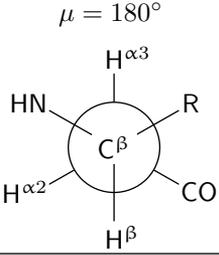
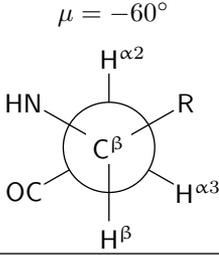
Tabelle 3.2: Schema zur Zuordnung diastereotoper β -Protonen von D- α -Aminosäuren.

	$\chi_1 = 60^\circ$	$\chi_1 = 180^\circ$	$\chi_1 = -60^\circ$
${}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta^2}/\text{Hz}$	< 4	> 10	< 4
${}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta^3}/\text{Hz}$	> 10	< 4	< 4
$d_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}$	$\beta^2 < \beta^3$	$\beta^2 > \beta^3$	$\beta^2 \approx \beta^3$
$d_{\text{H}\text{N}\text{H}\beta}$	$\beta^2 > \beta^3$	$\beta^2 \approx \beta^3$	$\beta^2 < \beta^3$
$P(\chi_1)$	$\frac{{}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta^3} - {}^3J_g}{{}^3J_\alpha - {}^3J_g}$	$\frac{{}^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta^2} - {}^3J_g}{{}^3J_\alpha - {}^3J_g}$	$1 - P(60^\circ) - P(180^\circ)$

Tabelle 3.3: Schema zur Zuordnung diastereotoper α -Protonen von L- β -Aminosäuren.

	$\mu = 60^\circ$	$\mu = 180^\circ$	$\mu = -60^\circ$
${}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha^2}/\text{Hz}$	< 4	> 10	< 4
${}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha^3}/\text{Hz}$	> 10	< 4	< 4
$d_{\text{H}\beta\text{H}\alpha}$	$\alpha^2 < \alpha^3$	$\alpha^2 > \alpha^3$	$\alpha^2 \approx \alpha^3$
$d_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$	$\alpha^2 > \alpha^3$	$\alpha^2 \approx \alpha^3$	$\alpha^2 < \alpha^3$
$P(\chi_1)$	$\frac{{}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha^3} - {}^3J_g}{{}^3J_\alpha - {}^3J_g}$	$\frac{{}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha^2} - {}^3J_g}{{}^3J_\alpha - {}^3J_g}$	$1 - P(60^\circ) - P(180^\circ)$

Tabelle 3.4: Schema zur Zuordnung diastereotoper α -Protonen von D- β -Aminosäuren.

	$\mu = 60^\circ$	$\mu = 180^\circ$	$\mu = -60^\circ$
			
${}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha 2}/\text{Hz}$	< 4	< 4	> 10
${}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha 3}/\text{Hz}$	< 4	> 10	< 4
$d_{\text{H}\beta\text{H}\alpha}$	$\alpha^2 \approx \alpha^3$	$\alpha^2 < \alpha^3$	$\alpha^2 > \alpha^3$
$d_{\text{H}\text{N}\text{H}\alpha}$	$\alpha^2 > \alpha^3$	$\alpha^2 \approx \alpha^3$	$\alpha^2 < \alpha^3$
$P(\chi_1)$	$1 - P(-60^\circ) - P(180^\circ)$	$\frac{{}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha 3} - {}^3J_g}{{}^3J_a - {}^3J_g}$	$\frac{{}^3J_{\text{H}\beta\text{H}\alpha 2} - {}^3J_g}{{}^3J_a - {}^3J_g}$

für kürzere Mischzeiten gerechtfertigt ist, werden NOE-Spektren bei verschiedenen Mischzeiten aufgenommen. Die Linearität wird durch die Integration einer Auswahl von Kreuzsignalen aus verschiedenen Bereichen des Spektrums und anschließende Auftragung gegen die Mischzeit überprüft. Die Auswahl eines NOESY mit geeigneter Mischzeit minimiert den Fehler durch die Approximation. Die erhaltenen Distanzinformationen haben den Charakter oberer Schranken^[146] und fließen als solche mit einer Toleranz von 10% in MD-Rechnungen ein.

Oft ist es nötig, NOE zu bezeichnen, die sich auf Protonen in äquivalenten oder nicht stereospezifisch zugeordneten Positionen befinden. Hierfür wird das Konzept des Pseudoatoms verwendet, das ein imaginäres Atom im Koordinatensystem der realen Atome als Bezugspunkt definiert. Dies erfordert eine zusätzliche Toleranz des Abstands. In dieser Arbeit werden für die Nomenklatur der Pseudoatome die IUPAC-Empfehlungen verwendet,^[147] welche in Tabelle 3.5 wiedergegeben sind, zusammen mit den von GROMOS96 verwendeten Pseudoatomkorrekturen.

Auch für die Bezeichnung diastereotoper Protonen als $\text{H}^{\beta 2}$ und $\text{H}^{\beta 3}$ werden die die Empfehlungen der IUPAC verwendet:^[148] Ein tetraedrisches Kohlenstoffatom habe die Substituenten X , Y , Z und Z' mit den Prioritäten $X > Y > Z = Z'$; dann erhalten beim Blick entlang der X -C-Achse die Substituenten Z und Z' die Nummern 2 und 3, so dass Y , Z und Z' im Uhrzeigersinn angeordnet sind. Diese Nomenklatur ist der Bezeichnung als pro-(R) und pro-(S) überlegen, da z. B. die Prochiralität von $\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ von der restlichen Seitenkette abhängt. Nur durch Verwendung der IUPAC-Nomenkla-

Tabelle 3.5: Pseudoatomnomenklatur nach IUPAC,^[147] entsprechende GROMOS96-Atomtypen und Pseudoatomkorrekturen c_p .^[77]

Aminosäure	Pseudoatom	repräsentierte ¹ H Atome	Typ	c_p /nm
Ala	M ^β	β-Methyl	5	0.10
Arg	Q ^β , Q ^γ , Q ^δ	β-, γ-, δ-Methylen	3	0.09
	Q ^{η1} , Q ^{η2}	η ¹¹ und η ¹² , η ²¹ und η ²²	*	*
Asn	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
	Q ^δ	δ-Amino	*	*
Asp	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
Cys	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
Gln	Q ^β , Q ^γ	β-, γ-Methylen	3	0.09
	Q ^ε	ε ² -Amino	*	*
Glu	Q ^β , Q ^γ	β-, γ-Methylen	3	0.09
Gly	Q ^α	α-Methylen	3	0.09
His	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
Ile	M ^γ , M ^δ	γ ² -, δ ¹ -Methyl	5	0.10
	Q ^γ	γ ¹ -Methylen	3	0.09
Leu	M ^{δ1} , M ^{δ2}	δ ¹ -, δ ² -Methyl	5	0.10
	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
	Q ^δ	alle δ-Methyl	6	0.22
Lys	Q ^β , Q ^γ , Q ^δ , Q ^ε	β-, γ-, δ-, ε-Methylen	3	0.09
	Q ^ζ	ζ-Amino	*	*
Met	Q ^β , Q ^γ	β-, γ-Methylen	3	0.09
	M ^ε	ε-Methyl	5	0.10
Phe, Tyr	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
	Q ^δ , Q ^ε	δ ¹ - und δ ² -Ring, ε ¹ - und ε ² -Ring	0	0.21
	Q ^ρ	alle Ring	–	–
Pro	Q ^β , Q ^γ , Q ^δ	β-, γ-, δ-Methylen	3	0.09
Ser	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
Thr	M ^γ	γ ² -Methyl	5	0.10
Trp	Q ^β	β-Methylen	3	0.09
Val	M ^{γ1} , M ^{γ2}	γ ¹ -, γ ² -Methyl	5	0.10
	Q ^γ	alle γ-Methyl	6	0.22

*Diese Pseudoatomen haben keine exakte Entsprechung in GROMOS. Sie können als Typ 6 mit einer Korrektur von 0.22 nm eingesetzt werden, die etwas größer ist als eigentlich erforderlich.

tur sind allgemein gültige Beschreibungen wie die Schemata zur Zuordnung diastereotoper Protonen möglich (Tabellen 3.1 bis 3.4).

Bezüglich der Verwendung von NOE-*restraints* in MD-Simulationen ist noch ein weiterer Punkt anzumerken: Falls das untersuchte Molekül in verschiedenen Konformationen vorliegt, die sich schnell im Verhältnis zur NMR-Zeitskala ineinander umwandeln, wird im NOESY ein dem gewichteten Mittel entsprechendes Signal detektiert. Dies kann dazu führen, dass ein Satz experimenteller Daten nicht durch eine einzelne Struktur erfüllt werden kann, das System aber durch die entsprechenden *restraints* in einer Konformation gefangen bleibt, die keiner der realen Konformationen entspricht. Die Verwendung zeitlich gemittelter *restraints* anstelle der momentanen Distanzen ist bei der Behandlung dieser Probleme hilfreich. Dies erlaubt dem System eher die Fluktuation zwischen Konformationen, die nur im zeitlichen Mittel die Distanzvorgaben erfüllen, und somit eine realistischere Repräsentation der tatsächlichen Struktur. Die Verwendung zeitlich gemittelter *restraints* ist heute Standard in MD-Simulationen^[149,150] und wird in dieser Arbeit für alle RMD-Rechnungen verwendet.

Die Ausbildung von Sekundärstrukturen in Peptiden bedingt definierte Abstände zwischen bestimmten Protonen, die zu entsprechend starken Kreuzsignalen im NOESY führen. Für die wichtigsten Turnstrukturen sind diese in Abbildung 3.2 zusammengestellt, wobei starre, den Referenzgeometrien (Tabelle 2.1, S. 9) entsprechende Strukturen angenommen werden. Das Schema ist nicht auf Ψ -Turns übertragbar, da sich die Abstände durch das zusätzliche Rückgratatom ändern.

	γ		γ^i		βI			$\beta I'$			βII			$\beta II'$			$\beta II'D$			βVIa			βVIb		
$i+n$	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
d_{HNNH}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$d_{\text{H}\alpha\text{HN}}$	—	■	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Abbildung 3.2: Sequentielle und zwischen den Aminosäuren in $i+1$ und $i+3$ zu beobachtende NOE der wichtigsten Turnstrukturen. Die obenstehenden Zahlen bezeichnen die Position im Turn ($i+1$, $i+2$, $i+3$). Verbindende Linien repräsentieren NOE, wobei die Linienstärke zu r^{-6} und damit zur Intensität im NOESY proportional ist. Die zugrundeliegenden Abstände ergeben sich aus den Referenzgeometrien entsprechenden Turns. Im mit $\beta II'D$ bezeichneten Turn hat die Aminosäure in $i+1$ D-Konfiguration; die zu erwartenden NOE stimmen mit denen eines βII -Turns nahezu überein. Für γ - und βVIa -Turns gibt es keine charakteristischen NOE. Allen β -Turns ist ein Abstand der Amidprotonen (sofern vorhanden) in $i+2$ und $i+3$ zwischen 240 und 260 pm gemein.

3.3 Generierung der Startstruktur

Beim Übergang von den experimentellen Daten aus der NMR-Spektroskopie zu MD-Rechnungen ist die Wahl der Startstruktur von entscheidender Bedeutung. Es existieren eine Reihe von Verfahren, geeignete Startstrukturen unter Berücksichtigung der experimentellen Randbedingungen und möglichst vollständiger Abdeckung des Konformationsraums zu generieren; die wichtigsten werden im Folgenden beschrieben.

3.3.1 Systematische Suche

Bei der systematischen Suche wird durch regelmäßige und exakt definierte Variation konformationeller Merkmale der Konformationsraum durchsucht. Für Peptide ist es üblich, den φ - und/oder den ψ -Winkel in definierten Intervallen zu variieren. Da das Molekül nach der Rotation in der Regel erhebliche Abweichungen vom nächstgelegenen Energieminimum aufweist, schließt sich eine Energieminimierung mit einem der in 2.2.2 beschriebenen Verfahren an. Eine systematische Suche besteht also aus einer großen Zahl von Energieminimierungen, wobei die Startstrukturen in regelmäßigen Abständen auf der Energiehyperfläche des Moleküls zu finden sind. Man spricht deshalb auch von einer Rastersuche (*grid search*). Bei der Analyse der erhaltenen Strukturen wird dann neben der konformationellen Energie im verwendeten Kraftfeld auch die Erfüllung der experimentellen Randbedingungen in die Beurteilung einbezogen.

Eine systematische Suche liefert mit hoher Wahrscheinlichkeit die bestmögliche Lösung, falls das Raster fein genug gewählt wurde. Ein zu grobes Raster kann allerdings dazu führen, dass gute Lösungen nicht gefunden werden können. Das Hauptproblem der systematischen Suche ist ihr Rechenaufwand, der exponentiell mit der Anzahl N der Torsionswinkel ansteigt:

$$\text{Anzahl der Konformationen} = \prod_{i=1}^N \frac{360^\circ}{\vartheta_i}, \quad (3.3)$$

wobei ϑ_i das für den Torsionswinkel i gewählte Inkrement bezeichnet. Es ist auch kaum möglich, die Rechenzeit durch Verwerfen aussichtsloser Startpunkte zu verkürzen, da die Validierung anhand der experimentellen Randbedingungen erst nach Abschluss des aktuellen Schrittes erfolgen kann. Daher werden meist Verfahren bevorzugt, die zwar keine Abdeckung des gesamten Konformationsraums garantieren können, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit in kurzer Zeit gute Lösungen finden. Ein Beispiel hierfür ist die Distanzgeometrie.

3.3.2 Distanzgeometrie

Die Beschreibung der Konformation eines Moleküls kann durch die Abstände zwischen allen Paaren von Atomen erfolgen. Für N Atome sind dies $\frac{1}{2}N(N-1)$ Paare, die im Computer am einfachsten als $N \times N$ Matrix repräsentiert werden. Die Distanzgeometrie erzeugt – in gewissen Grenzen – zufällige Distanzmatrizen, die anschließend in kartesische Koordinaten transformiert werden. Entscheidend ist die Tatsache, dass die interatomaren Abstände nicht unabhängig voneinander, sondern in hohem Maße korreliert sind. Bindungslängen sind kaum variabel; Winkel und Torsionswinkel führen zu einer Restriktion der interatomaren Abstände. Weiterhin kann der Minimalabstand zwischen zwei Atomen als die Summe der van der Waals Radien angenommen werden.

Eine DG-Rechnung erfolgt in vier Schritten.^[151,152] Zunächst werden Matrizen berechnet, die für alle Atome die oberen und unteren Schranken der Abstände enthalten. Nun wird zufällig eine Matrix generiert, deren Elemente zwischen dem jeweils erlaubten Maximum und Minimum liegen. Diese Matrix wird im dritten, dem sogenannten Einbettungsschritt (*embedding*) in kartesische Koordinaten konvertiert. Bei chiralen Molekülen ist besonders darauf zu achten, dass das richtige Enantiomer erhalten wird, da beide Enantiomere durch dieselbe Distanzmatrix repräsentiert werden. Der letzte Schritt ist eine Energieminimierung, wobei oft eine Kombination mit dem *simulated annealing* Verfahren erfolgt (siehe 3.3.3).

Das Gesagte lässt ahnen, warum die DG ein natürlicher Partner der NMR-Spektroskopie ist: Mittels NOESY gewonnene experimentelle Distanzinformationen können auf triviale Weise in die Berechnung der erlaubten Abstandsintervalle einfließen. Da auch Winkel, Torsionswinkel und Wasserstoffbrücken in Form von Abstandsvorgaben spezifiziert werden können, gilt dies auch für die weiteren in 3.2 aufgeführten konformationsrelevanten NMR-Parameter.

Die DG verwendet Matrizen mit N^2 Elementen, so dass der Rechenaufwand nicht exponentiell, sondern nur quadratisch mit der Systemgröße skaliert. Dadurch ist sie auch für größere Moleküle auf Standardcomputern anwendbar, deren Behandlung mit systematischen Verfahren selbst auf Hochleistungsrechnern unpraktikabel ist.

Da es sich bei der DG um ein zufälliges Verfahren handelt, ist es nicht garantiert, dass alle möglichen Lösungen des Problems gefunden werden. Daher werden sehr viele Berechnungen für eine jeweilige Eingabe durchgeführt, um den Konformationsraum möglichst gut abzudecken, was aufgrund des geringen Rechenaufwandes leicht möglich ist. Eine Homogenität der Lösungen macht dabei eine gute Bestimmung der Konformation durch die Randbedingungen wahrscheinlich.

3.3.3 *Simulated Annealing*

Annealing ist eine Optimierungsmethode, welche beispielsweise in der Metallurgie Verwendung findet. Unter vorsichtigem Abkühlen, vor allem an der Grenze zwischen dem festen und dem flüssigen Aggregatzustand, werden besonders regelmäßige Kristallstrukturen erhalten.

In der Simulation am Computer wird versucht, durch allmähliche Variation eines Kontrollparameters eine Kostenfunktion zu optimieren.^[153] Im Falle der Konformationsanalyse ist der Kontrollparameter die Temperatur, die Kostenfunktion die Energiefunktion des Kraftfeldes. Nach einer Aufheizphase wird dem System erlaubt, andere Konformationen einzunehmen, wozu MD- oder auch Monte-Carlo-Berechnungen in Frage kommen. Aufgrund der hohen Temperatur (typischerweise zwischen 1000 und 2000 K) können dabei Energiebarrieren überwunden werden, die das System bei niedriger Temperatur im lokalen Minimum halten würden. Es schließt sich eine Abkühlungsphase an, so dass das System schonend in ein Minimum gleitet. Hauptparameter eines SA sind die Temperatur und die Dauer der Hochtemperaturphase sowie die Geschwindigkeit des Abkühlungsprozesses.

Auch das SA ist eine zufällige Methode, die keine optimale Lösung garantiert. Gegenüber einfachen Energieminimierungsalgorithmen bietet es den Vorteil, dass lokale Minima verlassen werden können. Es wird oft nach dem Einbettungsschritt mit DG-Verfahren kombiniert, um eine noch bessere Abdeckung des Konformationsraums zu erreichen. Wie die Methode des *random simulated annealing* zeigt, ist es sogar möglich, von zufälligen Startkoordinaten ausgehend mittels SA sinnvolle, gegebene experimentelle Randbedingungen erfüllende Strukturen zu erhalten.^[154]

3.4 Strategie der Konformationsanalyse

Die Strukturaufklärung mittels NMR und MD ist die zentrale Methode dieser Arbeit. Daher wurden zunächst die in früheren Arbeiten verwendeten Arbeitsgänge für die Konformationsanalyse einer Überarbeitung unterzogen, die die in den vorigen Abschnitten dargelegten theoretischen Aspekte und die deutlich gestiegene Rechenleistung der verfügbaren Computer berücksichtigte. Die folgenden Hauptanforderungen wurden für das überarbeitete Schema formuliert:

- Clustering anhand eines Torsionswinkelkriteriums,
- Generierung der Startstruktur mittels DG/SA,
- ausreichend lange Simulationszeiten mit explizitem Solvens.

Dies führte zu dem in Abbildung 3.3 schematisch dargestellten Arbeitsgang. Nach der Extraktion der konformationsrelevanten Parameter aus den NMR-Spektren werden anhand der NOE-Distanzen 1000 Strukturen generiert. Als Software für die DG wurde das XPLOR-NIH-Programmpaket gewählt,^[155] eine Weiterentwicklung des bewährten, auf einem CHARMM-Kraftfeld basierenden XPLOR.^[156] Dieses bietet mit VMD-XPLOR^[157] den zusätzlichen Vorteil einer engen Integration mit dem Visualierungsprogramm VMD.^[158]

Es folgt ein Clustering-Schritt, bei dem die Strukturen entsprechend ihrer φ - und ψ -Torsionswinkel mit einem *cutoff* von 60° in Familien gruppiert wer-

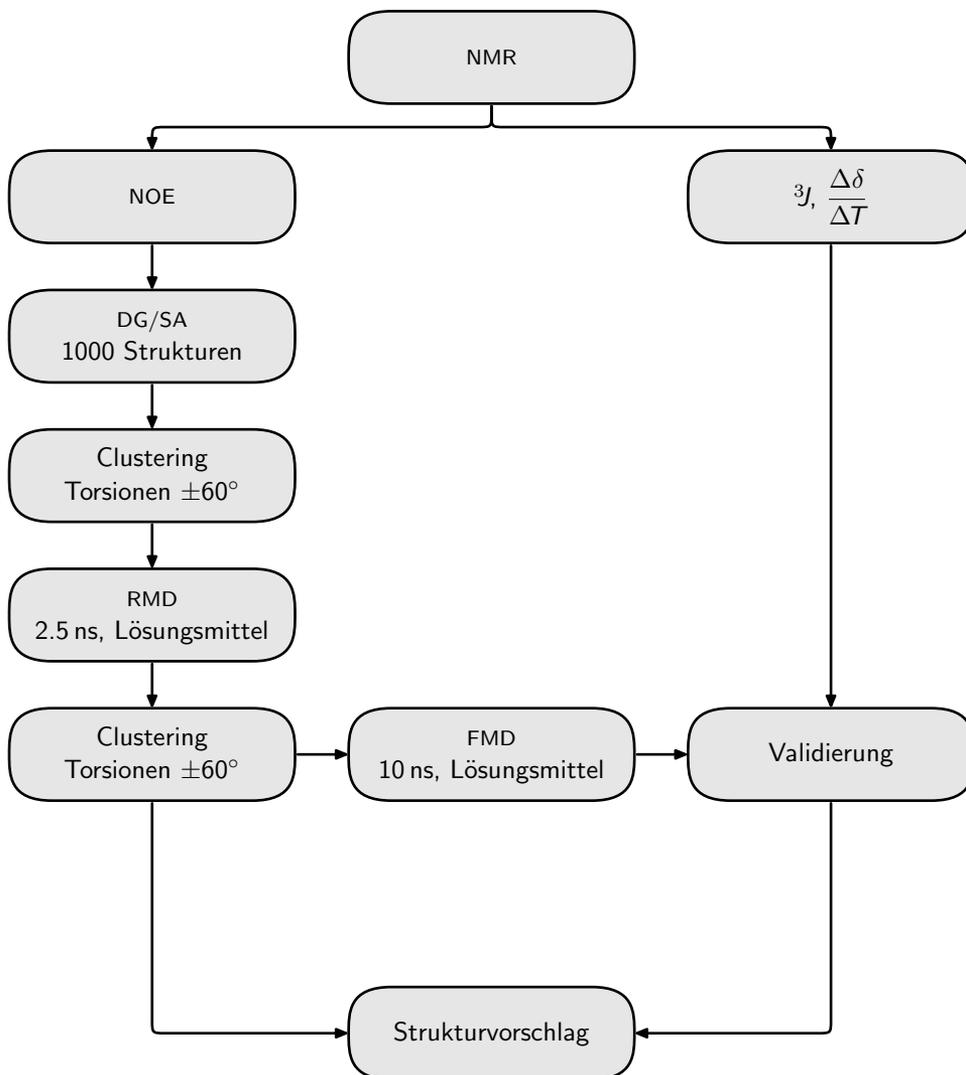


Abbildung 3.3: Schema der Konformationsanalyse, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

den. Für Prolin wird zusätzlich der ω -Winkel, für β -Aminosäuren auch der μ -Winkel einbezogen. Die zentralen Strukturen der erhaltenen Cluster werden anschließend als Startstrukturen von RMD-Simulationen verwendet, die in einer Box mit expliziten Solvensmolekülen für 2.5 ns mit GROMOS96^[78] durchgeführt werden. Es folgt erneut ein Clustering mit einem Torsionswinkelkriterium von $\pm 60^\circ$, das zu einem oder mehreren Strukturvorschlägen für das untersuchte Peptid führt. Eine FMD-Simulation über 10 ns in explizitem Solvens und die Übereinstimmung mit den aus den NMR-Spektren erhaltenen $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten dient zur Validierung der erhaltenen Vorschläge.

Als zentraler Punkt der Überarbeitung erwies sich die Einarbeitung des Torsionswinkelclusterings, die im folgenden Abschnitt detailliert geschildert wird.

3.5 Torsionswinkelclustering

3.5.1 Vorüberlegungen

Clustering-Algorithmen verwenden eine Distanzfunktion als Ähnlichkeitsmaß, die beliebig definiert werden kann. Es besteht daher kein prinzipieller Unterschied zwischen einem Clustering anhand der paarweisen RMSD-Werte der Koordinaten oder der paarweisen Differenz eines Torsionswinkels. Das für die Analyse der Trajektorien verwendete Programm RMSDMAT aus dem zu GROMOS gehörenden Analysepaket GROMOS++^[79] stellte jedoch zunächst nur die Berechnung einer auf kartesischen Koordinaten basierenden Abstandsmatrix zur Verfügung. Die Entwicklergruppe von van Gunsteren und Hünenberger an der ETH Zürich war den für ein Torsionswinkelclustering nötigen Erweiterungsvorschlägen gegenüber aufgeschlossen, so dass in der für diese Arbeit verwendeten Version auch die Erstellung einer Abstandsmatrix für beliebige Abstände, Winkel und Torsionswinkel möglich war.

Es blieb jedoch das keineswegs triviale Problem zu lösen, wie die Einordnung in Cluster anhand *mehrerer* Torsionswinkel erfolgen kann. Die Betrachtung der mittleren Abweichung würde zu ähnlichen Problemen führen, wie sie beim Koordinaten-RMSD-Clustering zu beobachten sind: Lokale Unterschiede können durch die Mittelung undetektierbar werden, es sei denn, man verwendete einen sehr kleinen *cutoff*, was wiederum zu vielen fälschlicherweise als unterschiedlich klassifizierten Strukturen führen würde. Dadurch wäre der optimale *cutoff* auch von der Anzahl N der zu clusternden Torsionswinkel abhängig und müsste für jedes N empirisch optimiert werden.

Daher werden die für das Clustering zu berücksichtigenden Torsionswinkel

sukzessive abgearbeitet. Die aus einem Schritt resultierenden Strukturfamilien werden separat als Eingabe für das Clustering bezüglich der verbleibenden Torsionswinkel verwendet, wie es in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt ist. Somit finden sich nach dem letzten Schritt in jedem Cluster diejenigen Strukturen, welche für alle untersuchten Torsionswinkel im Rahmen des verwendeten *cutoff* übereinstimmen. Der „geschwindigkeitsbestimmende Schritt“ des Algorithmus ist dabei die Aufstellung der Distanzmatrix, die quadratisch von der Anzahl N der zu clusternden Strukturen abhängt. Zudem skaliert der Algorithmus linear mit der Anzahl der zu clusternden Torsionswinkel.

Das zu erstellende Programm für das Torsionswinkelclustering sollte auf die im Analysepaket GROMOS++ enthaltenen Programme RMSDMAT und CLUSTER aufbauen und möglichst plattformunabhängig einsetzbar sein. Für die Implementierung wurde daher die Sprache PERL gewählt, die standardmäßig auf jedem UNIX-artigen System vorhanden und auch für alle anderen gängigen Betriebssysteme frei verfügbar ist. Diese ist auf die Verarbeitung großer Datenmengen in Textform ausgelegt und daher für die Prozessierung der GROMOS++-Ausgaben bestens geeignet.

3.5.2 Das Paket TORCL

Im Zuge der Implementierung ergaben sich viele weitere Aspekte, wie die folgende Programmbeschreibung zeigen wird. Anstelle eines einzigen kleinen Programms stand am Ende eine Sammlung von Skripten und Modulen, die hier unter dem Namen TORCL zusammengefasst werden. Diese sind im Wesentlichen:

- `property_cluster`

Das Hauptprogramm für das Torsionswinkelclustering. Wie der Name

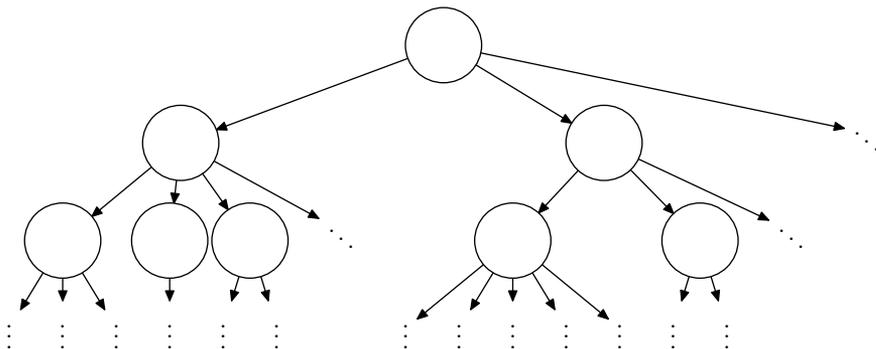


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des sukzessiven Clusterings.

impliziert, ist es nicht auf Torsionswinkel beschränkt, sondern kann alle von GROMOS++ unterstützten Eigenschaften für das Clustering verwenden. Es wird im folgenden Unterabschnitt genauer beschrieben.

- **noe_clusters**

Mit diesem Programm kann eine separate Analyse der einzelnen Cluster bezüglich ihrer NOE-Verletzungen erfolgen; auch ein gewichtetes Mittel wird berechnet. Hier zeigte sich in dieser Arbeit durchgehend, dass bei denjenigen Peptiden, für welche verschiedene Konformationen beobachtet wurden, das gewichtete Mittel die experimentellen Randbedingungen signifikant besser erfüllte als jeder einzelne Cluster. Die reale Struktur wird also durch ein Ensemble von Konformationen in der Tat besser angenähert als durch eine Einzelstruktur.

- **hbond_clusters**

Eine separate Analyse der erhaltenen Cluster ist nötig, da sich diese im Bezug auf die Rückgrattorsionen unterscheiden und somit verschiedene Wasserstoffbrückenmuster ausbilden können.

- **karpluscalc**

Ein Hilfsprogramm, um aus den beobachteten Torsionswinkel anhand der Karplus-Funktion den zu erwartenden Normalbereich der ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstante zu errechnen.

- **gromospp.pm**

In diesem PERL-Modul sind die zentralen Ein-, Ausgabe- und Berechnungsroutinen zusammengefasst. Dies erlaubt die gemeinsame Verwendung des gleichen Codes durch die oben genannten und mögliche weitere Programme.

3.5.3 property_cluster

Die prinzipielle Vorgehensweise des Programms ist recht einfach. Es durchläuft nacheinander für jede zu clusternde Eigenschaft eine Schleife, in der es jeden Cluster des vorangegangenen Schrittes einzeln bearbeitet. Dabei wird RMSDMAT mit der aktuellen Eigenschaft und anschließend CLUSTER aufgerufen, dessen Ergebnisse der Liste der Cluster für die nächste Eigenschaft hinzugefügt werden. Vereinfacht läuft ein Programmdurchlauf nach folgendem Schema ab:

```
Verarbeitung der Eingabeparameter und -dateien
∀ Eigenschaften {
    ∀ Cluster {
        RMSDMAT
```

```

        CLUSTER
        verwerfe zu kleine Cluster
        speichere Ergebnisse für nächste Eigenschaft
    }
}
Berechnung der Statistik
Erstellen der Ausgabe

```

Dabei werden Cluster verworfen, die weniger als eine absolut oder relativ zur Größe der Trajektorie wählbare Anzahl Strukturen enthalten. Eine Schwierigkeit ist die Aufrechterhaltung des Bezugs zur Nummerierung der Strukturen in der ursprünglichen Trajektorie, die von der Nummerierung des aktuell prozessierten Clusters abweicht. Hierzu pflegt `property_cluster` eine Übersetzungstabelle.

Dem Programm müssen beim Aufruf die zu verwendende Topologie, die Randbedingungen der Simulation (periodisch, Vakuum), die Eingabetrajektorie sowie eine Datei mit Informationen über die zu clusternden Eigenschaften übergeben werden. In dieser sind, durch `||` separiert, für jede Eigenschaft ein frei wählbarer Bezeichner sowie die RMSDMAT und CLUSTER zu übergebenden Argumente aufgelistet:

```

1phi || @type property @prop t%1:43,1,3,7 @atomsrmsdpos 1 || @cut 60
1psi || @type property @prop t%1:1,3,7,9 @atomsrmsdpos 1 || @cut 60
1omg || @type property @prop t%1:3,7,9,10 @atomsrmsdpos 1 || @cut 60
2phi || @type property @prop t%1:7,9,10,14 @atomsrmsdpos 1 || @cut 60
2psi || @type property @prop t%1:9,10,14,16 @atomsrmsdpos 1 || @cut 60
...

```

Auf diese Weise sind alle von RMSDMAT unterstützten Eigenschaften zugänglich, und es kann für jede Eigenschaft ein individueller *cutoff* gesetzt werden.

Bei der Verarbeitung der Endergebnisse musste eine Definition der zentralen Struktur eines Clusters gefunden werden. Für jeden Einzelschritt gilt beim von CLUSTER verwendeten Algorithmus,^[159] dass die zentrale Struktur die einzige Struktur des Clusters ist, deren Abstand von jeder anderen Struktur im Cluster mit Sicherheit kleiner als der *cutoff* ist. Dies ist bei der Vorgehensweise von `property_cluster` nicht für alle Eigenschaften garantiert, sondern nur für die zuletzt bearbeitete. Um eine für den Cluster möglichst repräsentative Struktur als zentrale Struktur zu erhalten, wurde die folgende Straffunktion P (Englisch *penalty*) für die Abweichung von einer fiktiven Struktur definiert,

deren Eigenschaften exakt den Mittelwerten entsprechen würden:

$$P(x) = \sum_{i=1}^n \frac{x_i - \bar{x}_i}{\sigma_i}. \quad (3.4)$$

Dabei ist x_i der Wert der Eigenschaft i für die Struktur x , \bar{x}_i der Mittelwert der Eigenschaft i des jeweiligen Clusters und σ_i die zugehörige Standardabweichung. Die Struktur mit dem kleinsten P wird als zentrale Struktur des Clusters definiert. Die Gewichtung der Differenz zum Mittelwert durch dessen Standardabweichung stellt sicher, dass Abweichungen von stärker fluktuierenden Eigenschaften weniger Einfluss auf P haben als von enger umgrenzten.

Die Berechnung des Mittelwertes eines Satzes von Winkeln ist dabei ebenfalls nicht trivial. Eine simple arithmetische Mittelung führt wegen der Periodizität von Winkeln zu unsinnigen Ergebnissen. Beispielsweise ist ein sinnvoller Mittelwert von -179° und 179° nicht das arithmetische Mittel 0° , sondern 180° . `property_cluster` berechnet den Mittelwert von n Werten für den Winkel ϑ daher gemäß der Formel

$$\bar{\vartheta} = \arctan \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sin \vartheta_i, \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \cos \vartheta_i \right). \quad (3.5)$$

Die tabellarische Ausgabe von `property_cluster` umfasst die berechneten Statistiken für den Mittelwert und für die zentrale Struktur jedes Clusters, außerdem wird eine gewichtete Gesamtstatistik berechnet. Beim Torsionswinkelclustering erfolgt außerdem ein Vergleich der erhaltenen Werte auf Übereinstimmung mit Referenzwerten für Sekundärstrukturen, wie sie in Tabelle 2.1 auf Seite 9 definiert werden. Dabei wird eine Toleranz von standardmäßig $\pm 30^\circ$ erlaubt; die Cyclizität des Peptids wird gegebenenfalls berücksichtigt. Eine Beispielausgabe ist in Abbildung 3.5 abgedruckt. Daneben erzeugt `property_cluster` noch Ausgabedateien, die für eine graphische Aufbereitung der Ergebnisse mit `GNUPLOT` verwendet werden können.

Abschließend ist noch die Ausgabe der erwarteten Bereiche für die ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten zu erläutern. Hierfür wird die bereits in Gleichung 3.1 vorgestellte, an BPTI (Basischer pankreatischer Trypsin-Inhibitor) parametrisierte Karplus-Funktion zur Berechnung des Idealwerts verwendet.^[142] Um eine Abschätzung der Fehlergrenzen zu erhalten, wurde eine Karplus-Funktion an die Originaldaten mittels nichtlinearer Regression in `GNUPLOT` angepasst, um die Standardabweichung der Parameter A , B und C zu bestimmen. Die sich ergebenden Maximal- und Minimalwerte für 3J werden von `property_cluster` ebenfalls ausgegeben.

```

-----
Cluster 1 with 911 members (73.88% of trajectory)
Center: ( 801) | 1phi | 1psi | 1omg | 2phi | 2psi | 3phi | 3psi | 4phi | 4psi | 5phi | 5psi |
Min:          | -174 | -174 | 162 | -59 | -0 | -100 | -79 | -106 | -105 | -76 | 55 |
Max:          | 145 | 150 | 135 | -96 | -47 | -158 | -157 | -151 | -148 | -130 | -30 |
Mean:         | -104 | -134 | 176 | -30 | 51 | -56 | -37 | -39 | -28 | -42 | 89 |
StdDev:       | -173 | -171 | 158 | -58 | -12 | -102 | -77 | -104 | -101 | -77 | 46 |
3JHMA:        | 15 | 11 | 6 | 10 | 17 | 18 | 20 | 19 | 21 | 14 | 17 |
Secondary structure elements (mean values):
gi 5phi -77 ( -79+2 ) 5psi 46 ( 69-23 )
-----
Secondary structure elements (central structure):
gi 5phi -76 ( -79+3 ) 5psi 55 ( 69-14 )
-----
Cluster 2 with 168 members (13.63% of trajectory)
.
.
.
And this for the weighted trajectory (only frames in clusters).
'Central structure' is meaningless.
-----
Cluster 1 with 1178 members (95.54% of trajectory)
Center: ( 713) | 1phi | 1psi | 1omg | 2phi | 2psi | 3phi | 3psi | 4phi | 4psi | 5phi | 5psi |
Min:          | 145 | 143 | 129 | -96 | -61 | -169 | -157 | -161 | -100 | -73 | 40 |
Max:          | -4 | -131 | -165 | 3 | 53 | -54 | -27 | -39 | -28 | 130 | -72 |
Mean:         | -167 | -170 | 158 | -58 | -12 | -104 | -77 | -107 | -106 | -67 | 40 |
StdDev:       | 34 | 12 | 7 | 11 | 17 | 18 | 20 | 20 | 58 | 48 | 30 |
3JHMA:        | 4.8<5.8<7.1 | 3.4<3.9<5.2 | 7.3<9.2<10.6 | 7.5<9.3<10.8 | 4.3<5.1<6.4 |
Secondary structure elements (mean values):
gi 5phi -67 ( -79+12 ) 5psi 40 ( 69-29 )
-----
Secondary structure elements (central structure):
gi 5phi -73 ( -79+6 ) 5psi 40 ( 69-29 )
-----

```

Abbildung 3.5: Beispielausgabe von property_cluster (RMD von 8).

3.6 Validierung

3.6.1 RGD-Peptide

Die beiden in diesem Unterkapitel diskutierten Cyclopeptide *c*-(RGDf^βL) **1** und *c*-(RGDfV^βA) **2** wurden ursprünglich von Schumann im Rahmen seiner Dissertation an der Universität Leipzig untersucht.^[160] Das von ihm verwendete Protokoll für die Konformationsanalyse besteht aus folgenden Schritten:

- DG/SA, 1000 Strukturen,
- 50 bis 200 ps RMD (Toleranz 10%) im Kontinuum ($\epsilon = 45$ für DMSO),
- FMD 0.5 bis 2 ns im Kontinuum oder 500 ps in Lösungsmittelbox.

Alle Schritte wurden bei 300 K mit dem Programmpaket QUANTA unter Verwendung des CHARMM-Kraftfelds durchgeführt. Das Clustering zwischen den Schritten erfolgte mit einem Torsionswinkelkriterium von $\pm 60^\circ$.

Die wesentlichen Unterschiede des in dieser Arbeit verwendeten Protokolls hierzu sind also:

- deutlich längere Simulationsdauer,
- ausschließlich explizite Simulation des Solvens,
- Verwendung des GROMOS96-Kraftfelds für die MD,

Das Kraftfeld in XPLOR ist ein modifiziertes CHARMM-Kraftfeld, doch ist die Implementierung der DG/SA sicherlich anders vorgenommen worden als in QUANTA. Genaue Parameter und Topologien der DG/SA von Schumann sind nicht bekannt.

cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-^βLeu) 1

Von Schumann wurden insgesamt 36 *restraints* für *c*-(RGDf^βL) in DMSO-D₆ erhalten, die für die DG des neuen Analyseschemas verwendet werden (Tabelle 3.6). Dabei zeigen sich bereits erste Unterschiede. Während Schumann mehrere Cluster mit positiven und negativen Einstellungen des μ -Winkels von ^βLeu beobachtete, ergibt die DG jetzt nur einen Cluster, der 95% der Strukturen umfasst, wobei der μ -Winkel durchschnittlich 49° beträgt.

Auch während der RMD ist eine Konformation klar dominant, der entsprechende Cluster umfasst 73% der Trajektorie. Daneben werden noch zwei Nebenkonformationen mit Anteilen von jeweils 6% beobachtet. Die Unterschiede zwischen den Konformeren liegen in einer entgegengesetzten Orientierung der Peptidbindung zwischen ^βLeu und Arg (II) bzw. Asp und D-Phe (III). Eine Umlagerung der ^βLeu-Arg-Bindung ist auch von Schumann beobachtet worden. Die generelle Topologie des Peptids ist stabil und zeigt ^βLeu in der *i*+1-

Position eines $\Psi\gamma$ -Turns. Gegenüberliegend ist eine verzerrte $\beta\text{II}'$ -Schleife mit Gly in $i+1$ erkennbar, die aufgrund der Überlagerung mit einem γ^i -Turn um Asp im ψ_{i+2} -Winkel gegenüber den Referenzwerten abweicht, so dass keine entsprechende Wasserstoffbrücke ausgebildet wird. Der γ^i -Turn wird zu 76% durch eine Wasserstoffbrücke zwischen D-Phe H^{N} und Gly O stabilisiert.

Die von Schumann vorgeschlagene Struktur hat ebenfalls einen $\Psi\gamma$ -Turn um βLeu und einen $\beta\text{II}'$ -Turn um Gly und Asp. Die $\beta\text{II}'$ -Schleife ist deutlicher ausgeprägt und wird durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert. Schumann beobachtete einen gelegentlich ausgebildeten γ -Turn um Gly, der die $\beta\text{II}'$ -Schleife überlagert, sowie seltener auch einen γ^i -Turn um Asp. Insgesamt erhielt er drei sehr ähnliche Konformere, die sich in den Peptidbindungen um βLeu unterscheiden, ohne dass die im Vorzugskonformer ausgebildete $\Psi\gamma/\beta\text{II}'$ -Topologie gestört würde.

Die nach dem neuen Analyseschema erhaltene Struktur entspricht in ihrer generellen Sekundärstruktur der zuvor von Schumann postulierten; Unterschiede liegen im Detail. Zur Verdeutlichung sind in den Abbildungen 3.6 und 3.7 schematische Darstellungen und eine Überlagerung der beiden Haupt-

Tabelle 3.6: Von Schumann gemessene NOE (exp),^[160] bei der Neuberechnung unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(RGDf β L) **1**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Arg H^{N}	βLeu H^{N}	390	429	279	Asp H^{α}	Asp $\text{H}^{\beta 2}$	260	286	266
Arg H^{N}	Arg H^{α}	254	279	260	D-Phe H^{N}	βLeu H^{N}	319	351	372
Arg H^{N}	Arg Q^{β}	370	547	260	D-Phe H^{N}	Asp H^{α}	220	242	247
Arg H^{N}	βLeu Q^{α}	228	372	261	D-Phe H^{N}	D-Phe H^{α}	269	296	263
Arg H^{α}	Arg Q^{β}	252	401	255	D-Phe H^{N}	D-Phe $\text{H}^{\beta 3}$	350	385	330
Arg H^{α}	Arg Q^{γ}	241	387	258	D-Phe H^{N}	D-Phe $\text{H}^{\beta 2}$	270	297	306
Gly H^{N}	Asp H^{N}	384	422	424	D-Phe H^{α}	D-Phe $\text{H}^{\beta 3}$	272	299	239
Gly H^{N}	Arg H^{α}	221	243	219	D-Phe H^{α}	D-Phe $\text{H}^{\beta 2}$	243	267	275
Gly H^{N}	Arg Q^{β}	288	446	385	βLeu H^{N}	D-Phe H^{α}	204	224	214
Gly H^{N}	Arg Q^{γ}	313	476	334	βLeu H^{N}	βLeu Q^{α}	238	384	294
Gly H^{N}	Gly $\text{H}^{\alpha 3}$	232	255	273	βLeu H^{N}	βLeu H^{β}	291	320	283
Asp H^{N}	D-Phe H^{N}	233	256	305	βLeu H^{N}	βLeu H^{γ}	287	316	283
Asp H^{N}	Gly $\text{H}^{\alpha 3}$	385	424	204	βLeu Q^{α}	βLeu H^{β}	225	368	251
Asp H^{N}	Gly $\text{H}^{\alpha 2}$	242	266	302	βLeu H^{β}	βLeu H^{γ}	224	246	239
Asp H^{N}	Asp H^{α}	255	281	270	βLeu H^{β}	βLeu $\text{M}^{\delta 1}$	263	377	348
Asp H^{N}	Asp $\text{H}^{\beta 3}$	289	318	297	βLeu H^{β}	βLeu $\text{M}^{\delta 2}$	236	342	285
Asp H^{N}	Asp $\text{H}^{\beta 2}$	299	329	254	βLeu H^{γ}	βLeu $\text{M}^{\delta 1}$	221	322	234
Asp H^{α}	Asp $\text{H}^{\beta 3}$	237	261	236	βLeu H^{γ}	βLeu $\text{M}^{\delta 2}$	222	323	237

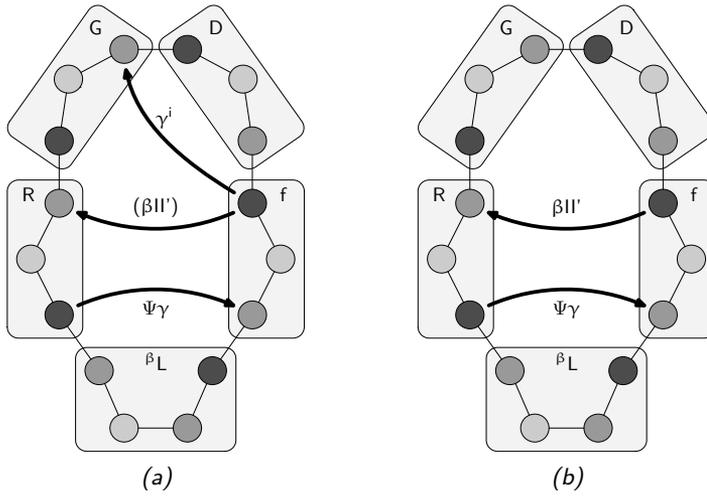


Abbildung 3.6: Schematische Darstellungen der erhaltenen Struktur von c-(RGDf β L) (a) und des Strukturmodells von Schumann (b).

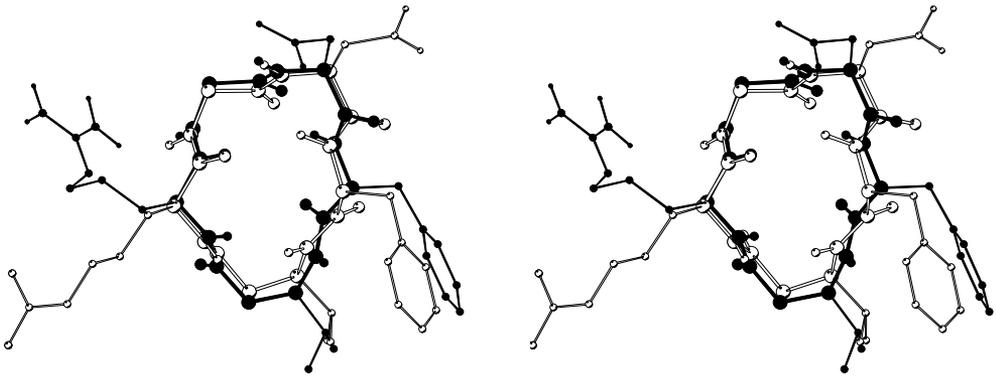


Abbildung 3.7: Überlagerung der Strukturen von c-(RGDf β L) Strukturen (Neuberechnung schwarz, Schumann weiß, RMSD der Rückgratome 60 pm).

Tabelle 3.7: Rückgrattorsionswinkel in Grad, je Cluster gemittelt über die RMD, der beobachteten Konformationen sowie die von Schumann gefundenen Durchschnittswerte (FS12) von c-(RGDf β L).

	Arg		Gly		Asp		D-Phe		β Leu		
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	μ	ψ
I	-109	119	78	-117	-77	47	165	-123	-120	71	-114
II	41	123	87	-120	-77	30	166	-120	-121	63	68
III	-106	130	80	-118	-70	-50	-58	-121	-142	66	-102
\emptyset	-107	120	79	-118	-76	41	168	-123	-122	70	-113
FS12	-81	137	69	-105	-76	4	176	-107	-129	60	-113

konformere abgebildet. Aus der Zusammenstellung der Torsionswinkel in Tabelle 3.7 geht ebenfalls hervor, dass der Hauptunterschied zwischen altem und neuem Strukturvorschlag im Torsionswinkel ψ des Asp besteht, wobei bei Schumann die Ausbildung der β II'-Schleife, im neu erhaltenen Modell die des γ^i -Turns favorisiert ist.

Während der RMD-Trajektorie werden 8 Überschreitungen der experimentellen Distanzen von im Mittel 18 pm beobachtet, die sich auf 151 pm summieren. Berechnet man den Mittelwert der NOE-Verletzungen für die drei von Schumann angegebenen Konformere, so erhält man eine Summenabweichung von 339 pm durch 10 Überschreitungen. Die nach dem neuen Protokoll erhaltenen Strukturen erfüllen die experimentellen Randbedingungen also durch die beobachteten Unterschiede deutlich besser, wobei die generelle Topologie nichtsdestotrotz übereinstimmt.

cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- β Ala-) 2

Für c-(RGDFV β A) stehen 32 *restraints* in DMSO-D₆ aus der Arbeit von Schumann zur Verfügung, die in die DG einfließen (Tabelle 3.8). Diese führt zu einem besonders stark populierten Cluster, der 42% der Strukturen enthält; die übrigen verteilen sich auf zahlreiche kleine Cluster. Offensichtlich hat das Molekül im Rahmen der *restraints* eine gewisse Freiheit, so dass viele Konformationen rechnerisch möglich sind. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Schumann, der ebenfalls mehrere Cluster mit einer Bevorzugung zweier strukturell sehr ähnlicher Konformere beobachtete.

Die starke Bevorzugung eines Clusters in der DG legt dessen Verwendung für die folgende RMD nahe, während derer sich die gewählte Startstruktur als stabil erweist. Das Clustering ergibt nur eine signifikant populierte Strukturfamilie, die 87% der Trajektorie umfasst. Die restlichen Strukturen unterscheiden sich vor allem durch Flexibilität im Bereich von β Ala, ohne dass eine der Oszillationen längere Zeit erhalten bliebe.

Die beobachtete RMD-Konformation weist mehrere Sekundärstrukturelemente auf. Die Aminosäuren Asp, D-Phe und Val befinden sich in den Positionen $i+1$ bis $i+3$ einer II- α_{RS} -Schleife, die durch eine zu 69% populierte Wasserstoffbrücke stabilisiert wird. Die II- α_{RS} -Schleife überlagert einen γ^i -Turn um D-Phe und einen etwas verzerrten β II-Turn mit Asp in $i+1$. Diese beiden Turns werden durch eine gegabelte Wasserstoffbrücke zwischen Val H^N und Asp O (29%) bzw. Gly O (35%) stabilisiert. Des weiteren findet sich ein γ -Turn um Arg, wobei zu 19% eine entsprechende Wasserstoffbrücke zwischen Gly H^N und β Ala O beobachtet wird. Es kann bei c-(RGDFV β A) also von einer sehr definierten Sekundärstruktur gesprochen werden. Das Modell stimmt

Tabelle 3.8: Von Schumann gemessene NOE (exp),^[160] bei der Neuberechnung unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(RGDFV^βA) 2.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Arg H ^N	Gly H ^N	338	372	385	D-Phe H ^N	D-Phe H ^α	298	328	281
Arg H ^N	Arg H ^α	289	318	278	D-Phe H ^N	D-Phe H ^{β2}	263	289	271
Arg H ^N	Arg Q ^β	304	465	270	D-Phe H ^α	D-Phe H ^{β3}	254	279	257
Arg H ^N	βAla H ^{α2}	307	338	312	Val H ^N	βAla H ^N	264	290	249
Arg H ^N	βAla H ^{α3}	247	272	217	Val H ^N	D-Phe H ^α	241	265	254
Arg H ^α	Arg Q ^β	276	431	254	Val H ^N	Val H ^α	295	325	272
Gly H ^N	Asp H ^N	410	451	405	Val H ^N	Val H ^β	276	304	254
Gly H ^N	Arg H ^α	240	264	219	Val H ^α	Val H ^β	247	272	267
Gly H ^N	Gly H ^{α2}	272	299	234	Val H ^α	Val Q ^γ	236	570	266
Gly H ^N	Gly H ^{α3}	284	312	284	Val H ^β	Val Q ^γ	210	531	182
Asp H ^N	Gly H ^{α2}	275	303	228	βAla H ^N	Val H ^α	253	278	311
Asp H ^N	Asp Q ^β	254	403	284	βAla H ^N	βAla H ^{β2}	273	300	225
Asp H ^N	Asp H ^α	258	284	257	βAla H ^N	βAla H ^{β3}	278	306	273
Asp H ^α	Asp Q ^β	238	384	253	βAla H ^N	Val H ^β	293	322	257
D-Phe H ^N	Val H ^N	298	328	284	βAla H ^{α2}	βAla H ^{β3}	256	282	232
D-Phe H ^N	Asp H ^α	229	252	211	βAla H ^{α3}	βAla H ^{β2}	290	319	287

fast perfekt mit den experimentellen Distanzen überein. Lediglich die Abstände zwischen Arg H^N und Gly H^N (+13 pm) und βAla H^N und Val H^α (+33 pm) überschreiten die Vorgaben (Tabelle 3.8).

Schumann beobachtete drei einander ähnliche Konformationen während seiner Simulationen in DMSO, von denen eine stark bevorzugt war. In der Tat ist das von Schumann postulierte Vorzugskonformer nahezu identisch mit dem hier erhaltenen Strukturmodell. Beide Strukturen sind schematisch und als Überlagerung in Abbildung 3.8 gezeigt; die Unterschiede sind minimal (RMSD 22 pm), wie auch die in Tabelle 3.9 zusammengestellten Torsionswinkel belegen.

Neben der gezeigten Konformation bemerkte Schumann in Kontinuumsrechnungen ein Umklappen des βAla- μ -Winkels von 60° auf -60°, das zu einer alternativen Turnstruktur führte, bei der ebenfalls ein II- α_{RS} - und ein überlagerter βII-Turn zu beobachten waren, allerdings mit Arg, Gly und Asp in $i+1$, $i+2$ und $i+3$. Bei der Neuberechnung ergibt sich während der RMD keinerlei Hinweis auf eine Änderung des μ -Winkels. In den DG-Strukturen ist ebenfalls kein signifikanter Anteil ($\approx 3\%$) von Strukturen mit $\mu \approx -60^\circ$ zu beobachten. Es liegt nahe, dass es sich um ein Artefakt der Kontinuums-Rechnung handelt.

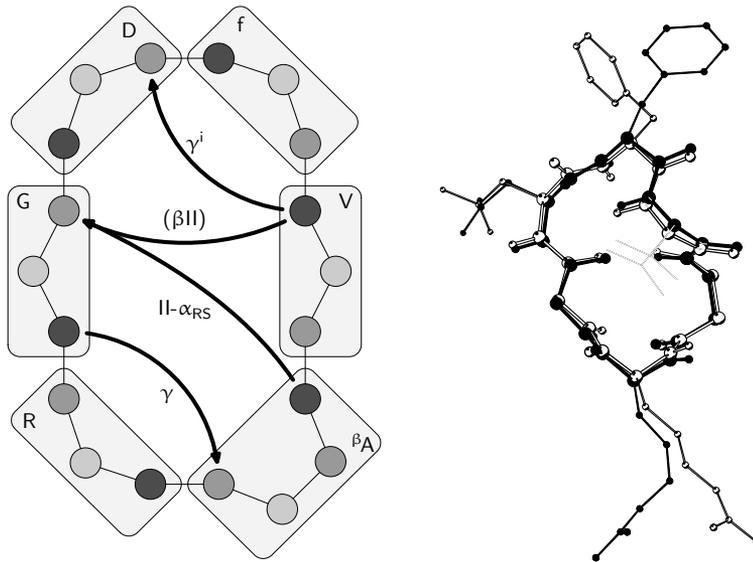


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung von c-(RGDFV β A) und Überlagerung der zentralen RMD-Struktur aus der Neuberechnung (schwarz) sowie dem Vorzugskonformer von Schumann (weiß).

Tabelle 3.9: Rückgrattorsionswinkel in Grad, je Cluster gemittelt über die RMD, der beobachteten Konformationen sowie die von Schumann gefundenen Durchschnittswerte (FS11) von c-(RGDFV β A).

	Arg		Gly		Asp		D-Phe		Val		β Ala		
	φ	ψ	φ	μ	ψ								
\emptyset	-88	84	111	155	-52	117	99	-43	-77	-45	90	68	-120
FS11	-96	70	138	175	-79	109	95	-19	-78	-46	76	60	-112

Fazit

Die Neuberechnung führt im Fall von c -(RGDFV^βA) **1** zu einem identischen, im Fall von c -(RGDF^βL) **1** zu einem sehr ähnlichen Strukturvorschlag wie bei Schumann. Die in DMSO beobachteten Unterschiede bei **1** sind höchstwahrscheinlich auf den Wechsel des Kraftfelds zurückzuführen. Sie führen zu einer besseren Erfüllung der NOE-Distanzen als durch die Strukturen von Schumann. Im Falle von **2** werden Artefakte in den Kontinuumsrechnungen von Schumann durch die konsequente Verwendung expliziter Solvensmoleküle vermieden.

Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse ist erfreulich, da sie die Vergleichbarkeit der nach neuer Methodik erhaltenen Ergebnisse mit älteren Daten gewährleistet. Die beobachteten Unterschiede zeigen eine Verbesserung gegenüber dem älteren Protokoll.

3.6.2 KDK-Peptide

Strijowski untersuchte im Rahmen seiner Dissertation an der Universität Bielefeld u. a. die Cyclopeptide c -(rLSKDK) **3**, c -(RISKDK) **4** und c -(RLsKDK) **5**. Seine Vorgehensweise zur Konformationsanalyse bestand aus den folgenden Schritten (alle bei 300 K):

- systematische Suche durch Variation der φ -Winkel mit einem Inkrement von 60° ,
- Betrachtung der Strukturen mit der niedrigsten Energie nach Energieminimierung im Kontinuum (CVFF, InsightII) im Hinblick auf ROE-Verletzungen, Auswahl der diesbezüglich besten Struktur als Startstruktur,
- RMD mit GROMACS^[162] (Kraftfeld GROMOS96) für 100 ps in der Lösungsmittelbox,
- Clustering mit einem Koordinaten-RMSD-Kriterium von 0.08 nm,
- FMD, GROMACS, 12 ns, Lösungsmittelbox,
- Clustering RMSD 0.08 nm.

Es bestehen fundamentale Unterschiede zum in dieser Arbeit verwendeten Verfahren.

- Ein gravierender Unterschied ist bereits die Generierung der Startstruktur. Strijowski wählte immer genau eine Struktur der durch systematische Suche generierten aus. Das genannte Auswahlkriterium – unter den energieniedrigsten die beste bezüglich ROE-Verletzungen – lässt dabei viel subjektiven Spielraum.

- Das Clustering erfolgte nicht nach Torsionswinkeln, sondern anhand des RMSD der Koordinaten.
- Die Simulationszeit der RMD ist wesentlich kürzer.

cyclo(-D-Arg-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) 3

Aus der Arbeit von Strijowski stehen für c-(rLSKDK) in DMSO-D₆ 16 ROE-Distanzen zur Verfügung (Tabelle 3.10). Das Clustering einer DG mit diesen Werten offenbart, dass die Struktur durch die *restraints* konformationell wenig eingeschränkt ist; das System ist offenbar unterbestimmt. Lediglich zwei Cluster sind mit jeweils 10% überhaupt signifikant populiert, die übrigen Strukturen zeigen quasi beliebige Einstellungen der Torsionswinkel. Insofern ist die Aussagekraft einer Konformationsanalyse mit diesen Daten fraglich.

Dennoch wurden die zentralen Strukturen der beiden populierten Cluster als Startstrukturen in einer RMD verwendet. Die beiden Strukturen sind sich sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in den Torsionswinkeln um Lys⁴. Während beider RMD-Läufe zeigt sich erhebliche Flexibilität in einer Vielzahl von kurzzeitig eingenommenen Konformationen, jedoch auch eine klare Präferenz für eine in beiden Läufen übereinstimmende Vorzugskonformation, die 58 bzw. 62% der Trajektorien umfasst. Es erscheint daher durchaus sinnvoll, diese unter Hinweis auf die beobachtete Flexibilität und schwache Eingrenzung durch die experimentellen Distanzen als zumindest bevorzugte Lösungskonformation zu diskutieren.

D-Arg befindet sich in der $i+1$ -Position eines β -artigen Turns, der der erwar-

Tabelle 3.10: Von Strijowski gemessene ROE (exp) sowie bei der Neuberechnung unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) und während der RMD für den Hauptcluster im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(rLSKDK) 3.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Asp H ^{α}	Asp H ^{β^3}	223	245	236	Lys ⁴ H ^N	Ser H ^{γ}	385	424	356
Asp H ^{α}	Asp H ^{β^2}	247	272	240	Lys ⁴ H ^N	Lys ⁴ H ^{α}	255	281	273
Asp H ^N	Asp H ^{α}	247	272	275	Lys ⁶ H ^N	Lys ⁶ H ^{α}	281	309	279
Asp H ^N	Asp H ^{β^2}	287	316	334	Lys ⁶ H ^N	Asp H ^{α}	290	319	337
D-Arg H ^N	D-Arg H ^{α}	254	279	271	Lys ⁶ H ^N	Asp H ^{β^2}	353	388	311
Leu H ^N	Ser H ^N	305	336	316	Ser H ^N	Leu H ^{α}	280	308	235
Leu H ^N	Leu H ^{α}	290	319	282	Ser H ^N	Lys ⁴ H ^{α}	339	373	395
Lys ⁴ H ^N	Asp H ^N	291	320	263	Ser H ^{γ}	Ser H ^{α}	269	296	261

teten β II'-Schleife ähnelt, im ψ_{i+2} -Winkel jedoch abweicht und daher nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird. Der gegenüberliegende Turn entspricht keinem klassischen Sekundärstrukturelement. Weiterhin fällt eine zwischen den Seitenketten des Asp und des Lys⁶ gebildete intramolekulare Salzbrücke auf, die möglicherweise der Grund für die Abweichungen der Turns von den Referenzgeometrien ist.

Strijowski gelangt mit seiner Methodik zu einem gänzlich anderen Strukturmodell, ohne dabei Flexibilität zu erwähnen. Er postuliert eine starre Struktur mit einem β II-Turn mit Lys⁶ in $i+1$ und D-Arg in $i+2$; zudem weist sein Modell eine *cis*-Peptidbindung zwischen Ser und Lys auf, ohne dass hierfür weitere experimentelle Hinweise gegeben wären (vgl. 3.2.1). Sowohl eine D-Aminosäure in $i+2$ eines β -Turns als auch eine *cis*-Peptidbindung ohne Beteiligung von Pro sind zumindest sehr ungewöhnlich. Weitere Zweifel an der von Strijowski postulierten Struktur werden in der vergleichenden Betrachtung der drei KDK-Peptide dargelegt werden.

Anhand der ROE-Distanzen ist keine Entscheidung über die Verlässlichkeit eines der Strukturmodelle möglich, da diese, wie gesagt, die Konformation kaum einschränken und von nahezu beliebigen Strukturen erfüllt werden. Die in der Neuberechnung beobachtete Vorzugskonformation und der Strukturvorschlag von Strijowski sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

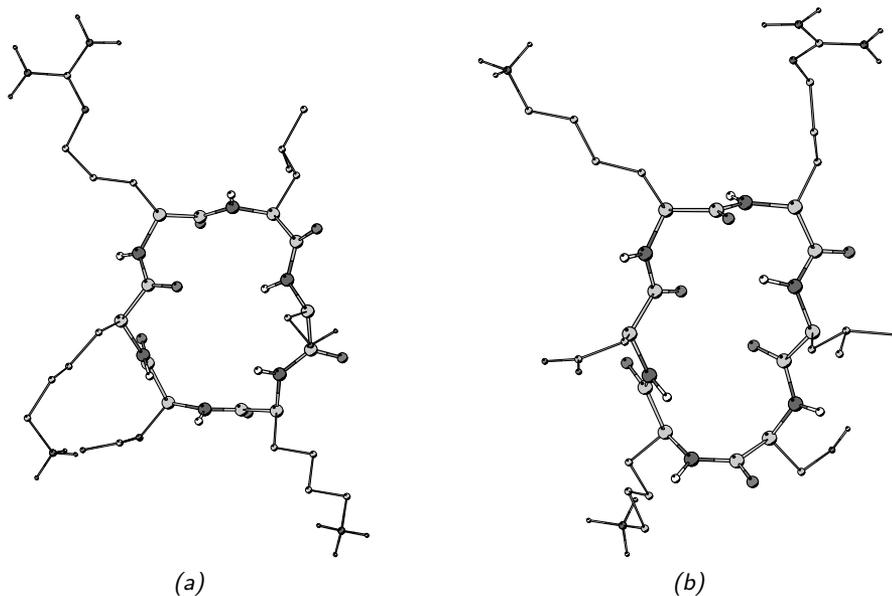


Abbildung 3.9: Die Vorzugskonformation von c-(rLSKDK) nach Neuberechnung (a) zeigt D-Arg in $i+1$ eines in ψ_{i+2} von den Referenzwerten abweichenden β II'-Turn. Der Strukturvorschlag von Strijowski (b) sieht hingegen einen β II-Turn mit D-Arg in $i+2$ und eine *cis*-Peptidbindung zwischen Ser und Lys⁴ vor.

cyclo(-Arg-D-Leu-Ser-Lys-Asp-Lys-) 4

Strijowski erhielt für c-(RISKDK) 15 ROE-Distanzen, die für eine Neuberechnung verwendet werden (Tabelle 3.11). Wie schon für **3** führt die DG zu sehr heterogenen Strukturen, die alle die Vorgaben erfüllen, so dass auch hier von einer wenig stringenten Definition der Konformation durch die *restraints* gesprochen werden muss. Es werden aber zwei signifikant populierte Cluster mit 38 bzw. 10% Anteil beobachtet; der Rest der Strukturen verteilt sich ohne erkennbare Präferenz.

Beide zentralen Strukturen werden als Startstrukturen für RMD-Läufe verwendet, um wenigstens eine mögliche Vorzugskonformation zu identifizieren. Struktur I aus der DG zeigt deutlich Flexibilität, aber auch die Präferenz zur Ausbildung einer Vorzugskonformation mit 80% Anteil an der Trajektorie. In dieser findet sich D-Leu in der $i+1$ -Position eines β -Turns, der einem β II'-Turn ähnelt, jedoch stark verzerrt ist. Struktur II erweist sich als deutlich stabiler und liefert einen einzelnen Cluster mit 95% der Trajektorie. Dieser entspricht von der Topologie her der RMD-Struktur von I, jedoch mit wesentlich besserer Übereinstimmung mit den Referenzgeometrien. Die β II'-Schleife wird bei II zu 30% durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert. Gegenüberliegend ist ein β I'-Turn um Asp und Lys⁶ zu erkennen, der zu 74% Wasserstoffbrücken-stabilisiert ist. Wie schon bei **3** beobachtet, wird eine intramolekulare Salzbrücke zwischen den Seitenketten von Lys⁴ und Asp gebildet.

Insgesamt legen die RMD-Beobachtungen nahe, dass c-(RISKDK) in DMSO vorzugsweise in einer der zentralen RMD-Struktur II entsprechenden Konformation vorliegt. Der Vorschlag ist auch im Hinblick auf die Position des D-Leu

Tabelle 3.11: Von Strijowski gemessene ROE (exp) sowie bei der Neuberechnung unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) und während der RMD von II für den Hauptcluster im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(RISKDK) **4**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Arg H ^N	Arg H ^{α}	296	326	285	Lys ⁶ H ^N	Asp H ^N	372	409	286
Asp H ^{α}	Asp H ^{β^3}	241	265	237	Lys ⁶ H ^N	Lys ⁴ H ^{α}	301	331	349
Asp H ^{α}	Asp H ^{β^2}	283	311	288	Leu H ^{α}	Leu H ^{β^3}	250	275	256
Asp H ^N	Asp H ^{α}	292	321	213	Leu H ^{α}	Leu H ^{β^2}	227	250	258
Asp H ^N	Asp H ^{β^3}	332	365	372	Leu H ^N	Leu H ^{α}	298	328	278
Lys ⁴ H ^N	Lys ⁴ H ^{α}	292	321	272	Leu H ^N	Leu H ^{β^3}	338	372	280
Lys ⁴ H ^N	Lys ⁶ H ^{α}	355	391	403	Leu H ^N	Leu H ^{β^2}	354	389	266
Lys ⁶ H ^N	Asp H ^{α}	354	389	260					

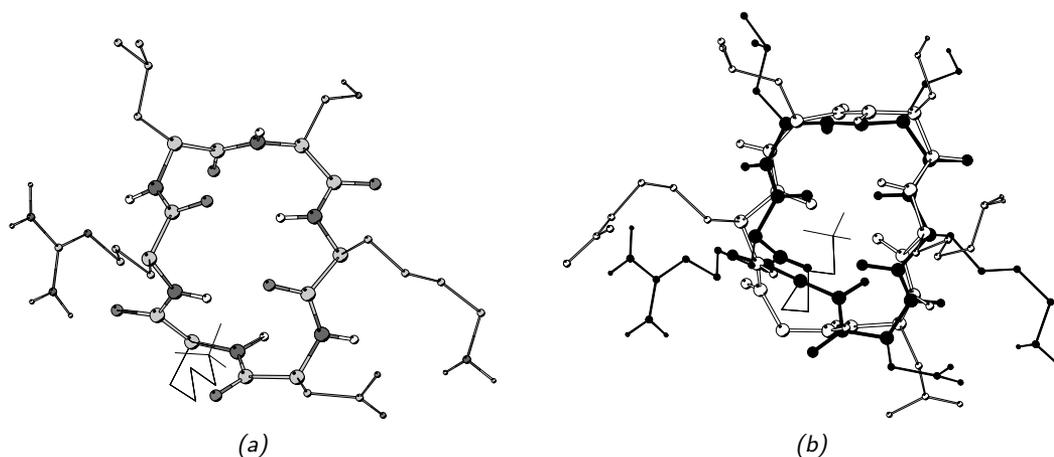


Abbildung 3.10: Die Vorzugskonformation von c -(RISKDK) nach Neuberechnung (a) ist dem Strukturvorschlag von Strijowski im Bereich des β II'-Turns ähnlich, wie eine Überlagerung der Strukturen zeigt (b, Neuberechnung schwarz, Strijowski weiß). Der gegenüberliegende Turn ist im neuen Modell ein β I'-Turn; bei Strijowski zeigt sich keine Übereinstimmung mit Referenzstrukturen. Hauptunterschied ist die Konformation der Peptidbindung zwischen Asp und Lys⁶.

in $i+1$ eines β II'-Turns plausibel. Die beobachtete erhebliche Flexibilität sollte dabei nicht in Vergessenheit geraten.

Das von Strijowski erhaltene Strukturmodell ist durchaus ähnlich. Es sieht ebenfalls einen Wasserstoffbrücken-stabilisierten β II'-Turn mit D-Leu in $i+1$ vor; der gegenüberliegende β -Turn entspricht aber keinen Referenzstrukturen und wird nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert. Wie schon bei **3** ermöglichen die experimentellen Distanzen wegen unzureichender Stringenz keine Auswahl zwischen den Strukturvorschlägen. Zur Verdeutlichung des Gesagten sind neuer und alter Strukturvorschlag in Abbildung 3.10 graphisch dargestellt.

cyclo(-Arg-Leu-D-Ser-Lys-Asp-Lys-) 5

Für c -(RLsKDK) in DMSO- D_6 stehen 12 ROE-Distanzen aus der Arbeit von Strijowski zur Verfügung (Tabelle 3.12). Eine DG mit diesen Werten führt zu keinen signifikant populierten Clustern. Die Konformation ist durch die *restraints* offensichtlich überhaupt nicht bestimmt, so dass alle generierten Strukturen die experimentellen Vorgaben erfüllen, ungeachtet ihrer Konformation. Eine Konformationsanalyse ist mit diesen Daten sinnlos.

Strijowski verzichtete ebenfalls auf die Durchführung seines Protokolls, mit dem Argument, dass nur ein nicht-intraresidualer *restraint* kaum für eine sinnvolle Strukturbestimmung ausreichen dürfte.

Tabelle 3.12: Von Strijowski gemessene ROE für c-(RLSKDK) **5**.

Atom 1	Atom 2	r/pm	Atom 1	Atom 2	r/pm
Arg H ^N	Arg H ^α	231	Leu H ^N	Leu H ^α	267
Asp H ^α	Asp H ^{β3}	230	D-Ser H ^α	D-Ser H ^{β3}	217
Asp H ^α	Asp H ^{β2}	237	D-Ser H ^α	D-Ser H ^{β2}	221
Asp H ^N	Asp H ^α	255	D-Ser H ^N	D-Ser H ^α	235
Asp H ^N	Asp H ^{β2}	326	D-Ser H ^N	D-Ser H ^{β3}	336
Asp H ^N	Lys ⁴ H ^α	267	D-Ser H ^N	D-Ser H ^{β2}	306

Fazit

Die Ergebnisse des neuen Konformationsanalyse-Protokolls unterscheiden sich wesentlich von den Strukturvorschlägen Strijowskis. Während zumindest ähnliche Strukturen für c-(RISKDK) **4** erhalten werden, sind die Strukturen im Falle von c-(rLSKDK) **3** völlig unterschiedlich.

Ein Hauptproblem der Methodik von Strijowski ist die Auswahl der Startstruktur für die RMD-Simulationen. Sein primäres Kriterium ist die Energie der Strukturen aus der systematischen Suche im verwendeten CVFF-Kraftfeld. Er wählt nach nicht exakt definierten Kriterien eine un spezifizierte Anzahl der energieniedrigsten Konformationen aus und verwendet die unter diesen beste im Hinblick auf ihre ROE-Verletzungen. Wenn, wie es bei den drei betrachteten KDK-Peptiden der Fall ist, die experimentellen *restraints* die Konformation nur teilweise bzw. gar nicht einschränken, erfüllen alle Strukturen aus der systematischen Suche die Vorgaben annähernd gleich gut. Die von Strijowski gewählte Struktur ist dann lediglich eine der energieniedrigsten im CVFF-Kraftfeld und hat keine zusätzliche Rechtfertigung durch experimentelle Daten. Gleichwohl erhält er in jedem Fall immer genau eine, scheinbar gute Startstruktur. Aufgrund dieses seiner Vorgehensweise inhärenten Problems hatte Strijowski keine Möglichkeit, während seiner Rechnungen die Unzulänglichkeit der von ihm verwendeten Daten zu detektieren. Die geringe Zahl der beobachteten ROE ist allerdings bereits im Vorfeld der Rechnungen ein offensichtliches Problem. Ob die Unterbestimmung aber tatsächlich eine Folge von Flexibilität ist oder aus schlechten Messungen resultiert, kann nur durch neue NMR-Experimente geklärt werden.

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren offenbart die schwache Stringenz von Strijowskis Daten sofort. Anstatt einer scheinbar wohldefinierten, aber höchstwahrscheinlich falschen oder zumindest nicht als alleiniges Modell geeigneten Struktur liefert die Neuberechnung Vorschläge für eine Vorzugs-

konformation, ohne dabei den konformationellen Spielraum des Moleküls zu unterschlagen.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist die Objektivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Während das neue Protokoll nach klar definierten Kriterien vorgeht und jederzeit mit gleichem Resultat wiederholbar ist, hat Strijowskis Methode durch die subjektive Startstrukturwahl auch unter diesem Aspekt einen gravierenden Schwachpunkt. *c*-(RLsKDK) **5** ist ein weiteres Beispiel für die Problematik der Objektivität. Während Strijowski die 12 ROE-Distanzen aufgrund seiner Erfahrung im *modeling* verwirft, also aus subjektiven Gründen, ergeben sich hierfür mit dem neuen Verfahren vom Durchführenden unabhängige, zwingende, rationale Gründe.

Die Überlegenheit des Torsionswinkelclusterings zeigt sich eindrucksvoll bei **3**. In beiden RMD-Läufen umfasst der meistpopulierte Cluster 58 bzw. 62% der Trajektorie. Die unbedeutenderen Nebenkongformationen unterscheiden sich in ihrer Rückgratkonformation teilweise erheblich von der Vorzugskonformation und bilden verschiedene Topologien aus. Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 3.11 eine Nebenkongformation von **3** gezeigt (7% Anteil an der RMD von Startstruktur I). Es wird ein γ^1 -Turn um Leu beobachtet; zudem wird eine Wasserstoffbrücke zwischen D-Arg H^N und Ser O gebildet. Zwei Peptidbindungen

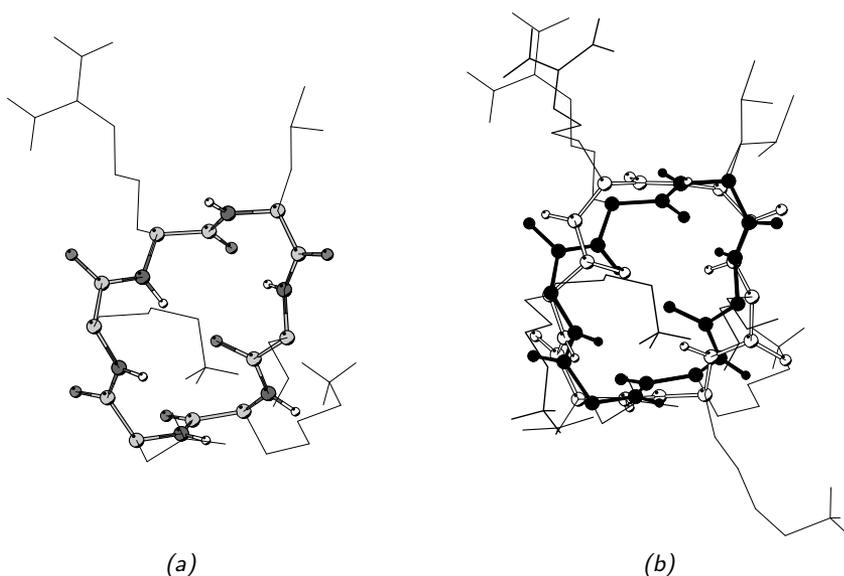


Abbildung 3.11: Nebenkongformation aus der RMD von **3** (a). Es wird eine von der Vorzugskonformation abweichende Rückgratkonformation mit einem γ^1 -Turn um Leu und einer Wasserstoffbrücke zwischen D-Arg H^N und Ser O beobachtet. Die Überlagerung (b) verdeutlicht die Unterschiede. Außer der Peptidbindung zwischen Lys⁶ und D-Arg hat auch die Bindung zwischen Ser und Lys⁴ entgegengesetzte Orientierung.

gen weisen entgegengesetzte Orientierungen auf: Lys⁶/D-Arg und Ser/Lys⁴. Die Flexibilität des Peptidrückgrats von **3** bleibt mit dem Koordinaten-RMSD-Clustering verborgen. Eine zum Vergleich durchgeführte Analyse mit einem *cutoff* von 0.08 nm ergibt für beide RMD-Trajektorien nur einen einzelnen Cluster, der die gesamte Trajektorie umfasst. Dies unterstreicht nochmals die Notwendigkeit der Einführung des Torsionswinkelkriteriums.

3.7 Zusammenfassung

Ein flexibles Programm zum Torsionswinkelclustering und zur clusterweisen Analyse von Trajektorien wurde in PERL implementiert und in das Verfahren zur Konformationsanalyse integriert. Durch die entwickelten Analyseskripte wurden subjektive Entscheidungen aus dem Arbeitsablauf der Konformationsanalyse eliminiert, wodurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist.

Im Falle der Peptide **1** und **2** sind die Ergebnisse der Neuberechnung den zuvor von Schumann erhaltenen ähnlich, der ebenfalls DG/SA und Torsionswinkelclustering einsetzte.^[160] Durch die deutlich verlängerten Simulationszeiten ist im neuen Verfahren eine bessere Durchsuchung des Konformationsraumes und eine verlässlichere Aussage über die Stabilität der Strukturen möglich; Kontinuums-Artefakte werden durch die ausschließliche Simulation in explizitem Solvens vermieden. Die für **1** beobachteten Unterschiede führen zu einer besseren Übereinstimmung mit den experimentellen Daten durch das neu berechnete Strukturmodell.

Zusammen mit der Nutzung von DG/SA zur Startstrukturgenerierung wurden gegenüber dem von Strijowski benutzten Verfahren^[161] erhebliche Verbesserungen hinsichtlich der Plausibilität der Ergebnisse, der Objektivität und Reproduzierbarkeit sowie des Umgangs mit wenig stringenten *restraints* erzielt. Dies belegt die Neuberechnung der Peptide **3** bis **5**.

Bei der RMD von **3** zeigt sich die Überlegenheit des Torsionswinkelclustering besonders deutlich. Die erhebliche Flexibilität des Peptidrückgrats bleibt mit einem Koordinaten-RMSD-Kriterium für das Clustering unbemerkt. Nur mit dem Torsionswinkelclustering des neuen Verfahrens kann diese detektiert werden.

3.8 Experimenteller Teil

3.8.1 DG

Für die DG/SA wurde XPLOR-NIH^[155,156] verwendet. Um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurde als initiale Zufallszahl (*random seed*) 1976 verwendet. Beim SA wurden 1000 Schritte bei 2000 K durchgeführt, gefolgt von 1000 Kühlschritten bis auf eine Temperatur von 100 K mit einem Inkrement von 50 K. Insgesamt wurden 1000 Strukturen generiert, die die Akzeptanzkriterien erfüllten: keine Abweichungen von mehr als 0.05 nm für NOE-Distanzen, 5 pm für Bindungslängen und 5° für Winkel, Torsionswinkel und *impropers*.

Das Clustering aller generierter Strukturen wurde anhand der Rückgrattorsionswinkel mit dem in Abschnitt 3.5 vorgestellten Programm durchgeführt. Es wurden alle φ - und ψ -Winkel sowie die μ -Winkel von β -Aminosäuren und der ω -Winkel von Prolin-Resten in die Clusteranalyse einbezogen. Der *cutoff* betrug 60°; Cluster mit weniger als 5% der Trajektorie wurden für die weiteren Berechnungen nicht berücksichtigt.

3.8.2 RMD

Als Startstrukturen für die RMD-Simulationen wurden die zentralen Strukturen der DG-Cluster verwendet. Die Simulationen wurden mit GROMOS96^[78] unter Verwendung des Kraftfelds GROMOS45A3^[163] mit verbesserten Parametern für DMSO^[164] durchgeführt. Bei der Erstellung der Lösungsmittelbox wurde ein Abstand von mindestens 1.6 nm zwischen Peptid und Boxgrenze sichergestellt. Der *cutoff* für nichtkovalente Wechselwirkungen betrug 1.4 nm. Unter *constraining* der Peptidkoordinaten wurde zunächst das Lösungsmittel mit *steepest descent* Energieminimierung relaxiert (≤ 5000 Schritte). Es folgte eine graduelle Aufheizphase zur Äquilibration des Systems, bei der das System durch kurze MD-Rechnungen unter starker Temperaturkopplung mit einer Relaxationszeit von 0.01 ps an ein externes Bad der Temperatur T_B in Schritten von 50 K auf die Simulationstemperatur von 300 K gebracht wurde. Die Atompositionen des simulierten Moleküls wurden dabei durch *restraining* der Koordinaten mit abnehmenden Kraftkonstanten langsam relaxiert (Tabelle 3.13).

Es folgt die Hauptsimulation, die für 2.5 ns unter schwacher Temperaturkopplung an ein externes Bad von 300 K mit einer Relaxationszeit von 0.1 ps durchgeführt wurde. Der Druck wurde durch schwache Kopplung konstant bei 101325 Pa gehalten, mit einer Relaxationszeit von 0.5 ps und einer isothermen Kompressibilität von $4.575 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-3}$. Der SHAKE-Algorithmus^[112] wurde für alle Bindungen mit einer Toleranz von 10^{-4} angewandt. Zur Inte-

Tabelle 3.13: Parameter der MD-Aufheizphase.

Schritt	Dauer t/ps	Zeitschritt $\delta t/\text{fs}$	Temperatur T/K	Kraftkonstante $k_r/\text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-1}$
1	2	1	50	25000
2	5	1	100	10000
3	5	1	150	5000
4	5	1	200	1000
5	5	1	250	100
6	5	1	300	10
7	10	2	300	10

gration wurde der *leap-frog* Algorithmus mit einem Zeitschritt von $\delta t = 2 \text{ fs}$ benutzt. Die experimentellen Abstände wurden mit einer Toleranz von 10% sowie den in GROMOS++ implementierten Pseudoatom- und Multiplizitätskorrekturen^[77,165] (siehe auch Tabelle 3.5) als zeitlich gemittelte *restraints* verwendet. Die verwendete Kraftkonstante betrug $8000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$, für *restraints* zwischen zwei Amidprotonen $4000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$.

Das anschließende Clustering erfolgte anhand der Rückgrattorsionswinkel wie zuvor. Jede zehnte Struktur der Trajektorie wurde berücksichtigt.

3.8.3 FMD

Die zentralen Strukturen der RMD-Cluster dienten als Startstrukturen der FMD, die für 10 ns unter Verwendung desselben Protokolls wie für die RMD erfolgte, lediglich ohne Verwendung der NOE-*restraints*. Abschließend erfolgte ein Torsionswinkelclustering wie nach der RMD unter Verwendung jeder zehnten Struktur.

3.8.4 Analyse

Zur Analyse der DG-Strukturen sowie der MD-Trajektorien wurden die Programmen des GROMOS++-Pakets^[79] in der Version 0.1.1 (CVS20041108) und das in Abschnitt 3.5 beschriebene Programm zum Torsionswinkelclustering benutzt. Beim Clustering erfolgte die Berechnung der Torsionswinkeldifferenzen mit dem Programm RMSDMAT, das in der verwendeten GROMOS++-Version leicht modifiziert werden musste, um die Periodizität von Winkeln zu berücksichtigen. Hierzu wurde folgender *patch* verwendet:

```

40d39
<
46,47c45,53
<
<   for(unsigned int i=0; i< d_prop_ref->size(); i++)
           rmsd2 += pow((prop_ref[i]->calc()
           - prop_sys[i]->calc()),2);
---
>
>   double dev;
>   for(unsigned int i=0; i< d_prop_ref->size(); i++) {
>     dev = abs( prop_ref[i]->calc() - prop_sys[i]->calc() );
>     if ( (dev>180) &&
>         ((prop_ref[i]->type()=="Torsion") ||
>          (prop_ref[i]->type()=="Angle")))
>       dev = 360-dev;
>     rmsd2 += pow(dev,2);
>   }

```

Das für die einzelnen Clusteringsschritte eingesetzte Programm CLUSTER verwendet den *nearest neighbor* Algorithmus von Daura *et al.*^[159]

Die Analyse von Wasserstoffbrücken und NOE-Erfüllung erfolgte für jeden einzelnen Cluster sowie für das gewichtete Mittel. Hierzu wurden die Programme HBOND und NOE verwendet, ergänzt durch PERL-Skripte zur Automatisierung der Pro-Cluster-Analyse. Die Kriterien für HBOND betragen 0.25 nm und 135°. Für die Berechnung des gewichteten Abstandes wurde das r^{-6} -Mittel verwendet.

Die zentralen Strukturen aus dem Clustering wurden kurz energieminiert (GROMOS, *steepest descent*, ≤ 50 Schritte). Eine Überlagerung der Strukturen mit der Struktur des höchstpopulierten Clusters wurde mit LSQKAB^[166] aus dem CCP4-Paket^[167] erstellt, ebenso wie alle anderen Strukturüberlagerungen in dieser Arbeit.

3.8.5 Sonstiges

Alle Abbildungen von Strukturen im *cartoon* oder *ball-and-stick* Stil wurden mit MOLSCRIPT^[168] erzeugt. Zur Visualisierung am Computer wurden hauptsächlich VMD^[158] und VMD-XPLOR^[157] verwendet, gelegentlich auch PYMOL.^[169]

Diese Arbeit wurde mit dem Editor VIM auf einem GNU/Linux-System^[170] geschrieben. Zum Satz wurde das Makropaket L^AT_EX^[171] für T_EX^[172] verwendet. Zur Erstellung der meisten Graphiken wurde METAPOST^[173] benutzt, die schematischen Darstellungen von Peptiden wurden mit Hilfe des darauf basierenden METAOBJ^[174] implementiert.

4 Peptide als Glykomimetika

4.1 Das L2/HNK-1-Epitop

Für molekulare Erkennungsprozesse zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) spielen Glykane eine entscheidende Rolle. Diese Oligo- und Polysaccharide sind strukturell mannigfaltig und in Glykoproteinen, Glykolipiden und Proteoglykanen auf Zelloberflächen und im Extrazellularraum allgegenwärtig. L2/HNK-1 ist ein solches Glykan, das aufgrund seiner Verbreitung und seiner interessanten Funktionen zu den meist-untersuchten Vertretern dieser Art von Biomolekülen gehört.

1981 erzeugten Abo und Balch monoklonale Antikörper gegen Membranfraktionen einer humanen T-Zelllinie. Einer dieser Antikörper erwies sich als spezifisch gegen ein Zelloberflächenantigen humaner Killerzellen (*human natural killer cells*) und erhielt daher den Namen HNK-1.^[175] Der Kohlenhydrat-Charakter des Antigens wurde 1984 nachgewiesen, wobei die ebenfalls gegen das Epitop gerichteten L2-Antikörper etabliert wurden.^[176] Während der HNK-1-Antikörper zunächst als Hilfsmittel in der Leukozytenforschung gedacht war, zeigten unmittelbar im Anschluss an die Entdeckung eine Reihe von Untersuchungen, dass der Antikörper mehrere Zelltypen des neuronalen Systems spezifisch zu markieren vermag.^[177–182] Seitdem wurde das L2/HNK-1-Epitop auf einer Vielzahl von Zelloberflächen- und ECM-Molekülen nachgewiesen. Eine unvollständige Auswahl ist in Tabelle 4.1 zusammengestellt.^[183]

4.1.1 Struktur

Wenige Jahre nach der Entdeckung zeigten mehrere Untersuchungen, dass das Epitop in jedem Fall eine 3-Sulfoglucuronsäure-Einheit als Kopfgruppe enthält. Ferner ließen die Studien auf ein essentielles Neolactosyl-artiges Rückgrat schließen.^[212–214] Die endgültige Charakterisierung des Epitops gelang jedoch erst im Zuge der Strukturaufklärung des Membranglykoproteins P₀ im Jahre 1996.^[215] Es handelt sich bei L2/HNK-1 um das Trisaccharid 3-O-Sulfo-GlcA(β-1→3)Gal(β-1→4)GlcNAc (Abbildung 4.1).

Tabelle 4.1: Eine Auswahl der bekannten Moleküle, die Träger des L2/HNK-1-Epitops sein können. [183]

Kategorie	Beispiele
I Glykoproteine	
a) Membranproteine	<p>Mitglieder der Ig-Superfamilie:</p> <p><i>neural cell adhesion molecule (N-CAM)</i>^[176]</p> <p><i>neuron glia cell adhesion molecule (Ng-CAM)</i>^[176,184]</p> <p><i>nerve growth factor-inducible large external glycoprotein (NILE)</i>^[185,186]</p> <p><i>Ng-CAM related CAM (Nr-CAM)</i>^[187]</p> <p><i>myelin associated glycoprotein (MAG)</i>^[188,189]</p> <p><i>peripheral myelin glycoprotein, P₀</i>^[190]</p> <p><i>transiently expressed axonal surface glycoprotein 1 (TAG-1)</i>^[191]</p> <p><i>F11/F3 glycoprotein</i>^[192,193]</p> <p>andere:</p> <p><i>human peripheral myelin protein 22 (PMP-22)</i>^[194]</p> <p><i>myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG)</i>^[195]</p> <p><i>Schwann cell membrane glycoprotein (SAG)</i>^[196]</p> <p><i>oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMGP)</i>^[197]</p> <p><i>α₁β₁ integrin</i>^[198,199]</p>
b) ECM-Proteine	<p><i>J1/tenascin/cytotactin/myotendinous antigen</i>^[200]</p> <p><i>hexabranchion/human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen</i>^[201,202]</p> <p><i>ependymin</i>^[203]</p>
c) Enzyme	<p><i>acetylcholinesterase E, butyrylcholinesterase E</i>^[204,205]</p> <p><i>5'-nucleotidase</i>^[206]</p>
II Proteoglykane	<p><i>cytotactin-binding proteoglycan</i>^[207]</p> <p><i>chondroitin sulphate proteoglycan</i>^[208-211]</p>
III Glykolipide	<p><i>3-sulphoglucuronylneolactotetraosylceramide,</i> <i>3-sulphoglucuronylneolactoheptaosylceramide</i> ^[212-214]</p>

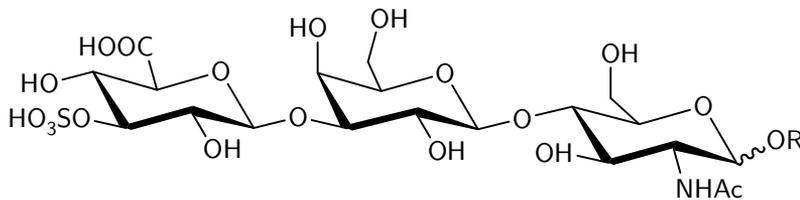


Abbildung 4.1: Struktur des L2/HNK-1-Epitops, 3-O-Sulfo-β-D-glucopyranosylsulfonsäure-(1→3)-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid. [215]

4.1.2 Funktion

Die Funktionen des L2/HNK-1-Epitops sind vielfältig; zu den wichtigsten gehören seine Beteiligung an den Interaktionen zwischen neuronalen Zellen während der Entwicklung, der Regeneration beschädigten Gewebes des peripheren Nervensystems, der Modifikation synaptischer Aktivität sowie an verschiedenen pathogenen Prozessen wie etwa bestimmten neurodegenerativen Autoimmunerkrankungen. Die Bedeutung des Epitops wird durch seine evolutionsgeschichtlich frühe Ausbildung und hohe phylogenetische Konservierung unterstrichen: Zu den Spezies, bei denen L2/HNK-1 bisher untersucht wurde, gehören neben dem Menschen andere Säugetierarten wie Mäuse und Ratten, weiter entfernt verwandte Chordatiere wie Hühner und Fische und sogar Vertreter anderer Stämme des Tierreichs, wie z. B. Insekten als Arthropoden oder Egel als Beispiel für Anneliden.^[216,217] Die Expression des Epitops folgt dabei in einem definierten räumlichen und zeitlichen Muster, dessen Ausprägung speziesspezifisch variieren kann.^[178,218] Im folgenden sollen einige ausgewählte Beispiele für nachgewiesene oder wahrscheinliche Funktionen von L2/HNK-1 vorgestellt werden.

Bei Untersuchungen an Femoralnerven von Mäusen wurde festgestellt, dass L2/HNK-1 spezifisch von Myelin-bildenden Schwannschen Zellen exprimiert wird, die mit Motoaxonen assoziiert sind. Hingegen weisen die mit sensorischen Axonen assoziierten Schwannschen Zellen keinerlei L2/HNK-1-Expression auf. Es zeigte sich ferner, dass die Neuritenbildung von Motoneuronen *in vitro* durch HNK-1-haltige Substrate gefördert wird.^[219,220] Träger des Epitops im Nervengewebe ist das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG), das zwar auch im sensorischen Gewebe vorzufinden ist, dort jedoch keine L2/HNK-1-Antikörperreaktivität zeigt.^[221] In weiteren Experimenten konnte bewiesen werden, dass Schwannsche Zellen ihr L2/HNK-1-Expressionsverhalten auch nach Trennung von den assoziierten Nervenzellen aufrechterhalten. Es liegt hier also eine Art molekulares Erinnerungsvermögen vor, das das Assoziationsverhalten der Schwannschen Zellen mit Axonen vor einer etwaigen Nervenschädigung reflektiert. Auf diese Weise kann L2/HNK-1 eine Wegweiserfunktion für motorische Axone im Zuge der Reinnervierung ausüben.^[222]

Ein weiteres Wirkungsfeld von L2/HNK-1 liegt in der Entwicklung, Selektion und Stabilisierung synaptischer Verbindungen. In Rattenhirnen tritt das Epitop, einem strikten Plan folgend, zu verschiedenen Zeitpunkten an verschiedenen Orten während der Entwicklung auf.^[223,224] Bei der frühen postnatalen Entwicklung der Katze tritt L2/HNK-1 auf der Zelloberflächen-5'-Nukleotidase von Gliazellen im visuellen Kortex auf, während die Synaptogenese und die Remodellierung synaptischer Verbindungen abläuft, um nach dieser Entwick-

lungsphase wieder zu verschwinden.^[225] Auch in der Retina des Huhns eignet sich L2/HNK-1 als Marker für Differenzierung und Festigung der Synapsenkonfiguration.^[226] Des Weiteren gibt es eine Reihe von Hinweisen auf eine Beteiligung des Epitops an Lernprozessen, wobei das Abrufen bereits gefestigter Kenntnisse aus dem Langzeitgedächtnis unbeeinflusst scheint, wie Untersuchungen an Mäusen^[227] und Zebrafischen^[228] zeigen.

Im Zuge der Embryonalentwicklung ist das L2/HNK-1-Epitop an einer Reihe weiterer Vorgänge beteiligt, wobei die genauen Wirkungsmechanismen noch nicht bekannt sind. So ist es z. B. für die Wanderung fötaler Neuralrohrzellen erforderlich und eignet sich als Marker für diese Zellen.^[229–231] Bei Säugtieren findet sich L2/HNK-1 auch im embryonalen Reizleitungssystem des Herzens.^[232,233]

Bezüglich der Beteiligung an pathogenen Prozessen ist besonders die Rolle von L2/HNK-1 als Zielepitop von Autoantikörpern bei einigen schweren peripheren Neuropathien interessant. In einem Maus-Modell für Multiple Sklerose konnte durch Injektion eines monoklonalen HNK-1-Antikörpers eine etwa 25%ige Remyelinierung erreicht werden. Als Ursache wird eine Wechselwirkung mit MAG vermutet, das *in vitro* die axonale Regeneration stark hemmt.^[234] Weiterhin konnte eine Beteiligung an neuropathischen Demyelinierungsprozessen beobachtet werden. So führt die Injektion autoimmuner humaner HNK-1-Antikörper bei Ratten^[235] und Hühnern^[236] zu Demyelinierung im PNS. Auch an einer anderen Art des pathogenen Vorgangs ist das Epitop beteiligt: Der initiale Anheftungsprozess des humanen Cytomegalovirus (HCMV) verläuft offenbar unter Beteiligung von L2/HNK-1, wie eine partielle Inhibition des Vorgangs durch HNK-1-Antikörper nahelegt.^[237]

Weitere Bedeutung kommt dem L2/HNK-1-Epitop aufgrund der Tatsache zu, dass es in der Regel in vom exprimierenden Gewebe abgeleiteten Tumoren erhalten bleibt. Unter anderem wurde es in kleinzelligen neuroendokrinen Lungenkarzinomen, Schwanzzell-abgeleiteten Tumoren, verschiedenen neoplastischen Neuroepithel-Tumoren und Prostatakarzinomen vorgefunden.^[238–243] Allgemein findet sich das Epitop in den meisten neuroektodermalen und neuroendokrinen Tumoren,^[181,244,245] so dass es sich in Kombination mit anderen Antikörpern als Marker eignet.^[246]

4.1.3 Molekulare Interaktionen

Die Identifizierung der Bindungspartner von L2/HNK-1 auf molekularer Ebene ermöglicht genauere Einblicke in die Funktion des komplexen Wechselspiels der Steuerung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Wie die Funktionsfülle des Epitops nahelegt, sind auch seine Interaktionen mit anderen

Zelloberflächen- und Matrixmolekülen vielgestaltig. Die wichtigsten der bisher bekannten Vertreter sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

Ein Rezeptor für L2/HNK-1 ist das ECM-Glykoprotein Laminin bzw. seine plazentale Isoform Merosin.^[247] Über Laminin kann L2/HNK-1 an der Kontaktvermittlung zwischen Zellen und ECM mitwirken, wobei es z. B. die Adhäsion neuronaler Zellen an Laminin vermittelt.^[247,248] Andere Untersuchungen zeigten, dass die Laminin-L2/HNK-1-Interaktion für die Auswuchsbildung von Astrozyten essentiell ist.^[249] Offenbar spielt die Wechselwirkung zwischen Laminin und L2/HNK-1 also eine entscheidende Rolle für die Substraterkennung durch Glia- und Nervenzellen.^[225]

Neben L2/HNK-1 bindet Laminin auch an die ebenfalls negativ geladenen, sulfatierten Glykosaminoglykane Heparin und Heparansulfat. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die jeweiligen Bindungsstellen in verschiedenen Domänen des Proteins liegen, so dass die beiden Kohlenhydratstrukturen sich trotz struktureller Verwandtschaft funktionell nicht ersetzen können.^[250] Interessanterweise interagiert Laminin auch mit einigen Vertretern der Integrine, welche ebenfalls das L2/HNK-1-Epitop tragen können. Die Bindungsstellen für Integrin und L2/HNK-1 liegen im gleichen Bereich des Laminins, so dass eine Vermittlung der Integrin-Laminin-Interaktion durch L2/HNK-1 denkbar ist.^[250-252]

Zu den Rezeptoren für L2/HNK-1 gehören auch L- und P-Selektine. Bei Selektinen handelt es sich um zelloberflächengebundene Lektine von Lymphozyten und Endothelzellen, die ursprünglich als Bindungspartner Sialyl-Lewis-artiger Kohlenhydrate entdeckt wurden.^[253] Ob die beiden Kohlenhydratstrukturen über separate Bindungsstellen verfügen, ist bisher noch nicht geklärt. Die Lokalisation auf Lymphozyten legt nahe, dass hier eine L2/HNK-1-vermittelte Verbindung zwischen Immun- und Nervensystem besteht. Auch eine Beteiligung von L2/HNK-1 an der Blut-Hirn-Schranke ist vermutet worden.^[254,255]

Als drittes Beispiel sei das Glykoprotein P₀ genannt, das sowohl als Rezeptor als auch selbst als Träger von L2/HNK-1 fungieren kann. P₀ ist im PNS das Hauptglykoprotein des Myelins. L2/HNK-1 ist an der homophilen Bindung zwischen P₀-Molekülen beteiligt, die somit nicht nur auf Protein-Protein-, sondern auch auf Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen beruht.^[256]

4.2 Mimikry von Kohlenhydraten durch Peptide

Unter Mimikry versteht man die von zahlreichen Tierarten genutzte Strategie der Nachahmung anderer Arten, etwa zum Zwecke der Tarnung, der Verteidigung oder der Jagd. In Anlehnung an die Natur wird der Begriff in der Che-

mie für eine starke Ähnlichkeit bezüglich Struktur oder Wirkung zwischen bestimmten Substanzen einerseits und Verbindungen nichtverwandter Substanzklassen andererseits verwendet. Dieses Prinzip ist für die Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe von großer Bedeutung. Natürliche Bindungspartner eines Wirkstoff-Zieles sind ein möglicher Ausgangspunkt der weiteren Strukturoptimierung, ebenso aber auch mittels *in vitro* oder *in silico* Screening identifizierte Substanzen, die chemisch mit dem Bindungspartner *in vivo* keineswegs verwandt sein, sondern dessen Interaktionen mit dem Zielmolekül lediglich nachahmen, also mimikrieren müssen. Ein weiteres bekanntes Beispiel für Mimikry in der pharmazeutischen Chemie ist die Überführung von Verbindungen in strukturell analoge Substanzen unter Erhalt der pharmakologischen Wirksamkeit, jedoch mit verbesserten Eigenschaften wie etwa größerer metabolischer Stabilität, höherer Bioverfügbarkeit und reduzierter Immunogenität. Bezüglich dieser Aspekte sind Kohlenhydrate als Pharmaka eher nachteilig, zumal sich ihre Synthese meist schwierig gestaltet. Glykomimetika sind somit ein möglicher Ansatz, falls es sich bei dem natürlichen Liganden eines pharmakologischen Zielmoleküls um ein Kohlenhydrat handelt.

Eine weitere Triebfeder für die Erforschung der Mimikry von Kohlenhydraten, speziell durch synthetisch wesentlich einfacher zugängliche Peptide, ist die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Untersuchungsmaterial für Studien der Funktion und Wirkungsmechanismen des jeweiligen Zuckers. Hierin besteht ein grundlegendes Problem, wie sich auch am Beispiel des L2/HNK-1-Epitops zeigt. Die Isolierung des Kohlenhydrats aus biologischen Quellen ist aufwendig, liefert nur geringe Ausbeuten und ist im Hinblick auf die mögliche Verwendung in klinischen Tests problematisch. Eine Totalsynthese^[257] sowie eine Synthese aus Tri- und Disaccharid-Vorstufen^[258] sind zwar beschrieben; diese erfordern allerdings einen erheblichen Zeit- und Kostenaufwand und sind daher abseits des akademischen Interesses für die Praxis nicht geeignet. Ein synthetisch leicht zugängliches peptidisches Mimetikum für L2/HNK-1 könnte daher zu einer wesentlichen Erleichterungen der Forschungen auf diesem Gebiet beitragen. Darüber hinaus könnte eine solche Substanz wiederum als Leitstruktur für die Entwicklung noch wirksamerer, eventuell auch nichtpeptidischer Mimetika dienen.

Die ersten peptidischen Mimetika für Kohlenhydrate wurden 1992 beschrieben.^[259,260] Als Mimetika eines Mannose-haltigen Oligosaccharids werden sie vom Lektin Concanavalin A gebunden. Aufgrund des Interesses an dieser Entdeckung folgten bald mehrere Publikationen, in denen über weitere peptidische Mimetika für Kohlenhydrate berichtet wurde, die von entsprechenden Antikörpern gebunden wurden. Als erstes Peptid dieser Art wurde 1993 ein Mimetikum des Le^Y-Tumorantigens beschrieben.^[261] Fast alle der heute be-

kannten peptidischen Glykomimetika sind mit Hilfe von Antikörper-Screenings identifiziert worden, wobei es auch Ausnahmen wie Liganden für α -Glucosidase^[262] oder E-Selektin^[263] gibt. Für eine umfangreiche Übersicht sei auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen.^[264]

Interessanterweise ist die Mimikry dabei zum Teil so weitreichend, dass ein mimetisches Peptid im Organismus eine Immunantwort gegen das originäre Kohlenhydrat auslösen kann und umgekehrt. Als eines der ersten Beispiele wurde 1995 von Westerink *et al.* ein 13mer-Peptid beschrieben, das als Mimetikum eine Immunantwort gegen ein Hüllkohlenhydrat von *Neisseria meningitidis* auslöst und im Tierversuch Mäuse vor einer Infektion zu schützen vermochte.^[265] Auch für solche sogenannten Mimitope gibt es mittlerweile zahlreiche Beispiele in der Literatur.^[264]

Während die funktionelle Mimikry von Kohlenhydraten durch Peptide als etabliert betrachtet werden kann, ist die Frage der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, also insbesondere ob auch eine strukturelle Mimikry vorliegt, noch nicht zufriedenstellend beantwortet worden.

Die meisten der bekannten Kohlenhydratmimetika haben einen auffallend hohen Anteil an Prolin und aromatischen Aminosäuren; viele enthalten eine der Konsensussequenzen YPY, WRY oder YRY.^[266,267] Diese Aminosäuren sind aufgrund ihrer cyclischen Seitenketten und ihrer Größe Kohlenhydraten strukturell durchaus ähnlich.^[268,269] Zusammen mit der breiten immunologischen Kreuzreaktivität einiger glykomimetischer Peptide legt dies die Vermutung nahe, dass der funktionellen Mimikry auch eine strukturelle zugrundeliegt.^[270,271] Allerdings ist das Auftreten von Kreuzreaktivitäten nicht notwendigerweise eine Konsequenz struktureller Mimikry.^[264]

Im Falle glykomimetischer Proteine liegen mittlerweile Kristallstrukturen vor, die eine strukturelle Mimikry belegen, wie z. B. im Komplex von pankreatischer α -Amylase und ihrem Inhibitor. Die Substrat-Enzym-Interaktionen werden dabei von Seitenketten des Inhibitors fast exakt nachgebildet, wobei ein katalytisches Wassermolekül verdrängt wird. Zusätzlich zu dieser Substrat-Mimikry induziert der Inhibitor eine Reihe konformationeller Änderungen im Enzym gegenüber dessen aktiver Form und bildet eine Reihe zusätzlicher Protein-Protein-Kontakte aus.^[272]

Bei kleineren Peptiden sind die Mechanismen der Mimikry noch nicht gänzlich aufgeklärt. Ein Beispiel hierfür ist die Mimikry einer von Concanavalin A gebundenen Trimannose durch das Peptid DVFYYPYASGS. Röntgenkristallographische Untersuchungen zeigten, dass die Bindung durch das Lektin an verschiedenen Stellen erfolgt, was eine strukturelle Mimikry ausschließen würde. Allerdings ist der Bindungsmodus des Peptids für die Monomere in der asymmetrischen Einheit nicht identisch, und es liegen kristallographische Kon-

takte unter Beteiligung des Peptids vor. Diese Beobachtungen rechtfertigen Zweifel an der Relevanz der Kristallstruktur für die tatsächlichen Verhältnisse in Lösung.^[273–275] Ferner weisen Docking- und andere Modeling-Berechnungen darauf hin, dass sowohl Peptid als Trimannose in beiden Bindungstaschen gebunden werden können. Möglicherweise handelt es sich bei der kristallographischen Peptidbindungsstelle um eine zweite Kohlenhydrat-Bindungsstelle oder eine Verlängerung der ersten zur Bindung längerer Glykane. Diese Befunde sprechen wiederum für eine strukturelle Mimikry.^[276]

In Kristallstrukturen von Komplexen eines Antikörpers gegen das O-Antigen von *Shigella flexneri*, ein Lipopolysaccharid, und dem Epitop bzw. einem dieses mimikrierenden Oktapeptid zeigen sich deutlich abweichende Bindungsmodi der Liganden. Nur ein kleiner Teil der Kontakte zwischen Kohlenhydrat und Antikörper wird vom Peptid nachgebildet, so dass in diesem Fall der Bindung keine strukturelle Mimikry zugrundeliegt. Es muss allerdings angemerkt werden, dass das Oktapeptid nur ein schwaches Mimitop ist, was möglicherweise auf unzureichende strukturelle Gemeinsamkeiten zum Kohlenhydrat zurückzuführen ist.^[277]

Auch weitere Untersuchungen lassen einen von Fall zu Fall unterschiedlichen Anteil struktureller Mimikry am funktionellen Nachahmungseffekt vermuten.^[264] Als Fazit bleibt festzuhalten, dass die Bedeutung struktureller Mimikry für die funktionelle Nachahmung von Kohlenhydraten gerade durch kleinere Peptide noch weitgehend unverstanden ist.

4.3 Ausgangsbasis und Zielsetzung der Untersuchungen

Vor dem Hintergrund der bereits in Abschnitt 4.2 beschriebenen Motivation versuchten Simon-Haldi *et al.* in der Arbeitsgruppe Schachner an der Universität Hamburg, ein Peptidmimetikum des Epitops zu identifizieren. Hierzu bedienten sie sich der Technik des *phage display* mit einer randomisierten 15mer-Peptidbibliothek, wobei in rekursiven Iterationen affine Sequenzen durch Bindung der Phagen an den L2/HNK-1-Antikörper selektiert wurden. Es konnten mehrere Peptidsequenzen identifiziert werden, die sowohl vom Antikörper gebunden wurden als auch *in vitro* bei Versuchen mit motorischen und sensorischen Neuronen eine dem L2/HNK-1-Epitop entsprechende Wirkung zeigten.^[278]

Im Rahmen seiner Dissertation^[279] an der Universität Bielefeld arbeitete Bächle an der Synthese und Identifizierung cyclischer Peptide, die gegenüber den zuvor von Simon-Haldi *et al.* erhaltenen linearen Peptiden eine gesteigerte

Affinität und Wirksamkeit aufweisen sollten. Hierzu zerlegte er die Sequenzen in überlappende Hexapeptid-Teilsequenzen und führte einen D-Aminosäure-Scan durch, bei dem jeweils eine der Aminosäuren durch ihr D-Isomer ersetzt wird. Der strukturinduzierende Einfluss der D-Aminosäure führt dabei in der Regel zur Ausbildung definierter Sekundärstrukturen, so dass die aktive Peptidsequenz in verschiedenen strukturellen Kontexten präsentiert wird (siehe Abschnitt 2.2.1).

In der Tat gelang es Bächle, gegenüber den linearen Ausgangszeptiden verbesserte Cyclopeptide zu erhalten. Hierbei erwiesen sich zwei Peptide als besonders affin: Aus Oberflächenplasmonresonanzmessungen ergeben sich für die Bindung an den Antikörper L2-412 K_D -Werte von $67 \mu\text{M}$ für c-(LSETTI) **6** gegenüber $791 \mu\text{M}$ für die lineare Ausgangssequenz TFKLSETTLEY Y bzw. $73 \mu\text{M}$ für c-(RTL PFS) **7** gegenüber $417 \mu\text{M}$ für die Ausgangssequenz TFQLSTR L PFS.^[279] Auch in Neuritenwachstumsexperimenten zeigten diese beiden Cyclopeptide eine erheblich gesteigerte stimulatorische Wirkung gegenüber den Ausgangssubstanzen.^[279,280]

c-(LSETTI) und c-(RTL PFS) sind somit aussichtsreiche Mimetika und interessant für weitere Untersuchungen. Im Rahmen dieser Arbeit soll in erster Linie mit NMR-spektroskopischen Methoden die dreidimensionale Struktur der beiden Peptide in Lösung aufgeklärt werden, so dass die genaue Kenntnis des strukturellen Kontextes der affinen Sequenzen zu einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen beitragen kann. Ein möglicherweise erkennbares gemeinsames Strukturmotiv könnte bei der Klärung der Frage helfen, ob es sich um eine rein funktionelle Mimikry handelt, oder ob strukturelle Grundlagen für den Nachahmungseffekt verantwortlich sind. Letztlich ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur im Hinblick auf die weitere Optimierung der Wirksamkeit als Leitstruktur von großem Nutzen.

4.4 Ergebnisse der Konformationsstudien

4.4.1 cyclo-(-Leu-Ser-Glu-Thr-Thr-D-Leu-) **6**

Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale in DMSO- D_6 ist in den Tabellen 4.15 und 4.16 in Abschnitt 4.6 zusammengefasst. Zahlreiche Signalüberlagerungen verhindern vor allem die hinreichend genaue Bestimmung von $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}$ -Kopplungskonstanten. Da jedoch nur wenige der experimentell erhaltenen NOE-Distanzen β -Protonen von Leu, Ser oder D-Leu betreffen, hätte eine vollständige stereospezifische Zuordnung keinen signifikanten Einfluss auf die modellierte Struktur. Die β -Protonen von Glu fallen zusammen. Auf eine Zuordnung diastereotoper Protonen durch weitere Messungen wird aus den

genannten Gründen verzichtet; alle β -Protonen werden als Pseudoatome erfasst.

Aus dem NOESY Spektrum können Informationen über insgesamt 45 Distanzen entnommen werden, darunter 28 intraresiduale, 14 sequentielle und 3 weiterreichende (Tabelle 4.2).

Die Distanzgeometrie liefert ein homogenes Ensemble von Strukturen, die alle in denselben Cluster fallen. Auch das Clustering nach der RMD führt zu nur einem Cluster und bestätigt somit, dass eine wohldefinierte Lösungsstruktur vorliegt.

Die über den Cluster gemittelten Rückgrattorsionswinkel sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Wie nach dem bisherigen Verständnis des strukturrinduzierenden Potentials von D-Aminosäuren zu erwarten ist, nimmt dabei D-Leu die $i+1$ -Position eines β II'-Turns mit den Referenzwerten nahekommender Geometrie ein. Eine schematische Darstellung der zentralen Struktur des RMD-Clusters zeigt Abbildung 4.2; in Abbildung 4.3 ist zusätzlich eine Stereodarstellung zu finden.

Eine die β II'-Schleife stabilisierende Wasserstoffbrücke zwischen Ser H^N und Thr⁵ O wird für den Großteil der Trajektorie ausgebildet. Der gegenüberliegende β -Turn mit Glu in $i+1$ -Position ähnelt einem β I-Turn, jedoch weicht der Torsionswinkel ψ des Thr⁴ in $i+2$ mit im Mittel -51° vom Referenzwert 0° ab, weshalb auch keine Wasserstoffbrücke zwischen Thr⁵ H^N und Ser O ausgebildet wird. Ein weiteres Charakteristikum der Struktur ist ein Netz von Wasserstoffbrücken, welches sich unter Beteiligung der Amidprotonen von Glu und Thr⁴, der γ -Protonen von Ser und Thr⁴ sowie der Carboxyl-Sauerstoffe

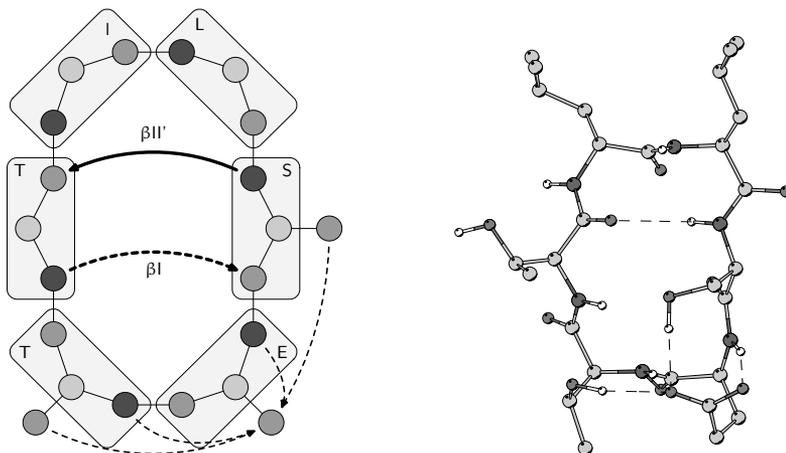


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Struktur von c-(LSETTI) sowie zentrale Struktur der RMD.

Tabelle 4.2: Gemessene NOE-Distanzen (exp), unter Berücksichtigung von Toleranz und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(LSETTI) **6**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Ser H ^N	D-Leu H ^α	328	361	358	Ser Q ^β	Ser H ^α	219	361	255
Thr ⁴ M ^γ	Ser Q ^β	413	732	669	Glu H ^N	Glu H ^α	262	288	267
Thr ⁵ H ^N	Ser H ^N	406	447	393	Glu Q ^β	Glu H ^α	230	374	227
Leu Q ^β	Ser H ^N	291	449	373	Glu Q ^β	Glu Q ^γ	231	500	218
Leu H ^N	D-Leu H ^α	194	213	206	Glu Q ^β	Glu H ^N	236	382	286
Ser H ^N	Leu H ^N	238	262	253	Glu Q ^γ	Glu H ^N	293	451	311
Ser H ^N	Leu H ^α	278	306	294	Glu Q ^γ	Glu H ^α	347	519	352
Ser H ^N	Glu H ^N	341	375	412	Thr ⁴ H ^N	Thr ⁴ H ^α	263	289	275
Glu H ^N	Ser H ^α	238	262	253	Thr ⁴ H ^N	Thr ⁴ H ^β	296	326	335
Glu H ^N	Ser Q ^β	231	375	289	Thr ⁴ H ^β	Thr ⁴ H ^α	235	259	252
Glu Q ^β	Thr ⁴ H ^N	273	427	345	Thr ⁴ H ^β	Thr ⁴ M ^γ	243	351	238
Thr ⁴ H ^N	Glu H ^N	264	290	265	Thr ⁴ M ^γ	Thr ⁴ H ^α	263	377	282
Thr ⁴ H ^N	Glu H ^α	328	361	343	Thr ⁴ M ^γ	Thr ⁴ H ^N	319	452	282
Thr ⁵ H ^N	Thr ⁴ H ^N	220	242	246	Thr ⁵ H ^N	Thr ⁵ H ^α	270	297	280
Thr ⁵ H ^N	Thr ⁴ H ^α	296	326	339	Thr ⁵ H ^N	Thr ⁵ H ^β	271	298	298
Thr ⁵ H ^N	D-Leu H ^N	379	417	420	Thr ⁵ H ^β	Thr ⁵ H ^α	241	265	235
D-Leu H ^N	Thr ⁵ H ^α	204	224	214	Thr ⁵ H ^β	Thr ⁵ M ^γ	271	388	235
Leu H ^N	Leu H ^α	273	300	277	Thr ⁵ M ^γ	Thr ⁵ H ^N	308	437	298
Leu H ^α	Leu Q ^β	246	394	257	Thr ⁵ M ^γ	Thr ⁵ H ^α	327	462	361
Leu H ^α	Leu H ^γ	365	401	264	D-Leu H ^α	D-Leu Q ^β	251	400	256
Leu Q ^δ	Leu H ^α	260	606	327	D-Leu H ^α	D-Leu H ^γ	369	406	262
Ser H ^N	Ser H ^α	262	288	283	D-Leu Q ^δ	D-Leu H ^α	373	773	345
Ser H ^N	Ser Q ^β	272	428	262					

Tabelle 4.3: Rückgrattorsionswinkel, gemittelt über die RMD, sowie gemessene und anhand der Torsionswinkel berechnete $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungskonstanten für c-(LSETTI) **6**.

Aminosäure	Winkel/°		Schleife	Position	$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	
	φ	ψ			exp.	berechnet
Leu	-90	21	βII'	<i>i</i> +2	11.0	7.9 (+1.4;-1.5)
Ser	-130	-169			9.2	9.5 (+1.4;-1.9)
Glu	-62	-41			4.9	4.4 (+1.3;-0.6)
Thr ⁴	-104	-49			9.2	8.7 (+1.4;-1.7)
Thr ⁵	-139	128			7.0	9.2 (+1.4;-1.9)
D-Leu	60	-110	βII'	<i>i</i> +1	6.7	4.2 (+1.3;-0.6)

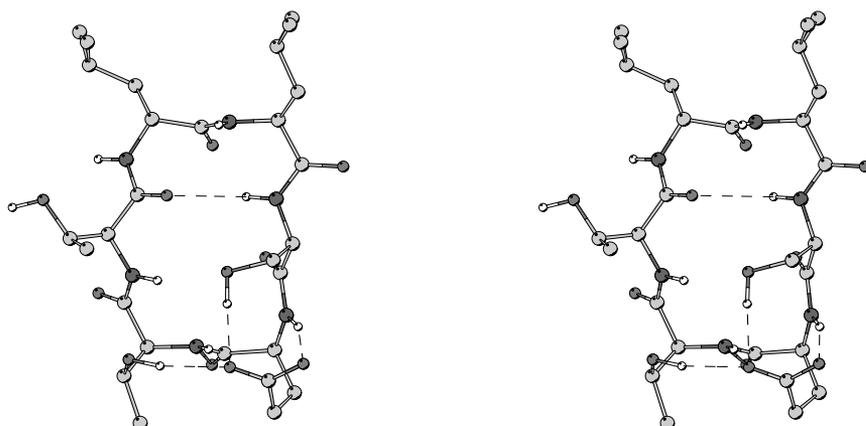


Abbildung 4.3: Strukturvorschlag für *c*-(LSETTI) **6** nach RMD in Stereodarstellung. Hauptmerkmale sind eine $\beta\text{II}'$ -Schleife mit D-Leu in $i+1$, ein βI -artiger Turn um Glu und Thr⁴ sowie ein Geflecht von Wasserstoffbrücken unter Beteiligung der Glu-Seitenkette.

des Glu bildet. Tabelle 4.4 gibt eine Übersicht über die Bildungshäufigkeiten der genannten Wasserstoffbrücken.

Mit nur sechs Überschreitungen der 45 NOE-Distanzen, einer Summenabweichung von 71 pm und einer Durchschnittsverletzung von 11 pm erfüllt das Modell die experimentellen Vorgaben sehr gut (Tabelle 4.2). Das Vorliegen eines $\beta\text{II}'$ -Turns mit einer D-Aminosäure in $i+1$ -Position wird durch zwei charakteristische starke NOE bestätigt, die von der Struktur erfüllt werden: Zwischen D-Leu H ^{α} und Leu H^N wird ein Abstand von 194 pm gemessen; der

Tabelle 4.4: Wasserstoffbrücken von *c*-(LSETTI) **6**

Donor	Akzeptor	Population/%	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
Ser H ^N	Thr ⁵ O	64	-3.9
Glu H ^N	Glu O ^{ϵ1}	65	-2.1
Glu H ^N	Glu O ^{ϵ2}	17	
Thr ⁴ H ^N	Glu O ^{ϵ2}	63	-2.1
Thr ⁴ H ^N	Glu O ^{ϵ1}	11	
Thr ⁵ H ^N	Thr ⁴ O ^{γ1}	9	-0.2
Thr ⁵ H ^N	Ser O	7	
Ser H ^{γ}	Glu O ^{ϵ1}	76	
Ser H ^{γ}	Glu O ^{ϵ2}	31	
Thr ⁴ H ^{γ1}	Glu O ^{ϵ2}	77	

durchschnittliche Abstand während der RMD beträgt 206 pm. Für Leu H^N und Ser H^N beträgt der experimentelle Abstand 238 pm, während der RMD im Mittel 253 pm. Auch der gegenüberliegende β I-artige Turn wird durch die NOE zwischen Glu H^N und Thr⁴ H^N (exp. 264 pm, RMD 265 pm) sowie zwischen Thr⁴ H^N und Thr⁵ H^N (exp. 220 pm, RMD 246 pm) gestützt (vgl. Abbildung 3.2).

Die gemessenen $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten stimmen für Ser, Glu und Thr⁴ fast exakt mit den berechneten Werten überein (Tabelle 4.3). Im Falle von Leu, Thr⁵ und D-Leu liegen die Werte leicht außerhalb des Erwartungsbereiches. Ebenso befinden sich die beobachteten Temperaturgradienten der Amidprotonen mit dem Wasserstoffbrückenmuster während der Simulation im Einklang (Tabelle 4.4). Für alle beobachteten Wasserstoffbrücken unter Beteiligung von Amidprotonen werden erwartungsgemäß Temperaturgradienten größer als -4 ppb K^{-1} gemessen.

Im Laufe der FMD über 10 ns erweist sich die Struktur als sehr beständig; 85% der Strukturen lassen sich demselben Cluster zuordnen. Der RMSD-Wert der Koordinaten der Rückgratome zwischen den zentralen Strukturen aus FMD und RMD beträgt lediglich 32 pm. β II'-Schleife und Wasserstoffbrückenmuster bleiben unverändert. Auch eine Betrachtung der NOE-Verletzungen während der freien MD (6 Überschreitungen, Summe 70 pm, Durchschnitt 11 pm) bestätigt die außerordentliche Stabilität der vorgeschlagenen Lösungsstruktur. Lediglich im Bereich der Peptidbindung zwischen Ser und Glu wird in einem zweiten, mit 7% nur wenig populierten Cluster eine gewisse Flexibilität sichtbar, die jedoch ohne Auswirkungen auf die generelle Topologie bleibt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass c-(LSETT1) **6** in DMSO eine wohldefinierte Lösungsstruktur einnimmt, die nur in sehr geringem Maße Flexibilität aufweist. Das vorgeschlagene Strukturmodell befindet sich in sehr guter Übereinstimmung mit allen experimentellen Daten sowie den Erwartungen aufgrund bekannter Hexapeptidstrukturen mit D-Aminosäuren.

4.4.2 cyclo-(-Arg-Thr-Leu-Pro-Phe-Ser-) **7**

Die Zuordnung der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale in DMSO-D₆ ist in den Tabellen 4.17 bis 4.20 in Abschnitt 4.6 zusammengefasst. Die Beobachtung zweier Signalsätze in den NMR-Spektren legt nahe, dass c-(RTLPPFS) in DMSO-D₆ in zwei Konformationen vorliegt. Das Intensitätsverhältnis der Signale beträgt a:b = 2:1. Chemischer Austausch zwischen den Signalsätzen, belegt durch zur Diagonalen phasengleiche Kreuzsignale im ROESY, bestätigt das Vorliegen zweier Konformere.

Aus den Daten geht hervor, dass sich die beiden Konformere in der Konfiguration der Peptidbindung zwischen Leu und Pro unterscheiden. Für Signalsatz a hat diese *trans*-Konfiguration, während bei Signalsatz b *cis*-Konfiguration vorliegt. Durch die in Tabelle 4.5 zusammengefassten ^{13}C -Verschiebungen und NOE-Distanzen wird dies eindeutig belegt (siehe auch Abschnitt 3.2.1): Die Differenz $\Delta\delta(\text{C}^\beta, \text{C}^\gamma)$ beträgt 3.5 ppm (a) bzw. 9.8 ppm (b); C^β ist im Signalsatz b gegenüber Signalsatz a tieffeldverschoben. Konsistent hierzu werden NOE zwischen den Protonen $\text{H}^{\text{N}}/\text{H}^\alpha$ des Leu und den δ -Protonen (a) bzw. dem α -Proton (b) des Pro beobachtet.

Signalsatz a

Eine Zuordnung diastereotoper Protonen ist nicht sicher möglich. Bei Phe lassen zwar die Kopplungskonstanten die Bevorzugung eines Seitenketten-Rotamers vermuten. Die beobachteten NOE hingegen sind für die beiden β -Protonen gleich und sprechen somit gegen ein bevorzugtes Rotamer (Tabelle 4.6). Daher wird mit einem Pseudoatom gerechnet, um eine möglicherweise falsche Festlegung der Seitenkettenorientierung zu vermeiden. Abgesehen hiervon wäre der Nutzen einer Zuordnung ohnehin gering, da keine interresidualen NOE mit Beteiligung der β -Protonen des Phe beobachtet werden. Die β -Protonen von Arg und Ser fallen zusammen, so dass keine Zuordnung möglich ist und mit Pseudoatomen gerechnet werden muss. Im Falle von Leu verhindern Signalüberlagerungen die Bestimmung von Kopplungskonstanten. Für Leu und Pro wurde versucht, mit Hilfe von DG-Läufen mit komplementären Zuordnungen zwischen den

Tabelle 4.6: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **7a**.

	Phe	$\text{H}^{\beta\text{h}}$	$\text{H}^{\beta\text{l}}$
$^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}/\text{Hz}$		12.1	4.0
d/nm	$\text{H}^\alpha/\text{H}^\beta$	211	215
	$\text{H}^{\text{N}}/\text{H}^\beta$	329	327

Tabelle 4.5: Für die *cis/trans*-Zuordnung relevante ^{13}C -Verschiebungen und NOE-Distanzen von **7**.

		Signalsatz a	Signalsatz b
δ/ppm	Pro C^β	29.1	31.2
	Pro C^γ	25.6	21.4
d/pm	$\text{H}^{\alpha,\text{L}}/\text{H}^{\alpha,\text{P}}$	—	207
	$\text{H}^{\text{N},\text{L}}/\text{H}^{\alpha,\text{P}}$	—	368
	$\text{H}^{\alpha,\text{L}}/\text{H}^{\delta,\text{P}}$	243	—
	$\text{H}^{\text{N},\text{L}}/\text{H}^{\delta,\text{P}}$	414	—

diastereotopen Protonen zu unterscheiden. Jedoch kann in keinem Fall ein signifikanter Unterschied der summarischen NOE-Verletzungen oder der Energien der Strukturen beobachtet werden, so dass ebenfalls mit Pseudoatomen gerechnet wird. Aus dem NOE-Spektrum lassen sich Informationen über insgesamt 40 Distanzen entnehmen, darunter 24 intraresiduale, 14 sequentielle und 2 weiter reichende (Tabelle 4.7).

Das Clustering der mittels Distanzgeometrie generierten Strukturen führt zu einer einzelnen Strukturfamilie, ein erstes Indiz für eine wohldefinierte Konformation. Auch während der folgenden *restrained* MD fallen alle beobachteten Strukturen in einen einzelnen Cluster, der im Folgenden als Strukturvorschlag für **7a** diskutiert wird. Eine Darstellung der zentralen Struktur des Clusters zeigt Abbildung 4.4, in Abbildung 4.5 ist ferner eine Stereodarstellung zu finden.

Eine Zusammenstellung der gemittelten Rückgrattorsionswinkel sowie der beobachteten Wasserstoffbrücken findet sich in den Tabellen 4.8 und 4.9. Ein sofort ins Auge fallendes Merkmal ist ein γ -Turn um Arg, der durch eine zu 75% ausgebildete Wasserstoffbrücke zwischen Thr H^N und Ser O stabilisiert wird. Eine leichte Verzerrung erfolgt durch einen gewissen β -Turn-Anteil, ebenso mit Arg in $i+1$ -Position, wie eine gelegentlich (15%) ausgebildete Wasserstoffbrücke zwischen Leu H^N und Ser O belegt. Das gegenüberliegende Strukturelement ist ebenfalls ein Hybrid aus γ - und β -Turn, dessen Torsions-

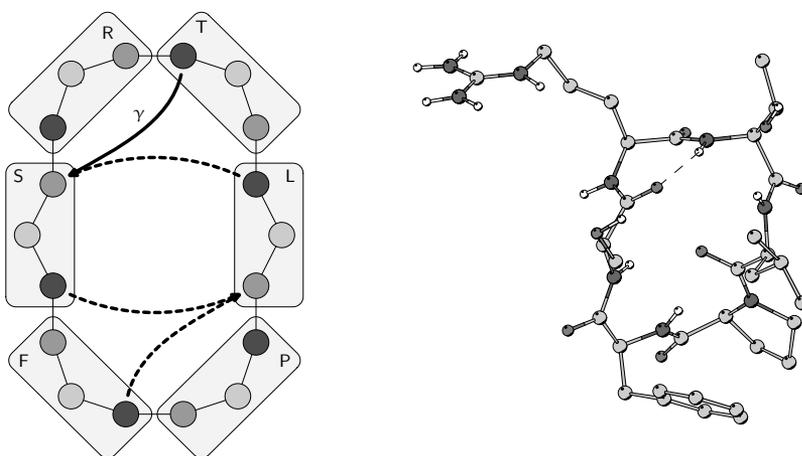


Abbildung 4.4: Strukturvorschlag für *c*-(RTLPPF) **7a**. Zwei Schleifenstrukturen liegen sich gegenüber, die sowohl Anteile eines γ - als auch eines β -Turns haben. Die Population der korrespondierenden Wasserstoffbrücken weist darauf hin, dass der γ -Anteil stärker ausgeprägt ist (Tabelle 4.9). In den $i+1$ -Positionen befinden sich Arg und Pro, wobei nur der γ -Turn um Arg den Referenztorsionswinkeln entspricht. Wasserstoffbrücken unter Beteiligung von Seitenkettenatomen werden nicht beobachtet.

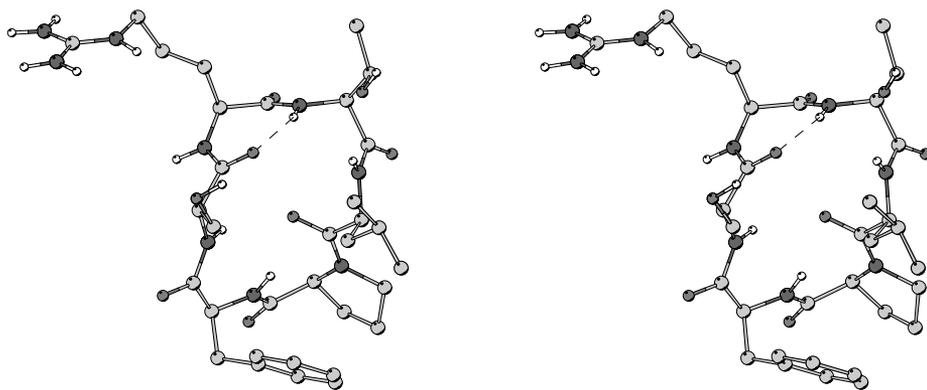


Abbildung 4.5: Stereodarstellung der zentralen RMD-Struktur von c-(RTLPPF) **7a**.

winkel sich jedoch mit keinem der Standard-Turns decken. Pro nimmt die $i+1$ -Position ein, wobei die entsprechenden Wasserstoffbrücken zwischen Phe H^N und Leu O sowie Ser H^N und Leu O zu 65% bzw. 32% der Trajektorie beobachtet werden können. Seitenkettenatome sind kaum an Wasserstoffbrücken beteiligt. Lediglich zwischen Leu H^N und Thr H^{γ1} tritt eine solche auf, mit 9% allerdings selten.

Ein Vergleich der experimentellen NOE- mit den über die RMD-Trajektorie im Mittel beobachteten Distanzen (Tabelle 4.7) ergibt eine Summenabweichung von 119 pm durch 6 Überschreitungen von im Mittel 16 pm. Es handelt sich dabei ausschließlich um Verletzungen unter Beteiligung von Amidprotonen, deren Abstände meist zu klein gemessen werden. Dies berücksichtigend befinden sich Messung und Simulation bezüglich der NOE-Distanzen in guter Übereinstimmung. Der β -Turn-Anteil der beiden Schleifen in der vorgeschlagenen Struktur wird durch die NOE zwischen Thr H^N und Leu H^N (exp. 199 pm, RMD 209 pm) bzw. zwischen Phe H^N und Ser H^N (exp. 250 pm, RMD 196 pm) unterstützt.

Beim Vergleich der experimentell bestimmten mit nach Karplus berechneten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten liegen Leu und Ser außerhalb des gewöhnlich beobachteten Bereiches. In beiden Fällen wird eine größere Kopplungskonstante gemessen, als anhand des Torsionswinkels während der RMD zu erwarten wäre. Die Ursache ist unklar. Für Arg, Thr und Phe stimmen die gemessenen Werte mit den berechneten überein.

Bei der Betrachtung der Temperaturgradienten der Amidprotonen fällt auf, dass für Thr H^N und Phe H^N mit -5.4 bzw. -5.2 ppb K⁻¹ trotz der häufig ausgebildeten Wasserstoffbrücke recht kleine Werte gemessen werden. Der mit 0.6 ppb K⁻¹ auffallend große Gradient von Leu H^N erklärt sich neben der Beteiligung an Wasserstoffbrücken zu Ser O und Thr O^{γ1} aus der Abschirmung

Tabelle 4.7: Gemessene NOE-Distanzen, unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand für c-(RTLPPFS) **7a**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Leu H $^{\alpha}$	Phe H $^{\text{N}}$	354	389	409	Arg H $^{\alpha}$	Arg Q $^{\delta}$	287	445	287
Leu Q $^{\beta}$	Ser Q $^{\beta}$	286	577	347	Arg H $^{\alpha}$	Arg H $^{\epsilon}$	387	426	388
Thr H $^{\text{N}}$	Leu H $^{\alpha}$	376	414	444	Arg Q $^{\beta}$	Arg Q $^{\delta}$	265	547	304
Thr H $^{\alpha}$	Leu H $^{\text{N}}$	307	338	345	Arg Q $^{\beta}$	Arg H $^{\epsilon}$	311	474	343
Thr H $^{\beta}$	Leu H $^{\text{N}}$	303	333	306	Arg Q $^{\gamma}$	Arg Q $^{\delta}$	233	503	230
Leu H $^{\text{N}}$	Thr H $^{\text{N}}$	199	219	209	Arg Q $^{\gamma}$	Arg H $^{\epsilon}$	323	488	264
Leu H $^{\text{N}}$	Pro Q $^{\delta}$	414	601	482	Arg Q $^{\delta}$	Arg H $^{\epsilon}$	276	431	184
Leu H $^{\alpha}$	Pro Q $^{\delta}$	243	390	221	Thr H $^{\beta}$	Thr M $^{\gamma}$	226	329	238
Leu Q $^{\beta}$	Thr H $^{\text{N}}$	352	524	427	Leu H $^{\text{N}}$	Leu H $^{\alpha}$	277	305	270
Leu Q $^{\beta}$	Pro Q $^{\delta}$	227	495	372	Leu H $^{\text{N}}$	Leu Q $^{\beta}$	262	413	280
Leu Q $^{\delta}$	Pro Q $^{\delta}$	298	806	475	Leu H $^{\text{N}}$	Leu Q $^{\delta}$	397	809	376
Pro H $^{\alpha}$	Phe H $^{\text{N}}$	217	239	251	Leu H $^{\alpha}$	Leu Q $^{\beta}$	253	402	254
Phe H $^{\text{N}}$	Ser H $^{\text{N}}$	250	275	196	Leu H $^{\alpha}$	Leu H $^{\gamma}$	284	312	267
Phe H $^{\alpha}$	Ser H $^{\text{N}}$	283	311	294	Leu H $^{\alpha}$	Leu Q $^{\delta}$	301	666	348
Ser H $^{\text{N}}$	Arg H $^{\alpha}$	303	333	361	Phe H $^{\text{N}}$	Phe H $^{\alpha}$	224	246	263
Ser H $^{\alpha}$	Arg H $^{\text{N}}$	277	305	231	Phe H $^{\text{N}}$	Phe Q $^{\beta}$	327	494	349
Arg H $^{\text{N}}$	Arg Q $^{\gamma}$	271	424	322	Phe H $^{\alpha}$	Phe Q $^{\beta}$	211	350	225
Arg H $^{\text{N}}$	Arg Q $^{\delta}$	345	517	378	Ser H $^{\text{N}}$	Ser H $^{\alpha}$	272	299	254
Arg H $^{\alpha}$	Arg Q $^{\beta}$	227	371	262	Ser H $^{\text{N}}$	Ser Q $^{\beta}$	251	400	341
Arg H $^{\alpha}$	Arg Q $^{\gamma}$	255	404	286	Ser H $^{\alpha}$	Ser Q $^{\beta}$	218	359	253

Tabelle 4.8: Rückgrattorsionswinkel, gemittelt über die RMD, sowie gemessene und anhand der Torsionswinkel berechnete $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten für c-(RTLPPFS) **7a**.

AS	Winkel/ $^{\circ}$		Turn	Position	$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	
	φ	ψ			exp.	berechnet
Arg	52	-51	γ	$i+1$	7.7	6.8 (+1.9;-1.5)
Thr	-103	-46			9.3	9.1 (+1.4;-1.8)
Leu	-67	144			8.5	5.1 (+1.3;-0.9)
Pro	-67	31				
Phe	-161	8			6.7	6.6 (+1.3;-1.3)
Ser	-179	70			8.3	4.3 (+1.3;-0.6)

Tabelle 4.9: Wasserstoffbrücken von c-(RTLPPFS) **7a**.

Donor	Akzeptor	Population /%	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
Thr H ^N	Ser O	75	-5.4
Leu H ^N	Ser O	15	0.6
Phe H ^N	Leu O	64	-5.2
Ser H ^N	Leu O	33	-0.8

gegenüber dem Lösungsmittel durch die Seitenketten von Thr sowie von Leu selbst.

Das Clustering nach der freien MD führt zu einer Hauptkonformation, die zu 90% angenommen wird. Eine mit 7% nahezu bedeutungslose Nebenkongformation resultiert aus einem reversiblen Umklappen der Peptidbindung zwischen Phe und Ser; nach kurzer Zeit stellt sich jedoch die Hauptkonformation wieder ein. Bezogen auf die Rückgrat-atome der zentralen Strukturen von RMD und Hauptcluster der freien MD beträgt der RMSD-Wert nur 26 pm, so dass die generelle Topologie als stabil bezeichnet werden kann.

Eine Betrachtung der Torsionswinkel und Wasserstoffbrücken zeigt, dass die β -Turn-Anteile während der freien MD an Bedeutung gewinnen. Während der γ -Turn um Arg kaum noch durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird, bildet sich eine solche während 55% der Trajektorie zwischen Leu H^N und Ser O aus. Der zugrundeliegende β -Turn ist zwar gegenüber den Referenzgeometrien verzerrt, ähnelt jedoch einem $\beta\text{II}'$ -Turn. Gegenüberliegend bildet sich zu 35% eine Wasserstoffbrücke zwischen Ser H^N und Leu O aus. Auch hier entsprechen die Torsionswinkel keinen β -Turn-Referenzwerten.

Die Verletzung der NOE-Distanzen nimmt während der freien MD deutlich zu. Gemittelt über die Trajektorie werden 7 Überschreitungen beobachtet, die sich auf 517 pm summieren. Dieser relativ große Wert wird durch die Betrachtung der einzelnen Verletzungen relativiert; wie schon bei der RMD beziehen sich die überschrittenen Distanzen stets auf mindestens ein Amidproton.

Das charakterisierende Strukturelement von c-(RTLPPFS) **7a** ist also ein γ -Turn, der von einem stark verzerrten $\beta\text{II}'$ -Turn überlagert wird, jeweils mit Arg in der $i+1$ -Position. Unter Berücksichtigung aller Validierungskriterien kann ferner von einer zufriedenstellenden Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment gesprochen werden.

Signalsatz b

Eine Bestimmung von $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}$ -Kopplungskonstanten ist für Arg, Leu sowie Phe aufgrund von Signalüberlagerungen nicht möglich. Auch DG-Rechnungen

mit entgegengesetzter Zuordnung liefern keine sichere Zuordnungsmöglichkeit. Im Falle von Ser fallen die β -Protonen zusammen. Daher wird in allen Fällen mit Pseudoatomen gerechnet.

Die Auswertung des NOESY-Spektrums ergibt insgesamt 40 Abstände, darunter 23 intraresiduale, 13 sequentielle sowie 4 weiter reichende (Tabelle 4.11).

Die Distanzgeometrie führt zu einem einzelnen Cluster. Während der RMD erweist sich dessen zentrale Struktur in Teilbereichen als flexibel, woraus insgesamt fünf Cluster resultieren. Mit 36% und 28% der Trajektorie sind zwei Cluster von größerer Bedeutung als drei weniger populierte Strukturfamilien mit Anteilen von 10, 10 und 5%. Bei Betrachtung der Rückgrattorsionswinkel (Tabelle 4.10) und der Darstellung der zentralen Strukturen (Abbildung 4.7) wird deutlich, dass sich die Flexibilität auf die Peptidbindungen zwischen Arg und Thr sowie zwischen Phe und Ser beschränkt. Davon abgesehen bleibt die Topologie des Peptids während der RMD stabil.

Eine schematische Darstellung sowie ein *ball-and-stick* Modell der über alle RMD-Cluster gemittelten Struktur finden sich in Abbildung 4.6. Erkennbar ist ein γ -Turn-ähnliches Strukturelement mit Ser in $i+1$ -Position, wobei die Torsionswinkel gegenüber der Referenzgeometrie deutlich verzerrt sind. Die einzige in nennenswertem Maße populierte Rückgrat-Wasserstoffbrücke zwischen Arg H^N und Phe O stabilisiert diesen Turn (Tabelle 4.13). Die Anordnung um Ser und Arg ähnelt auch einem β I-Turn, wobei durch den von der Referenzgeometrie abweichenden ψ -Winkel des Arg keine entsprechende Wasserstoffbrücke ausgebildet werden kann. In Cluster IV tritt ferner ein γ -Turn mit Thr in $i+1$ -Position auf. Dieser Cluster ist mit 10% der Trajektorie aber nur von geringer Bedeutung. Pro befindet sich in der $i+2$ -Position eines Turns, der am besten als eine Mischung des β VIa- und β VIb-Typs beschrieben werden kann. Hierfür ist das *cis*-Pro prädestiniert, da in beiden Fällen eine *cis*-Konfiguration der Peptidbindung zur Aminosäure in $i+2$ Voraussetzung für die Turnbildung ist. Das System bewegt sich während der Simulation zwischen den beiden Extremen, ohne eines von beiden für längere Zeit auszubilden. Weitere klassische Sekundärstrukturelemente sind im Modell nicht vorhanden.

Die gemessenen sowie die während der RMD im Mittel beobachteten interatomaren Abstände sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Die Übereinstimmung ist sehr gut: Es sind 8 geringe Überschreitungen von durchschnittlich 8 pm zu verzeichnen, entsprechend eine Summenabweichung von 65 pm. Zudem sind bei allen Verletzungen Amidprotonen involviert.

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen (siehe Tabellen 4.13 und 4.19) sprechen für die Beteiligung von Arg H^N an einer Wasserstoffbrücke aufgrund eines Wertes von -1.8 ppb K^{-1} . Mit Werten kleiner -4 ppb K^{-1} sollten die

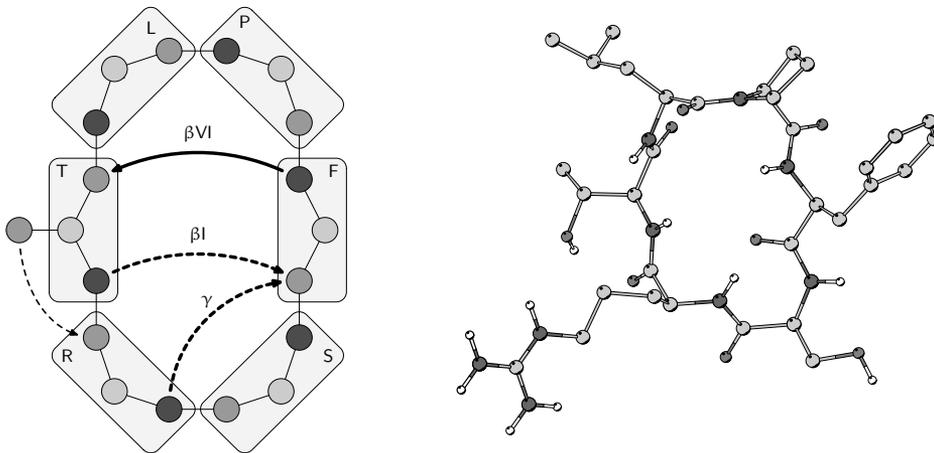


Abbildung 4.6: Strukturvorschlag für *c*-(RTL PFS) **7b**, in schematischer Darstellung sowie als *ball-and-stick* Modell der gemittelten RMD-Cluster. Um Ser ist ein verzerrter γ -Turn zu erkennen, der zu 26% durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird, und von einem ebenfalls verzerrten β I-Turn überlagert wird. Pro befindet sich in Position $i+2$ einer Mischung zwischen β VIa und β VIb-Turn. Davon abgesehen weist das Modell keine Übereinstimmung mit Referenzgeometrien auf. Zwischen Thr $H^{\gamma 1}$ und Arg O wird während 26% der Trajektorie eine Wasserstoffbrücke ausgebildet.

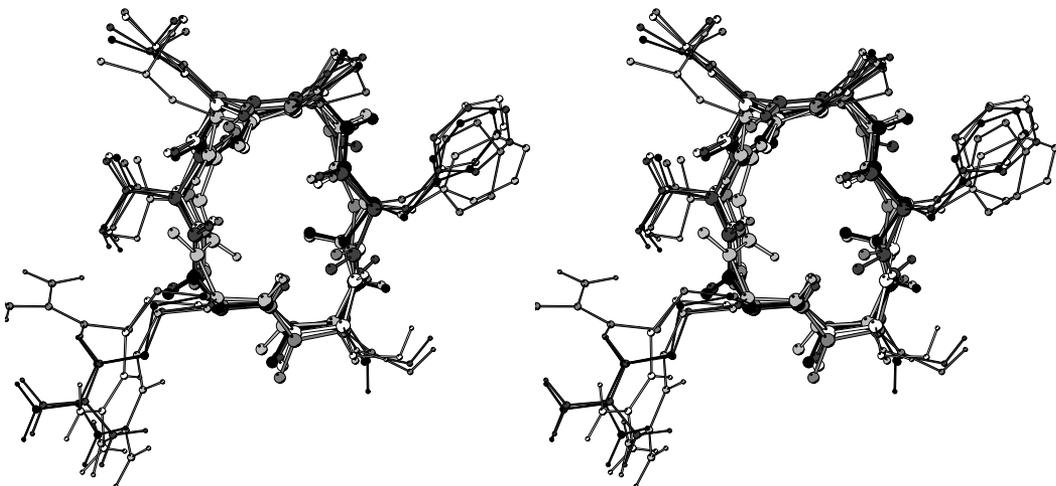


Abbildung 4.7: Überlagerung der fünf Cluster von *c*-(RTL PFS) **7b** in Stereodarstellung. Die Flexibilität konzentriert sich auf die Peptidbindungen zwischen Arg und Thr sowie zwischen Phe und Ser. Farbgebung: Cluster I (36%) schwarz, Cluster II (28%) dunkelgrau, Cluster III (10%) mittelgrau, Cluster IV (10%) hellgrau, Cluster V (5%) weiß.

Tabelle 4.10: Rückgrattorsionswinkel, je Cluster gemittelt über die RMD, für c-(RTL PFS) **7b**.

	Arg		Thr		Leu		Pro		Phe		Ser	
	φ	ψ										
I	-99	-76	-155	-60	-119	112	-105	15	-123	-138	-52	-12
II	-108	-74	-142	-66	-139	109	-110	23	-130	101	60	-13
III	-135	-81	-154	-65	-117	105	-95	-14	-169	153	72	-8
IV	-112	42	67	-42	-115	100	-101	8	-126	-121	-55	-28
V	-106	-75	-155	-57	-118	112	-105	1	-123	-89	-83	-13
\emptyset	-109	-69	-155	-60	-125	109	-104	13	-130	-169	-13	-13

Tabelle 4.11: Gemessene NOE-Distanzen, unter Berücksichtigung von Toleranz und Korrekturen resultierende Maximaldistanz sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand für c-(RTL PFS) **7b**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Arg H ^N	Phe H ^N	336	370	337	Arg H ^{α}	Arg Q ^{δ}	283	439	283
Arg H ^N	Phe Q ^{β}	276	431	424	Arg Q ^{β}	Arg H ^{ϵ}	360	534	361
Arg Q ^{γ}	Leu H ^N	244	391	412	Arg Q ^{γ}	Arg H ^{ϵ}	301	462	258
Thr H ^N	Phe H ^N	316	348	352	Arg Q ^{δ}	Arg H ^{ϵ}	276	431	184
Arg H ^N	Thr H ^N	231	254	260	Thr H ^N	Thr H ^{α}	275	302	257
Arg H ^{α}	Thr H ^N	289	318	323	Thr H ^N	Thr H ^{β}	274	301	307
Thr H ^{β}	Leu H ^N	344	378	233	Thr H ^{α}	Thr M ^{γ}	268	384	287
Leu H ^N	Pro H ^{α}	368	405	399	Thr H ^{β}	Thr M ^{γ}	253	364	239
Leu H ^{α}	Pro H ^{α}	207	228	169	Leu H ^N	Leu Q ^{β}	286	444	304
Pro H ^{α}	Phe H ^N	294	323	298	Leu H ^N	Leu H ^{γ}	248	273	277
Pro Q ^{β}	Phe H ^N	341	511	435	Leu H ^N	Leu Q ^{δ}	328	707	434
Pro Q ^{γ}	Phe H ^N	332	500	425	Leu H ^{α}	Leu Q ^{β}	308	471	245
Phe H ^N	Ser H ^N	321	353	360	Leu H ^{α}	Leu Q ^{δ}	269	619	358
Phe H ^{α}	Ser H ^N	250	275	239	Pro H ^{α}	Pro Q ^{β}	211	350	239
Phe Q ^{β}	Ser H ^N	229	373	224	Pro H ^{α}	Pro Q ^{γ}	338	508	379
Ser H ^{α}	Arg H ^N	268	295	303	Phe H ^N	Phe H ^{α}	271	298	275
Ser Q ^{β}	Arg H ^N	269	422	356	Phe H ^N	Phe Q ^{β}	238	384	306
Arg H ^N	Arg H ^{α}	263	289	284	Phe H ^{α}	Phe Q ^{β}	221	363	247
Arg H ^N	Arg Q ^{β}	262	413	252	Ser H ^N	Ser H ^{α}	277	305	223
Arg H ^{α}	Arg Q ^{γ}	221	363	318	Ser H ^N	Ser Q ^{β}	250	399	307

Amidprotonen von Leu, Phe und Ser dem Lösungsmittel exponiert sein. In der Tat werden diese Erwartungen von der erhaltenen Struktur erfüllt. Lediglich der Gradient von Thr H^N ist mit 0.0 ppb K⁻¹ unerwartet groß, da eine Wasserstoffbrücke nur gelegentlich (7% der Trajektorie) zu Phe O ausgebildet wird und eine Abschirmung gegenüber dem Lösungsmittel durch Seitenketten nicht erkennbar ist.

Zur Validierung der gemessenen ³J_{HNHα}-Kopplungskonstanten werden die entsprechend der Clustergröße gewichteten Mittelwerte der φ-Winkel verwendet (Tabelle 4.12). Für Arg, Thr und Phe entsprechen die gemessenen den berechneten Werten. Der Wert für Ser liegt leicht außerhalb des Normalbereichs, hat aber sowohl experimentell als auch berechnet einen auffallend kleinen Betrag und kann als übereinstimmend gewertet werden. Für Leu konnte keine Kopplungskonstante bestimmt werden.

Die freie MD zeigt ein sehr bewegliches Molekül, wie aufgrund der bereits während der *restrained* MD beobachteten Flexibilität zu erwarten ist. Die Verletzung der experimentellen NOE-Distanzen nimmt nur leicht zu auf eine Summenabweichung von 108 pm, in allen 10 Fällen unter Beteiligung von Amidprotonen. Wie schon während der RMD orientiert sich die Peptidbindung zwischen Phe und Ser reversibel um. Besonders interessant ist das Verhalten des βVI-Turns während der freien MD. Dieser zeigt eine deutlichere Tendenz,

Tabelle 4.12: Gewichtet gemittelte φ-Winkel, hieraus berechnete sowie gemessene ³J_{HNHα}-Kopplungskonstanten für c-(RTL PFS) **7b**.

AS	φ/°	³ J _{HNHα} /Hz	
		exp.	berechnet
Arg	-109	8.3	9.4 (+1.5; -1.9)
Thr	-155	7.9	7.3 (+1.4; -1.4)
Leu	-125	—	9.7 (+1.4; -2.0)
Phe	-130	9.3	9.5 (+1.4; -1.9)
Ser	-13	4.0	2.1 (+1.3; -0.2)

Tabelle 4.13: Wasserstoffbrücken von c-(RTL PFS) **7b**.

Donor	Akzeptor	Population/% in Cluster						$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
		∅	I	II	III	IV	V	
Arg H ^N	Phe O	26	15	55	22	51	11	-1.8
Leu H ^N	Arg O	10	0	0	0	84	0	-5.1
Thr H ^N	Phe O	7	0	0	1	51	0	0.0
Thr H ^{γ1}	Arg O	26	44	6	33	1	39	

eine den Referenzgeometrien β VIa und β VIb entsprechende Konformation einzunehmen, als es während der RMD der Fall war. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass diese im Kraftfeld energetisch begünstigt sind und daher ohne experimentelle Energieterme bevorzugt werden. Zur Verdeutlichung der beiden Grenzstrukturen sind in Abbildung 4.8 die zentralen Strukturen der beiden meistpopulierten FMD-Cluster dargestellt. Der verzerrte γ -Turn um Ser wird während der FMD kaum noch ausgebildet.

Abschließend kann als Strukturvorschlag für *c*-(RTLPS) **7b** das in Abbildung 4.6 dargestellte Modell mit einem β VIa/b-Hybrid-Turn mit Phe in *i*+2 sowie einem gering populierten, verzerrten γ -Turn um Ser festgehalten werden. Wegen der beobachteten Flexibilität muss gerade in diesem Fall berück-

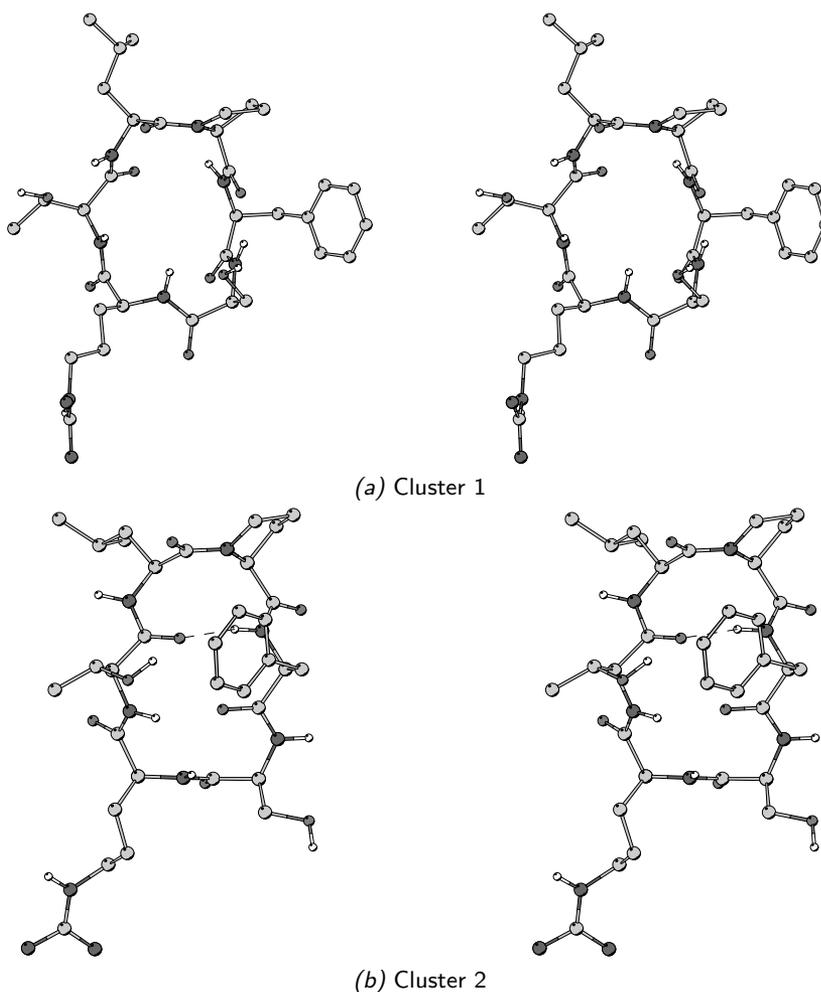


Abbildung 4.8: Zentrale Strukturen der beiden meistpopulierten Cluster während der FMD von *c*-(RTLPS). Bei a ist ein β VIb-, bei b ein β VIa-Turn ausgebildet.

sichtigt werden, dass die abgebildeten Strukturen Momentaufnahmen eines dynamischen Systems sind.

4.5 Diskussion

Mit den Modellen für *c*-(LSETT1) **6** und *c*-(RTL PFS) **7** stehen die ersten strukturellen Informationen peptidischer Mimetika des L2/HNK-1-Epitops zur Verfügung. Die vorgestellten Lösungsstrukturen sind sinnvoll und erfüllen die experimentellen NMR-spektroskopischen Vorgaben.

Die beobachteten Sekundärstrukturen stimmen dabei auch mit den Erwartungen überein, die aufgrund der enthaltenen strukturinduzierenden Aminosäuren plausibel erscheinen. In *c*-(LSETT1) befindet sich D-Leu in der *i*+1-Position eines β II'-Turns. Bei *trans*-Konfiguration der Leu-Pro-Peptidbindung in *c*-(RTL PFS) nimmt Pro die *i*+1-Position eines β -Turn-artigen Strukturelements ein, bei *cis*-Konfiguration die *i*+2-Position eines β VI-Turns. Die Ergebnisse zeigen diesbezüglich keine ungewöhnlichen Phänomene. Angesichts der großen strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Konformeren von *c*-(RTL PFS) ist es unwahrscheinlich, dass beide Formen zur Mimikry des L2/HNK-1-Epitops beitragen.

Sowohl *c*-(LSETT1) als auch *c*-(RTL PFS) enthalten mehrere hydroxylierte Seitenketten, eine für Kohlenhydrate mimikrierende Peptide oft beobachtete Eigenschaft, die für die kontrovers diskutierte strukturelle Grundlage der Mimikry bedeutsam sein könnte (siehe Abschnitt 4.2). Auch unpolare Aminosäuren, die hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Rezeptor eingehen können, sind in beiden Peptiden vorhanden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Überlagerung der C $^{\alpha}$ -Atome von *c*-(LSETT1) **6** und *c*-(RTL PFS) **7a**, wie sie in Abbildung 4.9 gezeigt ist. Im Bereich der überlagerten Teilsequenzen SETT/SRTL ist eine auffällige Ähnlichkeit bezüglich der C $^{\alpha}$ -Positionen, mit einem RMSD-Wert von lediglich 36 pm, wie auch der C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ -Bindungsvektoren zu verzeichnen. Besonders gut ist die Übereinstimmung für die Paare Ser/Ser und Thr⁴/Thr. Die Seitenketten von Thr und Ser sind dabei in der Lage, in einer Kohlenhydraten ähnlichen Weise an Wasserstoffbrücken zu partizipieren. Somit erscheint es durchaus möglich, dass hier ein Hinweis auf eine gemeinsame strukturelle Grundlage der Mimikry durch die beiden untersuchten Peptide vorliegt, zumal die beiden Thr-Reste von *c*-(LSETT1) für die Bindung an den Antikörper sehr wichtig sind, wie Bächle in einem Alanin-Scan des Peptids zeigte.^[279] Auch der Glu-Rest von *c*-(LSETT1) ist für die Affinität zum HNK-1-Antikörper zwingend notwendig. Eine Entsprechung zur negativen Ladung des sulfatierten L2/HNK-1-Epitops scheint wahrscheinlich. Zweifel an einem ähnlichen Bindungsmodus der beiden

Peptide begründet die Tatsache, dass sich auch D-Leu für c-(LSETT1) im Alanin-Scan als essentiell für die Bindung an den Antikörper erwiesen hat, während Ser von geringerer Bedeutung ist. Interessanterweise weist c-(RTLPPFS) auch keine negativ geladene Seitenkette auf, sondern stattdessen mit Arg eine basische Aminosäure.

Ohne weitere experimentelle Daten bleiben solche Hypothesen über die Grundlagen der Mimikry durch c-(LSETT1) und c-(RTLPPFS) freilich Spekulation. Mit einer Kombination von Docking- und MD-Berechnungen könnte versucht werden, Hinweise auf die Konformation von L2/HNK-1 und der mimetischen Peptide im Komplex mit einem Bindungspartner wie Laminin zu erhalten. Angesichts der Größe des Konformationsraums des Komplexes sind solche *in silico* Rechnungen ohne eine zusätzliche experimentelle Datenbasis allerdings nicht aussagekräftig. Von daher wäre es insbesondere hilfreich, im Falle weiterer Untersuchungen mittels spezieller Techniken wie Transfer-NOE-NMR-Spektroskopie experimentelle Informationen über die Konformation des Kohlenhydrats und seiner Mimetika im Komplex zu sammeln. Auf diese Weise könnte die Frage geklärt werden, ob die vergleichbare Fähigkeit zur Mimikry durch c-(LSETT1) und c-(RTLPPFS) in der Tat eine strukturelle Ursache hat. Die genaue Kenntnis der relevanten Parameter würde dann ein rationales Design weiterer Liganden anhand der Leitstrukturen möglich machen. Eine erhöhte Genauigkeit der Strukturen der beiden Peptide könnte bei Bedarf durch die Anwendung hochauflösender RDC-Techniken erzielt werden.

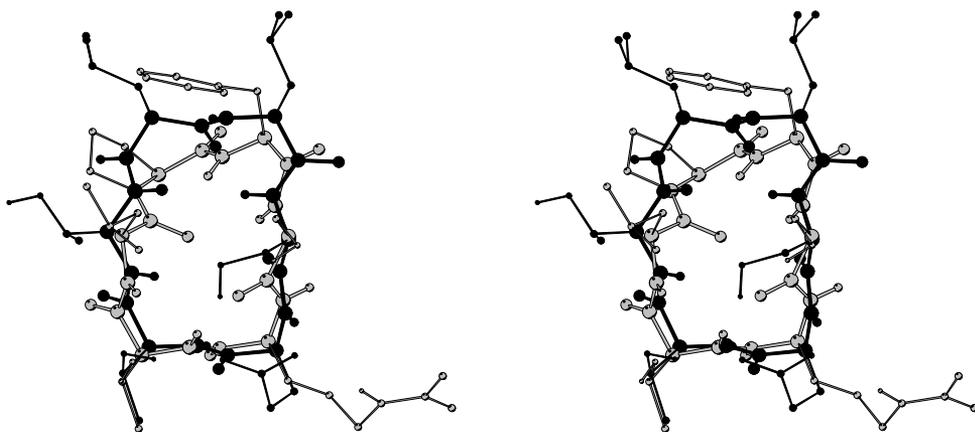


Abbildung 4.9: Überlagerung der Strukturen von c-(LSETT1) **6** (schwarz) und c-(RTLPPFS) **7a** (grau). Für die Superposition wurden die C^α-Koordinaten der Paare Ser/Ser, Glu/Arg, Thr⁴/Thr und Thr⁵/Leu verwendet. Für die Paare Thr⁴/Thr und Ser/Ser ist die Ähnlichkeit auch der Seitenkettenorientierungen besonders auffällig.

4.6 Experimenteller Teil

Die NMR-Spektren wurden auf einem Bruker Avance 600 Spektrometer mit einer ^1H -Resonanzfrequenz von 600.13 MHz und einer ^{13}C -Resonanzfrequenz von 150.90 MHz aufgenommen. Als Probenkopf wurde ein 5 mm TXI 600 MHz mit z -Gradient verwendet. Die Messungen erfolgten bei 300 K, sofern nicht anders angegeben. Die Konzentration der Peptide betrug zwischen 5 und 10 mM in $\text{DMSO-}D_6$. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das $\text{DMSO-}D_6$ -Lösungsmittelsignal bei 2.49 ppm (^1H) und 39.6 ppm (^{13}C) kalibriert. Für die Zuordnung der Signale wurden ein phasensensitives doppelquantengefiltertes COSY^[281], ein TOCSY^[282] mit der DIPSI2-Pulssequenz^[283] zum homonuklearen Hartmann-Hahn-Transfer, ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC- oder ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMQC- und ein $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum aufgezeichnet. Die interessierenden Kopplungskonstanten wurden einem ^1H -Spektrum entnommen. Zusätzlich zu NOESY^[129] mit verschiedenen Mischzeiten wurde ein ROESY aufgenommen, um ggf. chemischen Austausch erkennen zu können. Die Zeit zwischen zwei *scans* betrug 1 s für eindimensionale und 1.75 s für zweidimensionale Experimente. Bei zweidimensionalen Experimenten erfolgte vor der Fourier-Transformation *zero filling* auf 1K in F1, in beiden Dimensionen wurde eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Die Prozessierung der Daten wurde mit XWINNMR vorgenommen. Die Zuordnung der Resonanzfrequenzen und Integration im NOESY erfolgte mit SPARKY.^[284]

Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter von **6** und **7** (in $\text{DMSO-}D_6$) sind in Tabelle 4.14 aufgeführt. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind in den Tabellen 4.15 bis 4.20 zusammengestellt. Zur Bestimmung der Temperaturgradienten wurden ^1H -Spektren bei 295, 300, 305, 310, 315 und 325 K aufgenommen. Die *molecular modeling* Rechnungen erfolgten gemäß der in Abschnitt 3.8 dargelegten Vorgehensweise.

Tabelle 4.14: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(LSETTI) **6** und c-(RTLPPFS) **7**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, OIP [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter	Prozessierung
c-(LSETTI) 6							
¹ H	zg30	64K	32	6.00, 13.98	0.1		32K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfph	8K×512	16	6.00, 13.98	1.0×16.4		2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2etgpsi	2K×256	16	6.00, 13.98	4.1×32.8	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsi	4K×256	16	6.00, 13.98 74.6, 165.7	2.0×48.8	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gplprndqf	4K×512	16	6.00, 13.98 105.0, 222.4	2.0×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sim ²
ROESY	roesyph	2K×256	16	6.00, 13.98	4.1×32.8	$\tau_m = 200$ ms	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesygpqh	8K×512	16	6.00, 13.98	1.0×16.4	$\tau_m = (200 + 50i)$ ms, $i \in [0, 4]$	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
c-(RTLPPFS) 7							
¹ H	zg30	64K	128	5.25, 11.02	0.1		32K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfph	4K×512	32	5.25, 11.02	1.6×12.9		2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2etgp	4K×512	16	5.25, 11.02	1.6×12.9	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsi	4K×512	32	5.25, 11.02 48.0, 100.0	1.6×29.5	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gplprndqf	4K×512	16	5.25, 11.02 105.0, 222.4	1.6×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sim ²
ROESY	roesyph	4K×256	16	5.25, 11.02	1.6×25.8	$\tau_m = 200$ ms	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesygpqh	4K×512	16	5.25, 11.02	1.6×12.9	$\tau_m = (320 + 40i)$ ms, $i \in [0, 3]$	2K×2K, sim ² , + $\frac{\pi}{2}$

Tabelle 4.15: ^1H -NMR-Daten von c-(LSETTI) **6** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere		
Leu	8.50	4.26	$\beta^{2/3}$ 1.64/1.48	γ 1.56 $\delta^{1/2}$ 0.87/0.80	11.0	-6.1
Ser	7.85	4.49	$\beta^{2/3}$ 3.97/3.82	γ 5.41	9.2	-3.9
Glu	8.18	3.90	β^2 1.93; β^3 1.93	γ^2 2.35; γ^3 2.35	4.9	-2.1
Thr ⁴	7.53	4.13	3.98	γ^1 5.04 γ^2 1.01	9.2	-2.1
Thr ⁵	6.96	4.32	3.97	γ^1 4.89 γ^2 0.97	7.0	-0.2
D-Leu	8.52	4.02	$\beta^{2/3}$ 1.52/1.45	γ 1.55 $\delta^{1/2}$ 0.91/0.85	6.7	-6.2

Tabelle 4.16: ^{13}C -NMR-Daten von c-(LSETTI) **6** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				
	C	C^{α}	C^{β}	C^{γ}	C^{δ}
Leu	171.9	51.2	39.6	24.6	$\delta^{1/2}$ 23.8/21.3
Ser	172.3	54.6	62.7		
Glu	170.2	55.4	26.6	30.7	174.2
Thr ⁴	171.9	59.4	66.7	20.7	
Thr ⁵	170.4	58.1	66.9	19.1	
D-Leu	170.7	53.4	39.5	24.6	$\delta^{1/2}$ 22.8/22.6

Tabelle 4.17: ^1H -NMR-Daten von c-(RTLPPFS) **7a** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere		
Arg	7.60	4.28	β^2 1.81 β^3 1.81	$\gamma^{2/3}$ 1.56/1.47 δ^2 3.12; δ^3 3.12 ϵ 7.60 η n. b.	7.7	-1.9
Thr	8.20	4.12	4.25	γ^2 1.00 γ^1 n. b.	9.3	-5.4
Leu	7.10	4.56	$\beta^{2/3}$ 1.44/1.30	γ 1.74 $\delta^{1/2}$ 0.98/0.89	8.5	0.6
Pro		3.91	$\beta^{2/3}$ 1.82/1.62	$\gamma^{2/3}$ 2.01/1.59 $\delta^{2/3}$ 3.65/3.42		
Phe	8.40	3.78	$\beta^{2/3}$ 3.34/3.26	$\delta/\epsilon/\zeta$ n. b.	6.7	-5.2
Ser	7.93	4.40	β^2 3.54 β^3 3.54	γ n. b.	8.3	-0.8

Tabelle 4.18: ^{13}C -NMR-Daten von c-(RTLPPFS) **7a** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm						
	C	C^{α}	C^{β}	C^{γ}	C^{δ}	C^{ϵ}	C^{ζ}
Arg	169.8	55.7	28.4	25.7	40.6		157.1
Thr	172.3	58.7	65.9	γ^2 21.2			
Leu	169.6	49.0	41.0	24.5	$\delta^{1/2}$ 24.1/21.5		
Pro	n. b.	61.7	29.1	25.6	47.3		
Phe	171.8	57.2	34.3	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Ser	170.0	54.7	60.5				

Tabelle 4.19: ^1H -NMR-Daten von c-(RTLPPFS) **7b** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere		
Arg	7.93	4.15	$\beta^{2/3}$ 1.81/1.71	$\gamma^{2/3}$ 1.53/1.43 δ^2 3.08; δ^3 3.08 ϵ 7.55 η n. b.	8.3	-1.8
Thr	7.06	4.22	3.75	γ^2 1.15 γ^1 n. b.	7.9	0.0
Leu	8.60	4.19	$\beta^{2/3}$ 1.53/1.26	γ 1.74 $\delta^{1/2}$ 0.90/0.83	n. b.	-5.1
Pro		4.04	β^2 1.86 β^3 1.86	$\gamma^{2/3}$ 1.48/0.66 δ^2 3.17; δ^3 2.17		
Phe	8.65	4.57	$\beta^{2/3}$ 3.55/3.11	$\delta/\epsilon/\zeta$ n. b.	9.3	-4.2
Ser	8.06	3.97	β^2 3.69 β^3 3.69	γ n. b.	4.0	-4.8

Tabelle 4.20: ^{13}C -NMR-Daten von c-(RTLPPFS) **7b** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm						
	C	C^{α}	C^{β}	C^{γ}	C^{δ}	C^{ϵ}	C^{ζ}
Arg	171.1	54.9	28.4	24.3	40.7		157.1
Thr	172.7	58.5	68.1	γ^2 20.2			
Leu	n. b.	51.7	38.8	n. b.	$\delta^{1/2}$ 24.1/21.2		
Pro		60.8	31.2	21.4	46.9		
Phe	170.5	54.2	37.1	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Ser	171.3	59.2	61.3				

5 Cyclopeptide mit β -Homoaminosäuren als Integrinliganden

Im folgenden Kapitel wird der in Abschnitt 2.2.1 vorgestellte *spatial screening* Ansatz mit Hilfe von β -Homoaminosäuren verfolgt, um affine und selektive Liganden für das Integrin $\alpha_4\beta_1$ zu erhalten. Die Integrine sind eine wichtige Familie von Zelladhäsionsmolekülen mit weitreichenden Aufgaben. Synthetische Integrin-Liganden haben Potential für die Therapie verschiedenster Krankheiten; das Spektrum reicht von Thrombose bis Krebs. Eine ausführlichere Beschreibung der Integrin-Familie und insbesondere des Integrins $\alpha_4\beta_1$ folgt in Abschnitt 5.2.

Im Zuge eines rationalen Peptiddesigns ist es nötig, bestimmte Sekundärstrukturen gezielt herbeiführen zu können. Zu diesem Zweck bedient man sich Strukturbildnern, wobei insbesondere D-Aminosäuren als Induktoren von β II'-Turns Verwendung finden. β -Aminosäuren können als γ -Turn-Mimetika eingesetzt werden, wobei ihr Einfluss nicht so gut untersucht ist wie derjenige der D-Aminosäuren. In Abschnitt 5.1 wird daher zunächst der bisherige Kenntnisstand bezüglich der Sekundärstrukturen von Cyclopeptiden dargestellt, welche β -Aminosäuren enthalten.

Wie in Abschnitt 5.3 näher ausgeführt wird, ist es ein Hauptanliegen dieses Teilprojektes, anhand der mittels NMR aufgeklärten und in 5.4 im Detail beschriebenen Strukturen von sechs Cyclopeptiden das strukturinduzierende Potential von β -Homoaminosäuren genauer zu charakterisieren. Daneben interessieren mögliche Zusammenhänge zwischen den Strukturen der charakterisierten Peptide und ihrer Bindungsfähigkeit an $\alpha_4\beta_1$.

5.1 β -Aminosäuren in cyclischen Peptiden

In Abschnitt 2.1.3 wurde bereits dargelegt, dass β -Peptide definierte Sekundärstrukturen aufweisen können, wobei über die Wahl der Monomere eine konformationelle Steuerung möglich ist. Es stellt sich nun die Frage, in wel-

cher Weise der Einbau einzelner β -Aminosäuren in cyclische Peptide deren Struktur beeinflusst, bzw. inwieweit β -Aminosäuren als Bausteine zum gezielten Design bestimmter Sekundärstrukturen geeignet sind.

In der Natur finden sich einige kleinere Cyclopeptide mit β -Aminosäuren. Leualacin ist ein Cyclopentadepsipeptid aus dem Ascomyceten *Hapsidospora irregularis* mit der Sequenz $\text{cyclo}(-\beta\text{Ala}^{(R)}\text{Hyl}-\text{Leu}^{(S)}\text{Hyl}-\text{Nmp}-)$ (Hyl: Hydroxyleucin, Nmp: *N*-Methylphenylalanin). Es wirkt als Blocker von Calcium-Kanälen des L-Typs.^[285] Bei einer *cis*-Peptidbindung zwischen $^{(S)}\text{Hyl}$ und Nmp liegt ein β/γ -Turnmotiv vor, wobei $^{(S)}\text{Hyl}$ die $i+1$ -Position eines βVI -Turns einnimmt.^[286] βAla befindet sich in der $i+3$ -Position des Turns. Interessanterweise findet sich die D-Aminosäure $^{(R)}\text{Hyl}$ im γ -Turn und nicht in $i+1$ eines $\beta\text{II}'$ -Turns (Abbildung 5.1).

Astin B ist ein Naturstoff aus der Wurzel der *Aster tataricus*, welcher im Tierversuch Antitumorwirkung zeigt.^[287] Er hat die Sequenz $\text{cyclo}(-\text{Pro}(\text{Cl}_2)-\text{allo}\text{Thr}-\text{Ser}-\beta\text{Phe}-\text{Abu}-)$ (Abu: α -Aminobuttersäure, *allo*-Thr: (2*S*,3*R*)-Threonin). Wie beim Leualacin liegt ein βVI -Turn vor, wobei die β -Aminosäure die Position i einnimmt (Abbildung 5.2a).^[288] Im ähnlichen Cyclochlorotin, $\text{cyclo}(-\text{Pro}(\text{Cl}_2)-\text{Abu}-\text{Ser}-\beta\text{Phe}-\text{Ser}-)$ aus *Penicillium islandicum* ist hingegen keine *cis*-Peptidbindung vorhanden, sondern ein βI -Turn mit $\text{Pro}(\text{Cl}_2)$ in $i+1$ und ein gegenüberliegender $\Psi\gamma$ -Turn, der um βPhe ausgebildet wird (Abbildung 5.2b).^[289]

Von Pavone *et al.* wurde eine Reihe von Untersuchungen an zwei βAla -Reste enthaltenden Peptiden durchgeführt. Diese wurden dabei als $-\beta\text{Ala}-\beta\text{Ala}-$ oder als $-\beta\text{Ala}-\text{Xaa}-\beta\text{Ala}-$ Fragment in cyclische Tetra-, Penta- und Hexapeptide

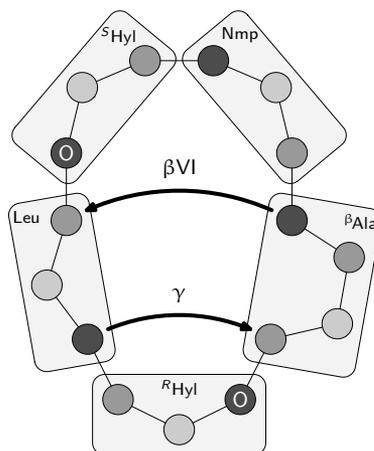


Abbildung 5.1: Schematische Struktur von Leualacin.

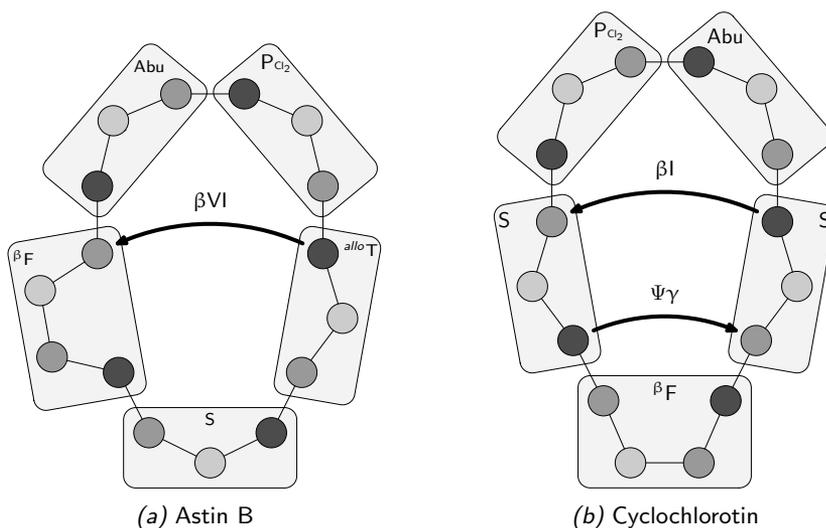


Abbildung 5.2: Schematische Darstellungen von Astin B und Cyclochlorotin.

eingebaut. Das Tetrapeptid cyclo(-Pro-Phe- β Ala- β Ala-) nimmt eine Sekundärstruktur ein, bei der Pro sich in der $i+1$ -Position eines β I-Turns befindet, während die beiden β Ala-Reste durch die den Turn stabilisierende Wasserstoffbrücke einen zehngliedrigen Ring bilden (Abbildung 5.3a).^[290] Im analogen Pentapeptid cyclo(-Pro-Pro-Phe- β Ala- β Ala-) nehmen die beiden Proline die $i+1$ - und die $i+2$ -Positionen eines β VIa-Turns ein; die beiden β Ala-Reste bilden mit Phe einen dreizehngliedrigen Ring (Abbildung 5.3b).^[291]

Das Peptid cyclo(-Pro- β Ala-Pro- β Ala-) bildet, sowohl im Festkörper wie in Lösung, zwei gegenüberliegende γ^i -Turns aus, jeweils mit einem Pro in $i+1$ (Abbildung 5.4).^[292] Hingegen finden sich für cyclo(-Pro- β Ala-Val- β Ala-) in der Kristallstruktur keine intra-, sondern intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen zwei in der Kristallpackung alternierenden Konformeren mit Unterschieden in der Region Val- β Ala. MD-Simulationen im Vakuum zeigen allerdings auch für dieses Peptid das Strukturmuster mit zwei gegenüberliegenden γ^i -Turns, so dass es sich bei den strukturellen Unterschieden um ein auf die Kristallpackung zurückzuführendes Phänomen handeln könnte.^[293]

Im Hexapeptid cyclo(-Pro-Phe- β Ala-Phe-Phe- β Ala-) werden im Festkörper ein $\Psi\beta$ I- und ein β I-Turn ausgebildet, die durch die beiden β Ala-Reste verbunden sind (Abbildung 5.5a); die Peptidbindung zwischen β Ala und Pro hat *cis*-Konfiguration. Bei NMR-Untersuchungen in Lösung wurde eine *cis/trans*-Isoomerisierung der β Ala-Pro-Peptidbindung beobachtet, was auf eine Erhöhung der Flexibilität des Peptids durch den Einbau der β -Aminosäuren schließen lässt.^[294] Auch für das Peptid cyclo(-Pro-Phe- β Ala-Pro-Phe- β Ala-) wird im

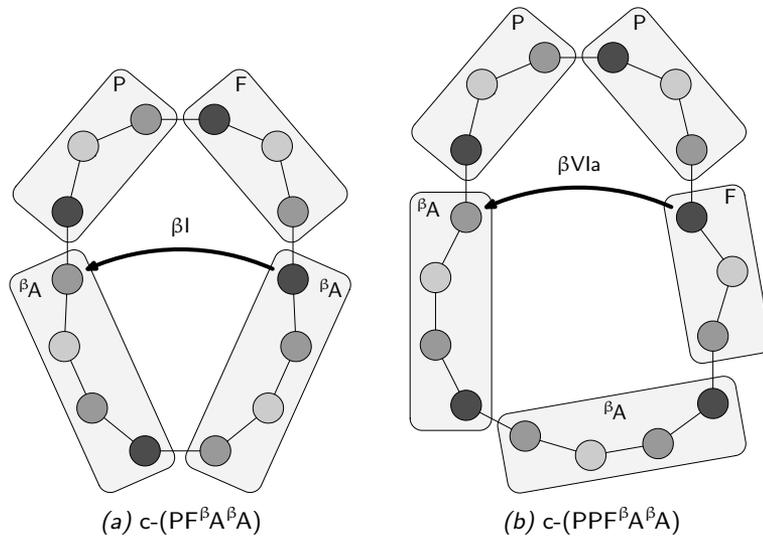


Abbildung 5.3: Schematische Darstellungen von $\text{cyclo-}(-\text{Pro-Phe-}\beta\text{Ala-}\beta\text{Ala-})$ und $\text{cyclo-}(-\text{Pro-Pro-Phe-}\beta\text{Ala-}\beta\text{Ala-})$.

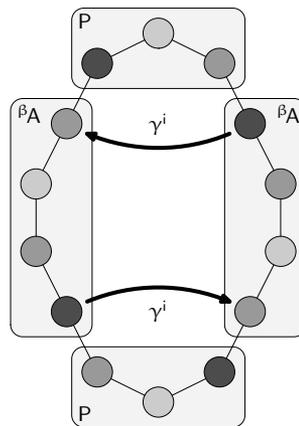


Abbildung 5.4: Schematische Struktur von $\text{cyclo-}(-\text{Pro-}\beta\text{Ala-Pro-}\beta\text{Ala-})$.

Kristall eine entsprechende Anordnung mit zwei β -Turns beobachtet, allerdings mit $\Psi\beta\text{II}$ - und βII - statt βI -Turns (Abbildung 5.5b). Untersuchungen in Lösung und mittels MD zeigen wiederum eine Isomerisierung der βAla -Pro-Peptidbindung und außerdem Variabilität der μ -Winkel.^[295] Die Unterscheidung zwischen $\Psi\beta\text{I}$ - und $\Psi\beta\text{II}$ -Turn beruht auf den Torsionswinkeln der Aminosäuren in $i+1$ bzw. $i+2$. Da es sich um α -Aminosäuren handelt, ist ein direkter Vergleich zu klassischen Turns möglich, im Gegensatz zu Ψ -Turns, bei denen die β -Aminosäure eine zentrale Position einnimmt.

Anhand der untersuchten Strukturen folgerten Pavone *et al.*, dass βAla -Reste in den zentralen Positionen von Turns ($i+1$ von γ - bzw. $i+1$ oder $i+2$ von β -Turns) nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit anzutreffen sind. Dieses Postulat wird durch spätere Untersuchungen der Gruppe am Pentapeptid cyclo-(-Pro-Phe-Phe- βAla - βAla -) eingeschränkt. Im Festkörper zeigt dieses Peptid eine Struktur, bei der die βAla -Reste die $i+2$ und $i+3$ -Positionen eines $\Psi\beta\text{II}$ -Turns einnehmen (Abbildung 5.6a).^[296] In Lösung hingegen findet sich ein βII -Turn mit Pro in $i+1$, der von einem α_{RS} -Turn überlagert wird (Abbildung 5.6b).^[297]

Zusammenfassend folgt aus den vorgestellten Strukturen, dass βAla zwar eine gewisse Tendenz hat, der Beteiligung an Turns in zentraler Position auszuweichen, jedoch nicht in der Lage ist, einen dominierenden Einfluss auf die Sekundärstruktur von Cyclopeptiden auszuüben.

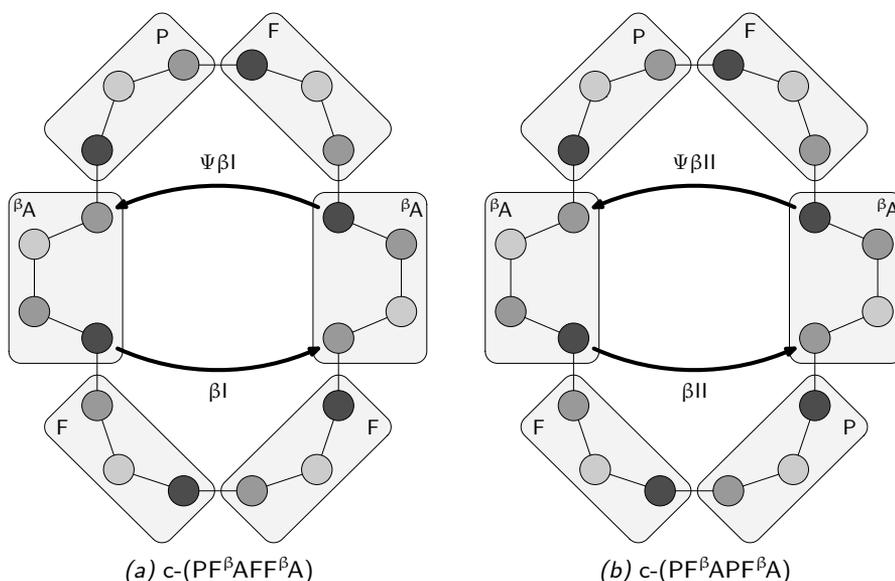


Abbildung 5.5: Schematische Darstellungen von cyclo-(-Pro-Phe- βAla -Phe-Phe- βAla -) und cyclo-(-Pro-Phe- βAla -Pro-Phe- βAla -).

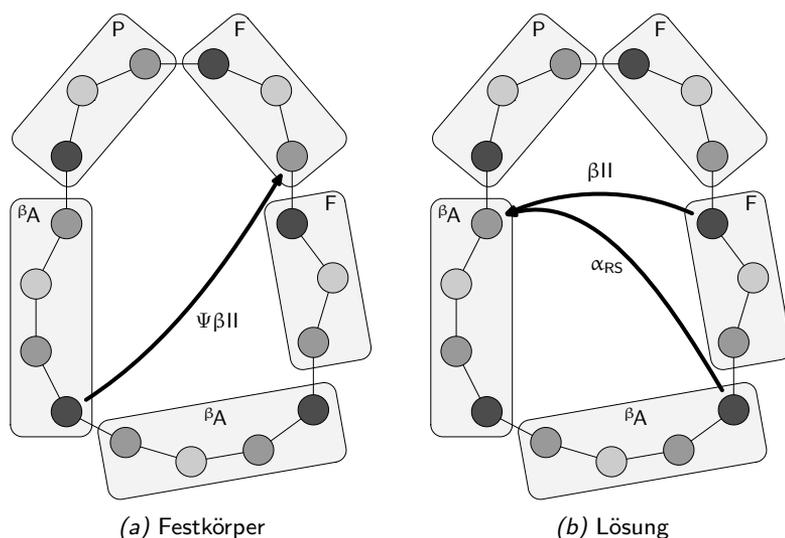


Abbildung 5.6: Schematische Darstellungen der Strukturen von cyclo(-Pro-Phe-Phe- β Ala- β Ala-) im Festkörper und in Lösung.

Schumann *et al.* gingen der Frage nach, welchen Effekt konformationell stärker als β Ala eingeschränkte, substituierte β^3 -Aminosäuren auf die Sekundärstruktur cyclischer Tetra- und Pentapeptide haben. Es zeigte sich, dass die β -Aminosäure eine deutliche Präferenz für die $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma$ -Turns aufweist. Dabei war die β -Aminosäure sogar in der Lage, den strukturinduzierenden Einfluss einer D-Aminosäure zu überkompensieren: Im Peptid cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe- β Leu-) befindet sich D-Phe in der $i+3$ -Position eines β II'-Turns, nicht wie sonst für D-Aminosäuren beobachtet in $i+1$, während β Leu die bevorzugte zentrale Stellung eines $\Psi\gamma$ -Turns einnimmt. β -Aminosäuren sind somit offenbar als Werkzeuge für das rationale Design kleiner Cyclopeptide geeignet. [63,160]

Malešević *et al.* untersuchten mittels FTIR-, CD- und NMR-Spektroskopie Modellpeptide, welche β^h Pro als potentiell strukturinduzierenden Baustein enthalten, insbesondere cyclo(-Ala-Val- β^h Pro-Phe-Gly-). Das Hauptkonformer in DMSO zeigte dabei gegenüberliegend einen $\Psi\gamma$ -Turns um β^h Pro und einen β II'-Turn mit Gly in $i+1$ (Abbildung 5.7a). Eine Nebenkonformation wird durch eine Mischung $\Psi\gamma$ - und $\Psi\beta$ -Turn charakterisiert, jeweils mit β^h Pro in $i+1$ -Position, welcher durch eine gegabelte Wasserstoffbrücke stabilisiert wird (Abbildung 5.7b). Die in TFE beobachtete Struktur des Peptids entspricht derjenigen der Nebenkonformation in DMSO. [298,299]

Abschließend bleiben die Untersuchungen von Strijowski und Sewald zu erwähnen, welche sich mit dem Effekt des Einbaus einzelner *cis*- und *trans*-2-

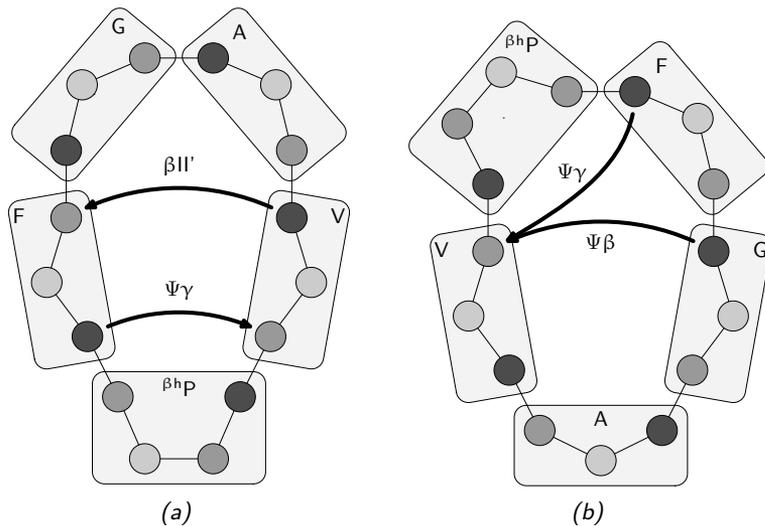


Abbildung 5.7: Schematische Darstellungen der Konformere von cyclo(-Ala-Val- β^h Pro-Phe-Gly-).

ACHC-Reste (Aminocyclohexancarbonsäure) in verschiedene Penta- und Hexapeptide beschäftigen. Dabei zeigte sich im Gegensatz zu den von Schumann *et al.* untersuchten acyclischen β^3 -Aminosäuren keine klare Präferenz zur Induktion von $\Psi\gamma$ -Turns. Vielmehr partizipiert ACHC in den untersuchten Strukturen an der Bildung von $\Psi\beta$ -Turns und findet sich dabei hauptsächlich in Position i , seltener in $i+1$ -Position. [161,300]

5.2 Integrine

5.2.1 Struktur und Funktion

Für mehrzellige Organismen ist das Zusammenspiel von Zellen untereinander und mit ihrer Umgebung von existenzieller Bedeutung. Die wichtigsten Gruppen von CAM (*cell adhesion molecules*), die in höheren Tieren Aufgaben im Bereich der Zell-Matrix- und der Zell-Zell-Adhäsion wahrnehmen, sind die Cadherine, die CAM der Ig-Superfamilie, die Selectine und, als vielleicht wichtigste und bestuntersuchte Vertreter, die Integrine. [301] Seit der Entdeckung ihrer Bedeutung vor etwa 20 Jahren sind sie Gegenstand intensiver Forschung mit durchschnittlich über 1000 Publikationen pro Jahr. [302,303] Der Name „Integrine“ betont die Bedeutung für die Integration von Zellen mit ihrer Umgebung durch die Vermittlung von Signalen, und zwar sowohl von außen ins Zellinnere („*outside-in*“) als auch von innen an die Zelloberfläche („*inside-out*“). Die Aufgaben der Integrine sind mannigfaltig: Integrin-vermittelte In-

teraktionen spielen bei vielen wichtigen Vorgängen wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle. Dementsprechend ist es leicht einsichtig, dass Fehlfunktionen von Integrinen schwerwiegende Konsequenzen für den Organismus haben können. Krebs, Tumormetastasierung, Fehlfunktionen des Immunsystems, virale Infektionen, Entzündungsprozesse, Thrombosen und Osteoporose sind nur einige Beispiele.^[303–306]

Es handelt sich bei Integrinen um große, heterodimere Transmembranproteine, die sich aus einer α -Untereinheit (Molekulargewicht 120–180 kDa) und einer β -Untereinheit (90–110 kDa) zusammensetzen. Dabei gibt es verschiedene α - und β -Untereinheiten, die in unterschiedlichen Kombinationen nichtkovalent dimerisieren. Derzeit sind 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Untereinheiten bekannt, welche sich zu 24 Integrin-Dimeren verbinden können (Abbildung 5.8).^[303] Sowohl die α - also auch die β -Domäne bestehen aus einem großen extrazellulären Segment, das über eine Transmembranhelix mit einer kleinen zytoplasmatischen Domäne verbunden ist. Eine Sonderstellung nimmt die β_4 -Untereinheit ein, die auf die Interaktion mit dem Zytoskelett spezialisiert ist und eine größere zytoplasmatische Domäne besitzt.^[307] Für die Weiterleitung der Signale ins Zellinnere scheint in erster Linie der zytoplasmatische Teil der β -Domänen verantwortlich zu sein.^[308]

Die Kontakte zwischen den Untereinheiten konzentrieren sich auf ihre zu einer globulären Kopfstruktur gefalteten N-terminalen Bereiche, in der sich auch

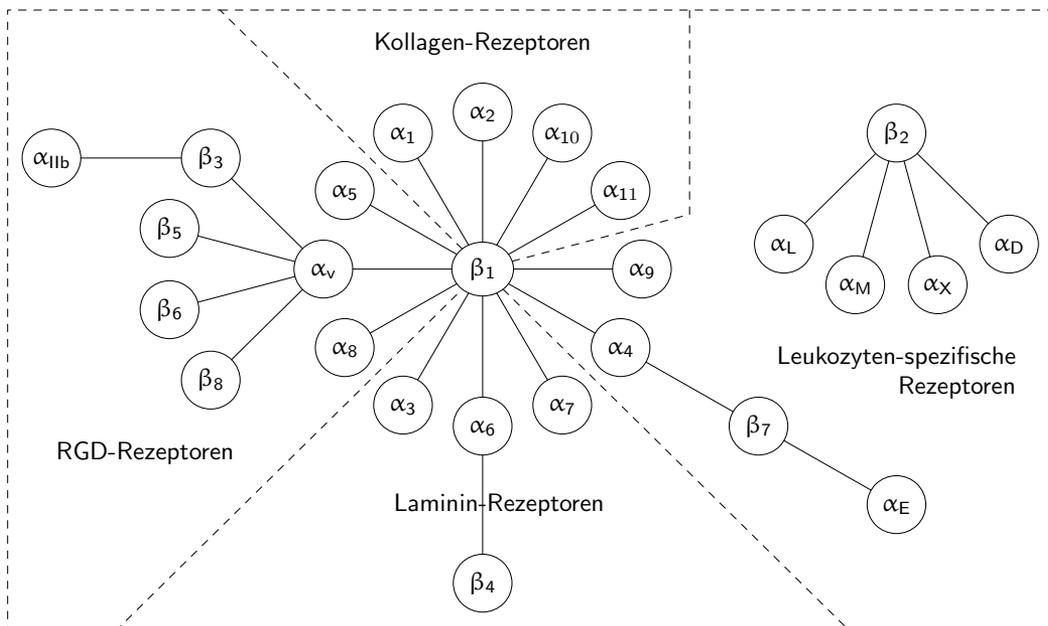


Abbildung 5.8: Die Integrin-Familie.^[303]

die Ligandenbindungsstelle befindet (Abbildung 5.9a). Die α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller am N-Terminus^[310] sowie drei β -Sandwich-Domänen (*thigh*, *calf-1*, *calf-2*).^[309,311] Bei etwa der Hälfte der bekannten Integrine findet sich zusätzlich eine im β -Propeller inserierte I-Domäne, die bei diesen Integrinen die Ligandenbindungsstelle darstellt, wobei Koordination an einer Bindungsstelle für zweiwertige Kationen entscheidend ist, der sogenannten MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*).^[312,313] Die β -Untereinheit beginnt am N-Terminus mit einer cysteinreichen, aufgrund von Sequenzhomologien als PSI-Domäne bezeichneten Region (*plexins*, *semaphorins* and *integrins*).^[314] Die folgende β A- oder wegen Homologie zur I-Domäne auch I-artige Domäne bildet die Hauptkontaktstelle zum β -Propeller der α -Untereinheit. In Integrinen ohne I-Domäne ist hauptsächlich diese Domäne für die Ligandenbindung verantwortlich, im Falle des Vorhandenseins einer I-Domäne hat sie eine indirekt regulierende Funktion.^[315] Sequenzbereiche vor und hinter der β A-Domäne formen gemeinsam eine β -Sandwich-Struktur, die deshalb als Hybrid-Domäne bezeichnet wird. Es folgen vier

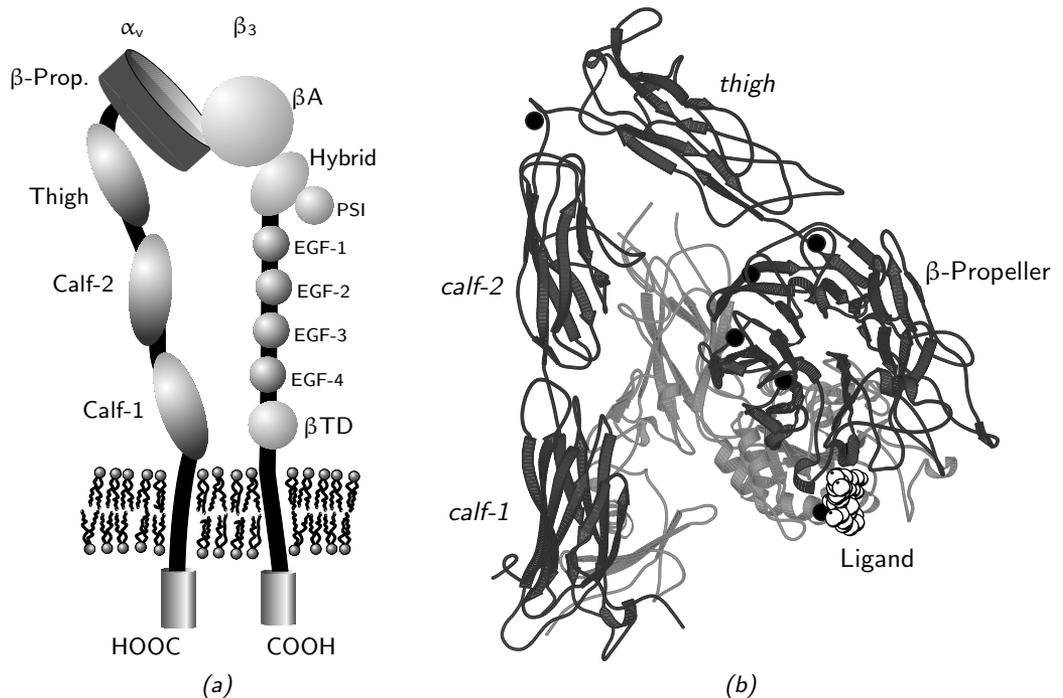


Abbildung 5.9: (a) Schematische Darstellung und (b) Cartoon der Röntgenstruktur^[309] des Integrins $\alpha_v\beta_3$. Die α -Untereinheit ist dunkelgrau, die β -Untereinheit hellgrau dargestellt. Die postulierte Gelenkregion befindet sich zwischen den *thigh*- und *calf*-Domänen. Das gebundene Pentapeptid ist als weißes Kalottenmodell zwischen β -Propeller und β A-Domäne zu erkennen; schwarze Kugeln kennzeichnen die in der Röntgenstruktur erkennbaren Metallionen. Teile der Gelenkregion sind in der Röntgenstruktur nicht aufgelöst, was als Indiz für Flexibilität interpretiert werden kann.

cysteinreiche, EGF-artige Domänen sowie eine den extrazellulären Teil abschließende, β TD genannte Domäne.

Die dargestellten Informationen über den strukturellen Aufbau der Integrine sind durch eine Kombination aus experimentellen Untersuchungen an kleineren Fragmenten mit NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse sowie durch Strukturvorhersagen anhand von Homologien zusammengetragen worden.^[315] Bestätigt und ergänzt wurden sie durch die Aufklärung der Kristallstruktur des extrazellulären Teils des Integrins $\alpha_v\beta_3$ mit einer Auflösung von 0.31 nm durch Xiong *et al.* im Jahre 2001.^[309] Die Strukturbestimmung erfolgte zum einen für das Integrin ohne einen Liganden, zum anderen im Komplex mit dem zyklischen Pentapeptidliganden cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-^{N-Me}Val-)^[316] und hat entscheidende Beiträge zu einem besseren Verständnis der Struktur und Funktion der Integrine geliefert. Neben der in den Kristallstrukturen nicht besetzten MIDAS wurde eine nahegelegene weitere Metallkoordinationsstelle in der β A-Domäne gefunden, die ADMIDAS genannt wurde, sowie vier weitere Bindungsstellen für divalente Kationen in anderen Bereichen des Integrins. Schon zuvor war bekannt, dass die Aktivierung von Integrinen durch zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} und Mn^{2+} beeinflusst wird und mit weitreichenden Konformationsänderungen einhergeht. Vor diesem Hintergrund ist das vielleicht interessanteste Ergebnis der Kristallstrukturen, dass $\alpha_v\beta_3$ nicht die erwartete gestreckte, sondern in beiden Fällen eine geknickte Konformation einnimmt. Die Kopfgruppe ist durch Drehung in einer Gelenkregion neben der *thigh*-Domäne in Richtung der Zellmembran orientiert (Abbildung 5.9b). Auf die Bedeutung und mögliche Mechanismen für die Integrin-Aktivierung soll im folgenden Abschnitt eingegangen werden.

5.2.2 Signalübertragung und Aktivierung

Jede der Kombinationen verschiedener α - und β -Untereinheiten hat spezifische Aufgaben und dementsprechend auch andere intra- wie extrazelluläre Interaktionspartner, wobei es Überschneidungen der Ligandenspezifitäten gibt (Abbildung 5.8). Die zytoplasmatischen Domänen von Integrinen besitzen keine eigene enzymatische Aktivität, im Gegensatz etwa zu Rezeptor-Tyrosinkinase, sondern greifen durch Interaktion mit anderen Signalübertragungsmolekülen in Prozesse wie die Regulation des Zellzyklus oder die Organisation des Zytoskeletts ein. Dabei existieren Wechselwirkungen zwischen Integrinvermittelten *outside-in* Signalen und nahezu allen wichtigen Signaltransduktionswegen eukaryotischer Zellen, wie z. B. der Aktivierung der MAPK- und anderer Kinase-Kaskaden oder dem Phosphatidylinositol-Weg.^[317,318]

Verglichen mit Hormonrezeptoren, die typischerweise mit Dissoziationskon-

stanten zwischen 10^{-9} und 10^{-11} M eine hohe Affinität aufweisen, binden Integrine mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-8} M eher schwach an ihre Liganden. Allerdings sind Integrine in weit höherer Zahl auf der Zelloberfläche präsent, so dass über die Vielzahl der Kontakte eine feste Adhäsion möglich ist, während die einzelnen Bindungen leicht genug dissoziieren, um z. B. die Migration von Zellen zu gestatten.^[301]

Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren ist die Aktivität der Integrine nicht konstitutiv, sondern wird von der Zelle den Erfordernissen entsprechend durch *inside-out* Signalübertragung reguliert. Der Übergang zwischen den Aktivierungszuständen kann dabei in weniger als einer Sekunde erfolgen.^[315] Auf diese Weise ist es z. B. einer gesunden Zelle möglich, für den Organismus schädliche Adhäsion zu vermeiden, während etwa bei der Tumorzelladhäsion die normalen Regulationsmechanismen außer Kraft gesetzt sind.^[319]

Die Signalübertragung aus dem Zellinneren nach außen erfolgt, indem Interaktionen des Integrins auf der zytosolischen Seite konformationelle Änderungen im extrazellulären Teil induzieren. Auf diese Weise kann das Integrin von einem inaktiven in einen affinen Zustand übergehen. Als Mechanismus werden hauptsächlich zwei Modelle diskutiert, die beide Scherbewegungen der Untereinheiten postulieren, jedoch von unterschiedlichen Positionen des Gelenks ausgehen.^[320,321] Eines der Modelle postuliert einen Drehpunkt in der Membranregion, während das andere ein Aufklappen des Integrins mittels einer Gelenkregion näher am N-Terminus vorschlägt.

Die Röntgenstruktur von $\alpha_v\beta_3$ lässt eine Regulation der Aktivität über eine Gelenkregion nahe der *thigh*-Domäne plausibel erscheinen. Zugleich liegen auch zahlreiche Daten vor, die für einen Schwerpunkt der Scherbewegungen in Membrannähe sprechen.^[322] Höchstwahrscheinlich sind beide Modelle teilweise zutreffend, und es erfolgt sowohl Rotation in der Knieregion als auch Verdrehung der Untereinheiten gegeneinander. Gesichert ist auch, dass das Integrin im Aktivierungsprozess nicht nur zwei, sondern mindestens drei Zustände durchlaufen kann.^[323–326] Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ebenfalls drei Zustände, die durch eine Kombination der beiden Modelle erklärbar wären.^[327] Auch eine kontinuierliche Adaption der Aktivität durch graduelle Konformationsänderungen wird diskutiert.^[328]

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass der genaue Mechanismus der *inside-out* Signalübertragung noch nicht klar ist, wobei insbesondere weitere hochaufgelöste Strukturen von Integrinen und Integrin-Ligand-Komplexen in verschiedenen Aktivierungszuständen zu einem besseren Verständnis beitragen könnten.^[329]

5.2.3 Erkennungssequenzen

Bei der Untersuchung zahlreicher ECM-Proteine, die mit Integrinen interagieren, konnte in vielen Fällen eine kurze Erkennungssequenz identifiziert werden, die die Hauptrolle bei der Bindung des Integrins an seinen Liganden spielt. Die bekannteste ist die Tripeptidsequenz RGD, die für eine ganze Reihe von Integrinen notwendig und hinreichend für die Ligandenerkennung ist (siehe Abbildung 5.8). Sie findet sich unter anderem in Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Tenascin, Osteopontin und Thrombospondin.^[330] Auch einige Viren machen sich diese universelle Sequenz zunutze, um die initiale Anheftung an die Zelloberfläche und die Vermittlung der Aufnahme zu erreichen. Beispiele sind das Penton-Protein humaner Adenoviren,^[331] das Hüllprotein des Maul-und-Klauenseuche-Virus^[332] und ein Oberflächenprotein von *Bordetella pertussis*^[333]. Für das Tat-Protein von HIV wird eine funktionelle Rolle der enthaltenen RGD-Sequenz kontrovers diskutiert.^[334,335]

Das Vorhandensein der RGD-Sequenz in Proteinen ist, im Unterschied zu kleinen Peptiden, noch kein hinreichendes Kriterium für einen Integrin-Liganden, da die Sequenz nicht unbedingt an der Oberfläche des Proteins exponiert sein muss. Auch besitzen RGD-abhängige Integrine durchaus Selektivität für unterschiedliche Liganden. Hierbei sind Vermittlung durch zusätzliche Kontaktstellen sowie konformationelle Unterschiede im Kontext der RGD-Sequenz denkbare Mechanismen.^[306,336]

Der Einbau der RGD-Sequenz in kleine Peptide und Cyclopeptide ermöglicht die Synthese hochaffiner und selektiver Liganden. Diese kommen als Inhibitoren zur Verhinderung pathologischer Integrin-Interaktionen oder, an Oberflächen gebunden, zur Verbesserung der Adhäsion etwa bei Gewebetransplantaten in Frage. Die Pionierarbeiten beim Design kleiner peptidischer RGD-Liganden wurden vor allem von Kessler *et al.* mit Hilfe des bereits diskutierten *spatial screening* Konzepts geleistet.^[60] Mit c-(RGDFV) konnte ein $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 2 nM identifiziert werden.^[62,306,337] Versuche mit *N*-methylierten Derivaten führten zu c-(RGDF^{NMeV}), dessen IC_{50} -Wert mit 0.58 nM noch deutlich kleiner ist.^[338] Unter dem Markennamen Cilengitide wird c-(RGDF^{NMeV}) von der Firma Merck derzeit in einer Reihe klinischer Phase-II-Studien mit dem Ziel der Tumorthherapie durch Unterbindung der tumorinduzierten Angiogenese getestet. Zur Therapie von Patienten mit einer bestimmten Form von Glioblastomen, für die es keine alternativen Behandlungsmethoden gibt, ist es als sogenannte „*orphan drug*“ durch die *European Medicines Agency* bereits 2004 zugelassen worden.

Neben der RGD-Sequenz sind noch eine Reihe weiterer Erkennungssequenzen identifiziert worden; einige seien beispielhaft erwähnt. Für die Bindung von

$\alpha_2\beta_1$ an Kollagene und Laminin spielen die Sequenzen YGDLR und FYFDLR eine Rolle. Die Interaktion von $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit seinen Liganden wird meist durch RGD, in einigen Fällen auch durch KQAGDV bestimmt. Die Bindung des Integrins $\alpha_4\beta_1$ an Fibronectin wird durch die Tripeptidsequenz LDV vermittelt. In VCAM-1, einem anderen Liganden von $\alpha_4\beta_1$, hat die postulierte Bindungsstelle die Sequenz TQIDSPLN.^[330] Auf Basis dieser Sequenz wird mit den in dieser Arbeit untersuchten, β -Homoaminosäuren enthaltenden Peptiden versucht, affine und selektive Liganden für $\alpha_4\beta_1$ zu erhalten.

5.2.4 $\alpha_4\beta_1$ und VCAM-1

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) ist ein Zelloberflächenprotein, das auf vaskulären Endothelzellen exprimiert wird. Ebenso wie ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (*intercellular adhesion molecules*) und MAdCAM-1 (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*) gehört es zu einer Integrin-bindenden Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie.^[339] Das Integrin $\alpha_4\beta_1$, auch als VLA-4 (*very late antigen-4*) bekannt, findet sich auf den Oberflächen von Lymphozyten, Monozyten, Mastzellen, Makrophagen sowie basophilen und eosinophilen, nicht jedoch neutrophilen Leukozyten.^[340] Neben Fibronectin, das außer der bereits erwähnten LDV-Sequenz noch eine weitere putative Bindungsstelle mit der Sequenz IDASP aufweist,^[341,342] bindet auch VCAM-1 an $\alpha_4\beta_1$, und zwar an einer anderen Bindungsstelle und mit einer anderen Bindungssequenz als Fibronectin.^[343] Die Interaktion zwischen $\alpha_4\beta_1$ und VCAM-1 ist entscheidend für die Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothel und die anschließende Einwanderung ins Gewebe im Zuge von Entzündungsprozessen.^[344–346] Auch bei der Adhäsion hämatopoietischer Stammzellen im Stroma des Knochenmarks spielt diese Interaktion eine Schlüsselrolle.^[347] Die Wechselwirkung zwischen VCAM-1 und $\alpha_4\beta_1$ ist daher ein vielversprechender Ansatzpunkt für mögliche Therapien von Erkrankungen wie Asthma, Arthritis und chronischen Entzündungen der inneren Organe.^[346] Einige peptidomimetische Substanzen befinden sich bereits in der vorklinischen oder zu Beginn der klinischen Erprobung.^[348,349]

Der extrazelluläre Teil von VCAM-1 besteht aus sieben immunglobulinartigen Domänen. Zwei Röntgenstrukturen^[350,351] des Integrin-bindenden N-terminalen Teils zeigen eine Schleifenstruktur auf der Proteinoberfläche, die die vermutete Bindungssequenz TQIDSPLN enthält. Die Aminosäuren TQID bilden dabei einen β I-Turn, während die Sequenz SPLN S-förmig angeordnet ist (Abbildung 5.10). Diese Schleifenstruktur stellt ein naheliegendes Ziel für die Synthese kleinerer Peptide mit Hilfe des *spatial screening* dar.

Lineare Peptide mit der TQIDSPLN-Sequenz zeigen keine signifikante inhi-

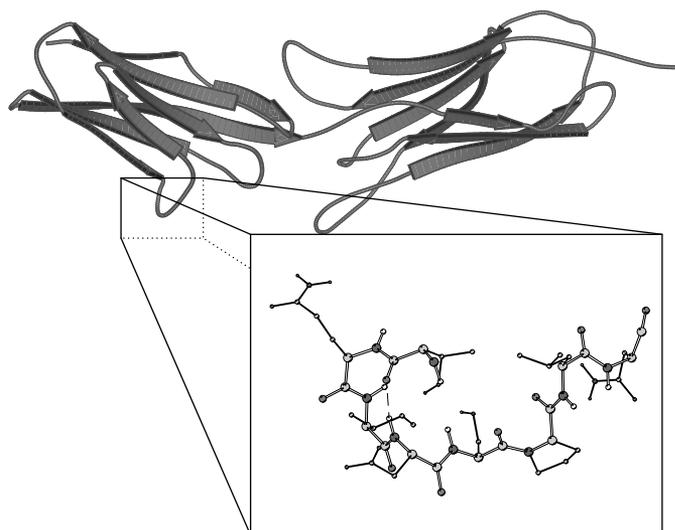


Abbildung 5.10: Struktur der N-terminalen Domäne von VCAM-1 und der Integrin-Erkennungssequenz TQIDSPLN.^[350]

bitorische Aktivität.^[352] Mit Hilfe von Oktapeptiden, die die Sequenz TQIDSP enthalten, konnte die Konformation der Schleife im VCAM-1 angenähert werden. Ein Alanin-Scan der Oktapeptide lässt darauf schließen, dass vor allem Asp, Pro und Gln für die Bindung nötig sind.^[353] Dies deckt sich mit biochemischen Mutageneseexperimenten, die zuvor bereits Asp und Pro als besonders wichtig identifiziert hatten.^[354] Die inhibitorische Wirkung der aktivsten Oktapeptide auf die Bindung zwischen VCAM-1 und $\alpha_4\beta_1$ ist mit IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich noch nicht zufriedenstellend. Die erhebliche konformationelle Flexibilität der Oktapeptide ist der biologischen Aktivität abträglich.

Zur Reduktion der konformationellen Freiheit und damit einhergehend zur Steigerung der Affinität bietet sich die Verkleinerung der Ringgröße an. In seiner Dissertation untersuchte Strijowski cyclische Penta- und Hexapeptide, die auf den Teilsequenzen (T)QIDSP und (I)DSPLN basierten. Anstelle des Pro-lins wurden *cis*- und *trans*-ACPC und -ACHC verwendet, um zugleich deren strukturinduzierendes Potential zu erforschen (vgl. Abschnitt 5.1). Allerdings zeigte keines der in Zelladhäsionstests geprüften Peptide eine signifikante inhibitorische Wirkung auf die $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1-Interaktion. Als mögliche Erklärung führt Strijowski eine nur schlechte Übereinstimmung der VCAM-1-Struktur mit den NMR-spektroskopisch aufgeklärten Peptidstrukturen an. Weiter gibt er zu bedenken, dass ACPC und ACHC keine ausreichend ähnlichen Mimetika des für die Bindung wichtigen Pro sein könnten.^[161]

5.3 Zielsetzung

Malešević synthetisierte eine Reihe von Penta- und Hexapeptiden, die auf Subsequenzen der im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten TQIDSPLN-Sequenz basieren. Als Sekundärstrukturbildner setzte er β -Homoaminosäuren ein – also β^3 -Aminosäuren mit proteinogenen Seitenketten –, mit dem Ziel, die für die Bindung zwischen Integrin $\alpha_4\beta_1$ und VCAM-1 nötige Konformation zu fixieren.^[299]

Eine Auswahl der von Malešević dargestellten Peptide soll im Rahmen dieser Arbeit NMR-spektroskopisch auf ihre Konformation in Lösung untersucht werden: c-(SPLND) **8**, c-(SPL β^h ND) **9**, c-(SPLNVD) **10**, c-(S β^h PLNID) **11** und c-(β^h SPL β^h NID) **12**.

Durch parallel erfolgende Zelladhäsionstests (durchgeführt von S. Urman im Rahmen ihres Dissertationsvorhabens an der Universität Bielefeld) wird die Fähigkeit der Peptide zur Inhibition der Bindung zwischen $\alpha_4\beta_1$ und VCAM-1 überprüft. Eine Korrelation dieser Daten mit den NMR-Strukturen soll nach Möglichkeit für die Ableitung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen genutzt werden.

Ein wesentliches Ziel der Strukturuntersuchungen ist es, das Verständnis des strukturinduzierenden Potentials von β -Aminosäuren in Cyclopeptiden zu festigen und zu erweitern. Wie eingangs des Kapitels erwähnt, beschränkten sich die meisten bisherigen Studien hierzu auf β Ala. Cyclopeptide mit substituierten β^3 -Aminosäuren sind bisher nur durch Schumann systematisch untersucht worden, wobei sich eine Präferenz der β -Aminosäure für die $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma$ -Turns zeigte.^[63] Ferner fanden Malešević *et al.* im Modellpeptid c-(AV β^h PFG) das β^h Pro in der $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma$ -Turns.^[298] Es wird interessant sein zu sehen, ob sich die Strukturen der hier untersuchten Prolin-haltigen Peptide **8** bis **12** mit β -Homoaminosäuren in dieses Bild einfügen. Ergänzend zu den Strukturen der potentiellen $\alpha_4\beta_1$ -Liganden soll auch das Modellpeptid c-(V β^h AFLI) **13** strukturell charakterisiert werden, das neben der β -Aminosäure keinen weiteren strukturinduzierenden Baustein enthält.

5.4 Ergebnisse der Konformationsanalyse

5.4.1 cyclo-(-Ser-Pro-Leu-Asn-Asp-) **8**

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von c-(SPLND) in DMSO- D_6 sind in den Tabellen 5.33 und 5.34 in Abschnitt 5.6 zusammengefasst. Die Differenz der chemischen Verschiebungen von Pro C^β und C^γ beträgt 5.1 ppm. Zusammen mit starken NOE zwischen Ser H^α und den δ -Protonen des Pro sowie dem Feh-

len von NOE zwischen Pro H^α und Ser spricht dies eindeutig für eine *trans*-Konfiguration der Ser-Pro-Peptidbindung. Sehr schwach ist in den NMR-Spektren ein zweiter Signalsatz erkennbar, dessen Intensität jedoch nicht für eine Auswertung ausreicht.

Eine Zuordnung von diastereotopen Protonen gelingt für die β -Protonen des Asn (Tabelle 5.1). Diese wird zusätzlich mittels einer DG mit komplementärer Zuordnung verifiziert. Für Asp lassen die $^3J_{H^\alpha H^\beta}$ -Kopplungskonstanten zwar eine Bevorzugung eines Rotamers vermuten, die beobachteten NOE-Distanzen sprechen jedoch eher für ein Rotamerengleichgewicht. Daher wird mit einem Pseudoatom für die β -Protonen des Asp gerechnet. Die chemischen Verschiebungen der β -Protonen von Ser und Leu liegen zu dicht beieinander, um eine separate Integration im NOESY zu ermöglichen, so dass auch hier mit Pseudoatomen gerechnet wird.

Insgesamt können aus dem NOESY-Spektrum 22 Proton-Proton-Distanzen entnommen werden, darunter 13 intraresiduale, 8 sequentielle und 1 weiterreichende (Tabelle 5.2), die in die Distanzgeometrie einfließen. Auf den dominanten Cluster der generierten Koordinaten entfallen 84% der akzeptierten Strukturen. Mit 15% spielt ein zweiter Cluster eine untergeordnete Rolle, der sich lediglich durch eine Umorientierung der Peptidbindung zwischen Asn und Asp von der Hauptfamilie unterscheidet.

Beide Strukturen erweisen sich während der RMD als stabil, wobei die Orientierung der Asn-Asp-Peptidbindung der Startstruktur erhalten bleibt. Das Hauptkonformer zeigt während der Simulation sporadisch eine Umorientierung der Peptidbindung zwischen Asp und Ser, die jedoch stets rasch wieder

Tabelle 5.1: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **8**.

		Asn		Asp	
		$H^{\beta h}$	$H^{\beta l}$	$H^{\beta h}$	$H^{\beta l}$
$^3J/\text{Hz}$	$H^\alpha H^x$	7.9	4.4	4.3	9.4
d/nm	$H^\alpha H^x$	230	211	275	302
	$H^N H^x$	204	208	275	288
Zuordnung		$H^{\beta h} = H^{\beta 2}$ pro-(<i>S</i>) $H^{\beta l} = H^{\beta 3}$ pro-(<i>R</i>)		Pseudoatom	
Konformation	$\chi_1 = 60^\circ$	48%			
	180°	40%			
	-60°	12%			

Tabelle 5.2: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(SPLND) **8**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Ser H $^{\alpha}$	Leu H $^{\text{N}}$	319	351	390	Pro Q $^{\gamma}$	Pro Q $^{\delta}$	173	419	226
Ser H $^{\alpha}$	Pro Q $^{\delta}$	183	316	269	Leu H $^{\text{N}}$	Leu H $^{\alpha}$	231	254	280
Pro H $^{\alpha}$	Leu H $^{\text{N}}$	293	322	323	Leu H $^{\alpha}$	Leu Q $^{\delta}$	323	699	315
Pro Q $^{\beta}$	Leu H $^{\text{N}}$	273	427	368	Asn H $^{\text{N}}$	Asn H $^{\beta 2}$	275	302	250
Pro Q $^{\gamma}$	Leu H $^{\text{N}}$	271	424	426	Asn H $^{\text{N}}$	Asn H $^{\beta 3}$	302	332	281
Pro Q $^{\delta}$	Leu H $^{\text{N}}$	263	414	377	Asn H $^{\alpha}$	Asn H $^{\beta 2}$	226	249	255
Asn H $^{\alpha}$	Asp H $^{\text{N}}$	257	283	283	Asn H $^{\alpha}$	Asn H $^{\beta 3}$	211	232	242
Asn H $^{\beta 3}$	Asp H $^{\text{N}}$	339	373	216	Asn H $^{\beta 2}$	Asn Q $^{\delta}$	260	606	339
Asp H $^{\alpha}$	Ser H $^{\text{N}}$	217	239	244	Asn H $^{\beta 3}$	Asn Q $^{\delta}$	331	711	352
Ser H $^{\text{N}}$	Ser H $^{\alpha}$	260	286	274	Asp H $^{\text{N}}$	Asp Q $^{\beta}$	249	398	289
Ser H $^{\text{N}}$	Ser Q $^{\beta}$	237	383	332	Asp H $^{\alpha}$	Asp Q $^{\beta}$	208	347	242

in die Ausgangskonformation zurückkehrt. Der größte Cluster der Gesamttrajektorie umfasst etwa drei Viertel (74%) aller Strukturen. Mit 14% bzw. 8% sind die Strukturen mit abweichender Orientierung der Peptidbindung zwischen Asn und Asp bzw. zwischen Asp und Ser nur von geringer Bedeutung.

In Abbildung 5.11 ist eine schematische Darstellung der Hauptstruktur sowie die Struktur des meistpopulierten Clusters dargestellt. Eine Stereodarstellung der gemittelten Struktur der drei Cluster zeigt Abbildung 5.12, in Abbildung 5.13 ist zusätzlich eine Überlagerung der drei beobachteten Strukturfamilien zu finden. Die folgende Diskussion konzentriert sich auf die dominante Konformation als Strukturmodell für c-(SPLND).

Die Rückgrattorsionswinkel sowie die beobachteten Wasserstoffbrücken sind in den Tabellen 5.3 und 5.4 zusammengestellt. Das Hauptstrukturmerkmal ist ein γ^i -Turn um Asp, der zu 65% durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Ser H $^{\text{N}}$ und Asn O stabilisiert wird. Das gegenüberliegende Turnmotiv mit Pro in $i+1$ -Position ist βI -artig, wobei der ψ -Winkel des in $i+2$ befindlichen Leu vom Referenztorsionswinkel abweicht, so dass keine Wasserstoffbrücken-Stabilisierung erfolgt. Interessant ist die Ausbildung einer gegabelten Wasserstoffbrücke unter Beteiligung der Serin-Seitenkette und Leu H $^{\text{N}}$ (65%) sowie Asn H $^{\text{N}}$ (28%). Die Umorientierung der Peptidbindungen zwischen Asn und Asp bzw. zwischen Asp und Ser in den Nebenkongformationen führt dort zur Ausbildung eines alternativen Wasserstoffbrückenmusters, bei dem die Amidprotonen von Asn und Asp sowie die Seitenketten von Ser, Asn und Asp miteinander interagieren. Der γ^i -Turn ist von der Orientierung der teilweise

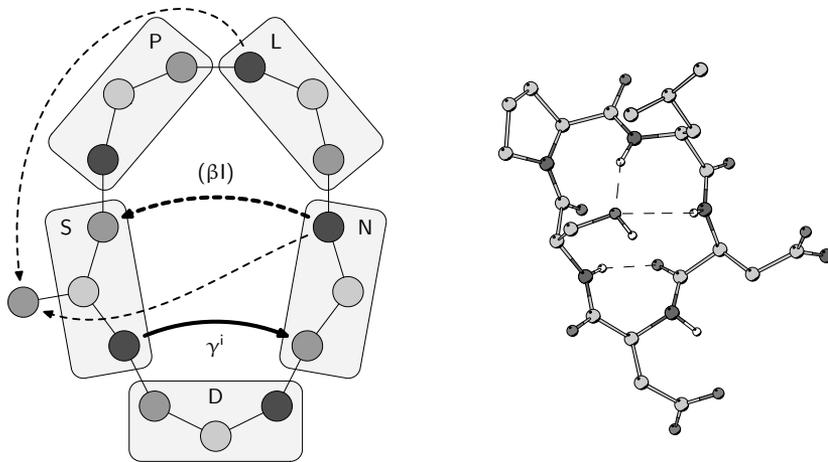


Abbildung 5.11: Schematische Darstellung der Struktur von c-(SPLND) und *ball-and-stick* Modell der zentralen Struktur des mit 74% dominanten Clusters. Die wesentlichen Strukturmerkmale sind ein γ^i -Turn um Asp, ein verzerter βI -Turn mit Pro in $i+1$ sowie eine gabelte Wasserstoffbrücke zwischen Leu/Asn H^N und Ser O^Y .

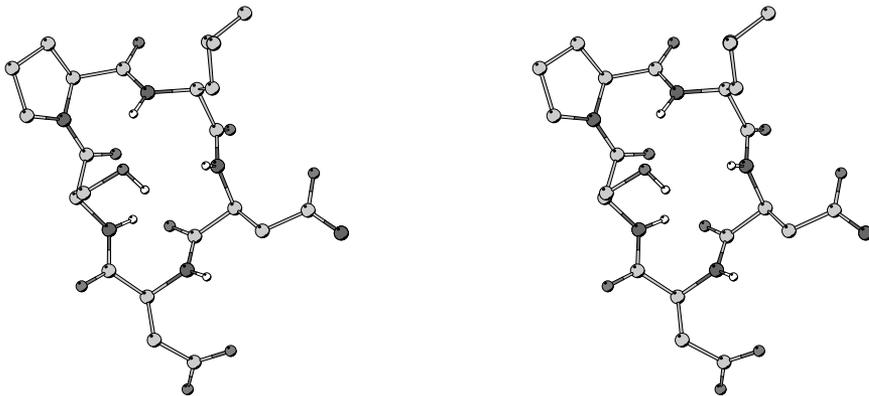


Abbildung 5.12: Gemittelte und minimierte Struktur der drei RMD-Cluster als Stereographik. Wie angesichts der Dominanz des ersten Clusters mit 74% der Trajektorie zu erwarten, entspricht die gemittelte Struktur weitestgehend dessen zentraler Struktur.

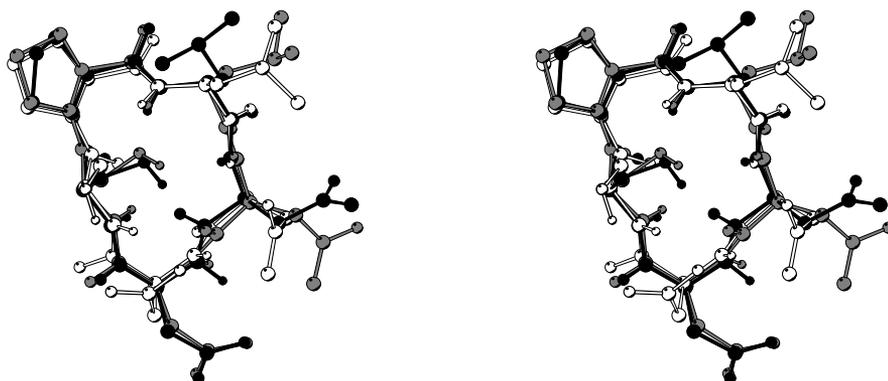


Abbildung 5.13: Überlagerung der drei RMD-Cluster von c-(SPLND). Das Hauptkonformer (74%) ist in schwarz, die Nebenkonformationen in grau (14%) und weiß (8%) dargestellt. Die Unterschiede liegen in der Orientierung der Peptidbindungen zwischen Asn und Asp bzw. zwischen Asp und Ser.

flexiblen Peptidbindungen abhängig und daher in den Nebenkonformationen nicht präsent.

Die Übereinstimmung der gemessenen sowie der während der RMD im Mittel beobachteten interatomaren Abstände (Tabelle 5.2) ist sehr gut. Die Überschreitungen der experimentellen Distanzen summieren sich auf 92 pm, verteilt auf 8 Überschreitungen von durchschnittlich 11 pm. Die Hauptbeiträge stammen dabei von Abständen unter Beteiligung von Amidprotonen, insbesondere $\text{SerH}^\alpha/\text{LeuH}^N$ (+39 pm) und $\text{LeuH}^N/\text{LeuH}^\alpha$ (+26 pm).

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen betragen -2.0 ppb K^{-1} für Leu und Asn bzw. -1.8 ppb K^{-1} für Asp. Dies lässt auf die Beteiligung an Wasserstoffbrücken schließen, wie es auch in der RMD beobachtet wird (Tabelle 5.4). Für Ser H^N ist der Temperaturgradient mit -4.6 ppb K^{-1} ange-

Tabelle 5.3: Rückgrattorsionswinkel in Grad, je Cluster gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Hertz für c-(SPLND) **8**.

	Ser		Pro		Leu		Asn		Asp	
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
I	-173	-171	-58	-12	-102	-77	-104	-101	-77	46
II	-169	-160	-60	-13	-116	-84	-121	111	51	42
III	-64	-171	-56	-7	-99	-71	-108	-90	-67	-46
\emptyset	-167	-170	-58	-12	-104	-77	-107	-106	-67	40
$^3J_{\text{ber}}$	5.8				9.2		9.3		5.1	
	(±1.3; -1.0)				(±1.4; -1.9)		(±1.5; -1.8)		(±1.3; -0.8)	
$^3J_{\text{exp}}$	7.5				9.9		8.3		7.2	

Tabelle 5.4: Wasserstoffbrücken von c-(SPLND) **8** je Cluster und gemittelt über die RMD. Im Falle der Beteiligung von Amidprotonen ist der Temperaturgradient $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ angegeben.

Donor	Akzeptor	% in Cluster				$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
		I	II	III	\emptyset	
Ser H ^N	Asn O	65	0	0	49	-4.6
Ser H ^N	Asp O ^{$\delta^{1/2}$}	0	0	58	5	
Leu H ^N	Ser O ^{γ}	65	92	37	65	-2.0
Asn H ^N	Ser O ^{γ}	28	15	27	26	-2.0
Asp H ^N	Asp O ^{$\delta^{1/2}$}	24	0	30	21	-1.8
Ser O ^{γ}	Asp O ^{$\delta^{1/2}$}	26	0	61	27	
Asn H ^{$\delta^{21/22}$}	Asp O ^{$\delta^{1/2}$}	33	27	57	35	

sichts der während 49% der Gesamttrajektorie populierte Wasserstoffbrücke zu Asn O recht klein. Es ist dabei aber zu berücksichtigen, dass die Geometrie der Wasserstoffbrücke leicht verzerrt ist, so dass das Proton dem Lösungsmittel besser zugänglich ist als bei idealer Anordnung. Ferner ist keine weitere Abschirmung durch Seitenketten gegeben.

Der Vergleich der gemessenen mit den berechneten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (Tabelle 5.3) zeigt für Leu und Asn eine gute Übereinstimmung. Für Ser und Asp sind die gemessenen Werte mit einer Abweichung von 0.4 bzw. 0.8 Hz geringfügig größer als die obere Schwelle des aus der gemittelten Trajektorie berechneten Idealbereichs der Karplusfunktion.

Die zentralen Strukturen der RMD werden wie üblich in einer freien MD weiter untersucht. Dabei erweist sich c-(SPLND) ohne die experimentellen *restraints* als sehr flexibel. Es treten eine Reihe von Strukturen ohne eine durch charakteristische Turns definierte Topologie auf. Interessanterweise kommt es während der freien MD der zentralen Struktur des zweiten Clusters der RMD sogar zu einer Isomerisierung der Ser-Pro-Peptidbindung. Dies ist eine mögliche Erklärung für das Auftreten des eingangs erwähnten, sehr schwachen zweiten Signalsatzes, analog zu den *cis/trans*-Isomeren z. B. bei c-(SPLNVD) **10** oder c-(RTL PFS) **7**.

Die NOE-Verletzungen nehmen gegenüber der RMD erheblich zu auf 586 pm, wofür vor allem die Überschreitung der Distanzen zwischen SerH ^{α} /LeuH^N, ProQ ^{γ} /LeuH ^{α} , ProQ ^{δ} /LeuH ^{α} und AspH ^{α} /SerH^N mit jeweils ca. 100 pm verantwortlich sind. Mit 45% hat lediglich eine Strukturfamilie einen signifikanten Anteil an der Gesamttrajektorie. Die Topologie der Ausgangsstruktur aus der RMD bleibt zwar bedingt erhalten, wie ein RMSD-Wert von 63 pm für die

zentralen Strukturen zeigt, jedoch weichen die Torsionswinkel insbesondere im Bereich des Pro und des γ^i -Turns von der RMD ab, so dass der Turn in der FMD nicht ausgebildet wird. Auch andere Übereinstimmungen mit Referenzgeometrien sind nicht erkennbar. Als Strukturmerkmale fallen lediglich Wasserstoffbrücken zwischen den Seitenketten von Ser, Asp und Asn ins Auge, ähnlich den Nebenkongformationen der RMD. Ferner tritt eine Vielzahl flexibler Strukturen mit unbedeutendem Anteil an der Gesamttrajektorie auf. Eine genaue Einzelanalyse dieser Strukturen ist angesichts deren geringer Bedeutung und Kurzlebigkeit nicht sinnvoll. Ein plausibler Grund für die Unterschiede zwischen RMD und FMD ist nicht erkennbar, zumal die RMD-Struktur sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmt. Alternative Rechnungen, bei denen die in der FMD kritischen *restraints* mit höheren Fehlertoleranzen behandelt werden, führen zu keinem anderen Ergebnis.

Abschließend kann die gemittelte Struktur der RMD-Cluster, wie sie in Abbildung 5.12 dargestellt ist, als geeignetes Strukturmodell für *c*-(SPLND) **8** betrachtet werden. Falls erforderlich kann die Flexibilität im Bereich des γ^i -Turns mit Hilfe der drei Strukturfamilien (Abbildung 5.13) berücksichtigt werden. Das Modell ist bezüglich der Interproton-Distanzen, Temperaturgradienten und Kopplungskonstanten in guter Übereinstimmung mit dem Experiment.

5.4.2 cyclo-(-Ser-Pro-Leu- β^h Asn-Asp-) **9**

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für *c*-(SPL β^h ND) **9** in DMSO- D_6 sind in den Tabellen 5.35 und 5.36 in Abschnitt 5.6 zusammengefasst. Die Differenz der chemischen Verschiebungen von Pro C^β und C^γ beträgt $\Delta\delta = 8.5$ ppm, was für eine *cis*-Konfiguration der Ser-Pro-Peptidbindung spricht. Dies wird durch einen starken NOE zwischen Ser H^α und Pro H^α sowie das Fehlen von NOE-Signalen zwischen Pro $\text{H}^{\delta^{1/2}}$ und Ser $\text{H}^{\text{N}}/\text{H}^\alpha$ bestätigt.

Die Zuordnung diastereotoper Protonen gelingt für die β -Protonen von Leu sowie die α -Protonen von β^h Asn. Die hierfür relevanten Daten (Tabelle 5.5) lassen einen μ -Winkel von 60° für β^h Asn erwarten. Im Falle von Ser verhindern Signalüberlagerungen eine zuverlässige Integration im NOESY. Die β -Protonen von Asp fallen zusammen. Für Ser und Asp ist eine diastereotope Zuordnung der β -Protonen daher nicht möglich; es wird mit Pseudoatomen gerechnet.

Aus dem NOESY lassen sich insgesamt 34 NOE-Distanzinformationen entnehmen, davon 22 intraresiduale, 11 sequentielle und 1 weiterreichender (Tabelle 5.6). Die Distanzgeometrie mit diesen Daten führt zu einer einzigen Strukturfamilie, deren zentrale Struktur als Startstruktur der RMD verwendet wird. Im Verlaufe der RMD-Rechnung erweist sich die Rückgratkonformation

Tabelle 5.5: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **9**.

	Leu		$\beta^h\text{Asn}$			
	H^{β^h}	H^{β^l}	H^{α^h}	H^{α^l}		
$^3J/\text{Hz}$	$\text{H}^\alpha\text{H}^\times$	4.1	8.1	$\text{H}^\beta\text{H}^\times$	3.2	11.8
d/nm	$\text{H}^\alpha\text{H}^\times$	243	281	$\text{H}^\beta\text{H}^\times$	225	262
	$\text{H}^N\text{H}^\times$	280	269	$\text{H}^N\text{H}^\times$	323	267
Zuordnung	$\text{H}^{\beta^h} = \text{H}^{\beta^2}$ pro-(<i>R</i>) $\text{H}^{\beta^l} = \text{H}^{\beta^3}$ pro-(<i>S</i>)		$\text{H}^{\alpha^h} = \text{H}^{\alpha^2}$ pro-(<i>S</i>) $\text{H}^{\alpha^l} = \text{H}^{\alpha^3}$ pro-(<i>R</i>)			
Konformation	$\chi_1 = 60^\circ$	50%	$\mu = 60^\circ$	84%		
	180°	14%	180°	5%		
	-60°	36%	-60°	11%		

Tabelle 5.6: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für $c\text{-SPL}^{\beta^h\text{ND}}$ **9**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Leu H^{β^2}	Asp H^N	377	415	389	Leu H^N	Leu H^α	270	297	283
Ser H^α	Pro H^α	198	217	170	Leu H^N	Leu H^{β^2}	278	306	210
Pro Q^β	Leu H^N	271	424	426	Leu H^N	Leu H^{β^3}	267	294	310
Pro Q^δ	Leu H^γ	320	485	406	Leu H^N	Leu Q^δ	367	765	415
Leu H^α	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	250	275	294	Leu H^α	Leu H^{β^2}	246	271	279
Leu H^{β^2}	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	245	270	262	Leu H^α	Leu H^{β^3}	283	311	253
Leu H^{β^3}	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	266	193	176	Leu H^α	Leu Q^δ	284	641	340
Leu Q^δ	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	380	783	399	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	$\beta^h\text{Asn}$ H^{α^2}	326	359	366
$\beta^h\text{Asn}$ H^N	Asp H^N	290	319	300	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	$\beta^h\text{Asn}$ H^{α^3}	269	296	259
$\beta^h\text{Asn}$ H^β	Asp H^N	341	375	379	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	$\beta^h\text{Asn}$ H^β	240	264	278
$\beta^h\text{Asn}$ H^{α^2}	Asp H^N	274	301	323	$\beta^h\text{Asn}$ H^N	$\beta^h\text{Asn}$ Q^γ	281	437	278
$\beta^h\text{Asn}$ H^{α^3}	Asp H^N	214	235	208	$\beta^h\text{Asn}$ H^β	$\beta^h\text{Asn}$ H^{α^2}	227	250	248
Ser H^N	Ser H^α	226	249	247	$\beta^h\text{Asn}$ H^β	$\beta^h\text{Asn}$ H^{α^3}	264	290	287
Ser H^N	Ser Q^β	257	408	277	$\beta^h\text{Asn}$ H^β	$\beta^h\text{Asn}$ Q^γ	224	366	249
Pro H^α	Pro Q^β	211	350	239	Asp H^N	Asp H^α	275	302	283
Pro H^α	Pro Q^γ	286	444	378	Asp H^N	Asp Q^β	236	382	272
Pro Q^γ	Pro Q^δ	199	456	225	Asp H^α	Asp Q^β	233	377	247

des Peptids als recht starr, wobei im Bereich der Asp-Ser-Peptidbindung gelegentlich eine Umorientierung stattfindet. Aus diesem Grund führt das Torsionswinkelclustering über die RMD-Trajektorie zu vier Clustern, die abgesehen von der Asp-Ser-Bindung keine Unterschiede aufweisen. Mit 36% und 30% sind vor allem zwei Orientierungen relevant, während die beiden verbleibenden Cluster lediglich 18% bzw. 6% der Trajektorie ausmachen.

Die beiden Hauptkonformationen sind zusammen mit einer schematischen Darstellung in Abbildung 5.14 gezeigt. Neben der gemittelten Struktur der vier Cluster in Abbildung 5.15 findet sich in Abbildung 5.16 eine Überlagerung aller Konformationen. In Tabelle 5.7 sind die Rückgrattorsionswinkel der einzelnen RMD-Cluster sowie deren Mittelwerte zusammengefasst, eine entsprechende Übersicht über die ausgebildeten Wasserstoffbrücken findet sich in Tabelle 5.8.

Die Struktur des Peptids ist durch einen β VIa-Turn charakterisiert. Die *cis*-Konfiguration der Ser-Pro-Peptidbindung ermöglicht dessen Ausbildung. Entsprechend nimmt Ser die $i+1$ - und Pro die $i+2$ -Position ein. Der Turn ist etwa während der Hälfte der Trajektorie (46%) durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Leu H^N und Asp O stabilisiert. Die beiden höchstpopulierten Konformationen repräsentieren Orientierungen der Asp-Ser-Peptidbindung, bei denen die Ausrichtungen der Carbonyl-Gruppe zu Leu H^N gegenüber dem für eine Wasserstoffbrücke idealen Winkel leicht in entgegengesetzte Richtungen abweichen. Es liegt insofern nahe, die beiden Konformationen als Momentaufnahmen der Grenzwerte der in diesem Bereich flexiblen Struktur zu sehen.

Das Gegenstück des β VIa-Turns bildet die β -Aminosäure mit einem nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisierten $\Psi\gamma$ -Turn. Signifikant populiert sind jedoch Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette von Asp und Ser H^N bzw. Ser H^Y. Der μ -Winkel des β^h Asn beträgt im Mittel über die gesamte Trajektorie 73° , liegt also nahe dem anhand der beobachteten NOE und Kopplungskonstanten (Tabelle 5.5) erwarteten Wert von 60° .

Die Erfüllung der experimentellen Interproton-Distanzen ist sehr gut. 11 geringfügige Überschreitungen – unter Beteiligung von Amidprotonen – von durchschnittlich 8 pm führen zu einer Summenabweichung von 90 pm (Tabelle 5.6). Auch der Vergleich der gemessenen mit den aus den Mittelwerten der RMD-Trajektorie berechneten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation (Tabelle 5.7). Die Kopplungskonstanten von Leu, β^h Asn und Asp liegen im Bereich der Standardabweichung der Karplus-Kurve. Für Ser lassen die Berechnungen einen sehr kleinen Wert von etwa 3.7 Hz erwarten. In der Tat liegt der gemessene Wert mit 2.5 Hz noch darunter.

Bei der Betrachtung der Temperaturgradienten der Amidprotonen fallen

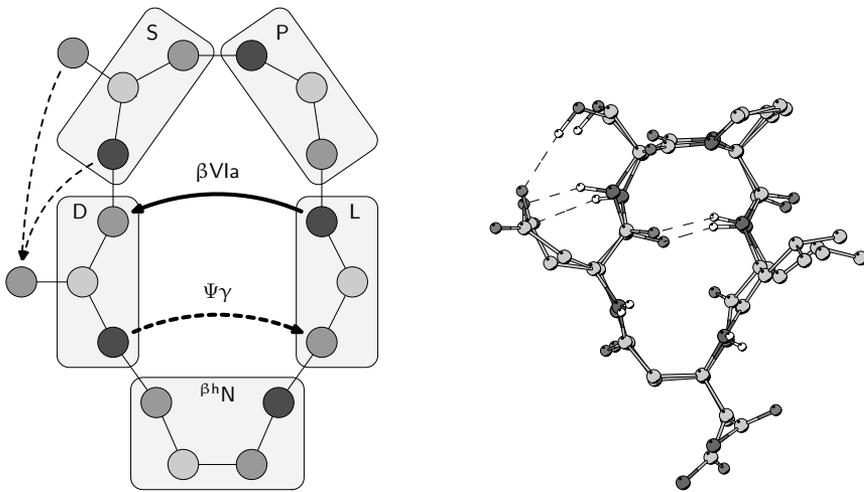


Abbildung 5.14: Schematische Darstellung der Struktur von $c\text{-}(\text{SPL}^{\beta^h\text{ND}})$ **9** und Überlagerung der beiden höchstpopulierten Cluster aus der RMD. Hauptmerkmal ist eine βVIa -Schleife mit Ser in $i+1$ und Pro in $i+2$, charakterisiert durch die *cis*-Peptidbindung zwischen Ser und Pro.

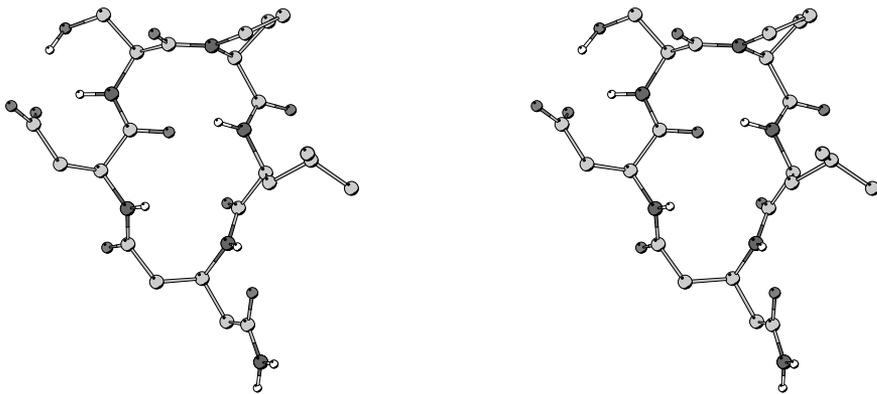


Abbildung 5.15: Gewichtete Durchschnittsstruktur der Strukturfamilien aus der RMD nach Energieminimierung (Stereodarstellung).

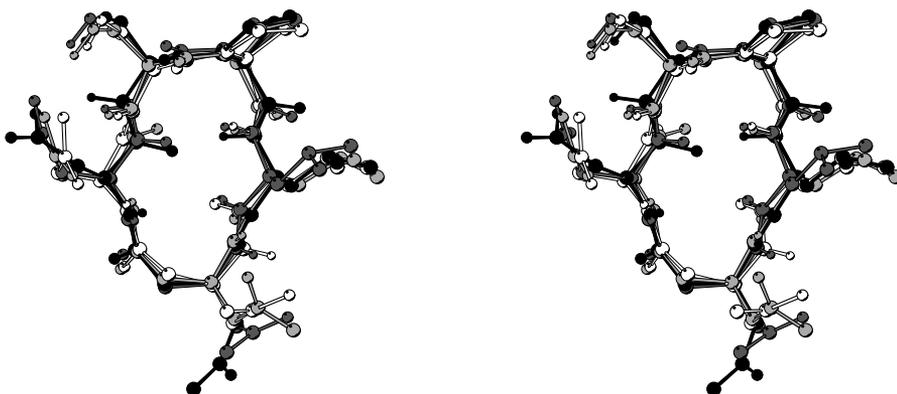


Abbildung 5.16: Überlagerung aller Konformationen aus der RMD. Cluster I–IV sind in schwarz, dunkelgrau, hellgrau und weiß dargestellt; die Anteile an der Gesamttrajektorie betragen 36, 30, 8 und 6%. Die Unterschiede zwischen den Strukturen konzentrieren sich auf die Peptidbindung zwischen Asp und Ser.

Tabelle 5.7: Rückgrattorsionswinkel in Grad, gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Hertz für c-(SPL $^{\beta\text{h}}$ ND) **9**.

	Ser		Pro		Leu		$^{\beta\text{h}}\text{Asn}$			Asp	
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	μ	ψ	φ	ψ
I	-62	118	-98	24	-102	-132	-107	71	-102	-113	-179
II	4	99	-100	18	-89	-140	-98	71	-101	-130	151
III	-121	105	-101	24	-105	-113	-105	77	-103	-129	-78
IV	-154	112	-91	5	-95	-127	-93	82	-110	-117	-65
\emptyset	-55	109	-99	21	-98	-131	-103	73	-103	-122	-171
${}^3J_{\text{ber}}$	3.7				8.8		9.1			9.7	
	(±1.2; -0.5)				(±1.4; -1.7)		(±1.4; -1.8)			(±1.4; -2.0)	
${}^3J_{\text{exp}}$	2.5				9.1		7.7			8.7	

Tabelle 5.8: Wasserstoffbrücken von c-(SPL $^{\beta\text{h}}$ ND) **9** je Cluster und gemittelt über die RMD. Im Falle der Beteiligung von Amidprotonen ist der Temperaturgradient $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ angegeben.

Donor	Akzeptor	% in Cluster					$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
		I	II	III	IV	\emptyset	
Ser H ^N	Asp O $^{\delta 1}$	42	30	20	4	30	-5.5
Ser H ^N	Asp O $^{\delta 2}$	38	25	25	8	30	
Leu H ^N	Asp O	57	67	5	1	46	-3.9
$^{\beta\text{h}}\text{Asn H}^{\text{N}}$	$^{\beta\text{h}}\text{Asn O}^{\epsilon 1}$	7	7	2	7	6	-1.6
Ser O $^{\gamma}$	Asp O $^{\delta 1/2}$	19	50	72	79	43	
Ser O $^{\gamma}$	Asp O $^{\delta 1/2}$	19	53	29	14	30	

vor allem zwei Werte ins Auge. Im Falle von Ser H^N , das während der Simulation häufig an Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten von Asp und Ser beteiligt ist, ist der Gradient mit -5.5 ppb K^{-1} kleiner als erwartet. Allerdings wird dieser Befund teilweise dadurch relativiert, dass im Falle von Seitenketten-Wasserstoffbrücken in der Regel eine höhere Flexibilität als für Wasserstoffbrücken zwischen Rückgratatomen vorliegt, so dass Ser H^N dem Lösungsmittel durchaus zugänglich sein kann. Im Falle von $\beta^h\text{Asn } H^N$ wird mit -1.6 ppb K^{-1} ein größerer Gradient gefunden, als es anhand der mit 6% nur sporadisch gebildeten Wasserstoffbrücke zu $\beta^h\text{Asn } O^{\epsilon 1}$ zu erwarten wäre. Hier kommen Abschirmungen gegenüber dem Lösungsmittel durch die Seitenketten von Leu und $\beta^h\text{Asn}$ als Erklärung in Frage. Im Falle von Leu und Asp liegen die Gradienten mit -3.9 bzw. -3.8 ppb K^{-1} in einem Bereich, der keine sicheren Hinweise auf Abschirmungseffekte gibt. Angesichts der sehr guten Übereinstimmung des Strukturvorschlags mit den experimentellen NOE-Distanzen und $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten erfüllt der Strukturvorschlag die Validierungskriterien insgesamt gut.

Während der FMD bleibt die Topologie des Moleküls grundsätzlich erhalten. Es kommt zu einer leichten Weitung des Ringes, was sich in einem RMSD-Wert von 56 pm zwischen RMD und FMD niederschlägt. Der vergrößerte Abstand zwischen Leu und Asp geht mit einer Überschreitung der experimentellen Distanzen zwischen Leu $H^{\beta 2/3}$ und Asp H^N um jeweils etwa 150 pm einher. Der Anstieg der Summenabweichung auf 537 pm ist hauptsächlich auf diese beiden *restraints* zurückzuführen. In der FMD dominieren Wasserstoffbrücken zwischen den Seitenketten von Ser und Asp sowie den Amidprotonen dieser beiden Reste. Dadurch orientiert sich auch die Peptidbindung zwischen Asp und Ser dergestalt, dass der βVIa -Turn nicht mehr durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird, wobei die Anordnung der Aminosäuren aber erhalten bleibt.

Zusammenfassend befindet sich der in Abbildung 5.15 dargestellte Strukturvorschlag mit einem βVIa -Prolin-Turn und der β -Aminosäure in einem $\Psi\gamma$ -Turn im Einklang mit den experimentellen Daten und stellt eine plausible Arbeitshypothese für *c*-(SPL β^h ND) dar.

5.4.3 cyclo-(-Ser-Pro-Leu-Asn-Val-Asp-) **10**

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten zu **10** in DMSO- D_6 sind in den Tabellen 5.37 bis 5.40 im Anhang zusammengefasst. *c*-(SPLNVD) liegt in DMSO in zwei Konformationen vor, deren Signalintensitätsverhältnis im NMR-Spektrum etwa $a : b = 2 : 1$ beträgt. Wie auch bei *c*-(RTL PFS) **7** unterscheiden sich die beiden Konformere in der Konfiguration der Peptidbindung zum Prolin, wie sich

anhand der in Tabelle 5.9 zusammengestellten Daten belegen lässt. Die Differenz der chemischen Verschiebungen zwischen C^β und C^γ beträgt 3.9 ppm für Signalsatz a und 8.7 ppm für Signalsatz b. Zusätzlich werden starke NOE zwischen Ser H^α und Pro Q^δ bei Signalsatz a bzw. Pro H^α bei Signalsatz b beobachtet. Somit kann der Ser-Pro-Peptidbindung für Signalsatz a *trans*-, für Signalsatz b *cis*-Konfiguration zugeordnet werden. Chemischer Austausch zwischen den Signalsätzen, belegt durch zur Diagonalen phasengleiche Kreuzsignale im ROESY, bestätigt das Vorliegen zweier Konformere.

Signalsatz a

Für Ser und Leu können anhand charakteristischer $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten und Distanzen die diastereotopen β -Protonen zugeordnet werden (Tabelle 5.10). Für Asn lassen weder Kopplungskonstanten noch NOE eine eindeutige Zuordnung zu. Im Falle von Asp ist die Differenz der Kopplungskonstanten recht klein, so dass auf eine Zuordnung verzichtet wird. Die β -Protonen von Asn und Asp werden daher jeweils mit einem Pseudoatom modelliert.

Aus dem NOE-Spektrum können für den ersten Signalsatz insgesamt 46 Distanzinformationen gewonnen werden, worunter 30 intraresiduale, 12 sequentielle und 4 weiterreichende sind (Tabelle 5.11). Die Distanzgeometrie mit diesen Daten führt nach Torsionswinkelclustering zu zwei Strukturfamilien, die sich durch einen *flip* der Peptidbindung zwischen Val und Asp in der Konformation im Bereich dieser beiden Reste unterscheiden. Beide zentralen Strukturen dienen jeweils als Startstrukturen für eine RMD. Auch hier werden insgesamt zwei Strukturfamilien beobachtet, welche den beiden DG-Familien entsprechen. Dabei wandelt sich die weniger bedeutende Struktur schon nach kurzer Simulationszeit in die Hauptstruktur um; eine Umlagerung in umgekehrter Richtung wird nicht beobachtet. Entsprechend ergibt das Clustering der Gesamttrajektorie zwei Cluster mit Anteilen von 68 bzw. 18%. Es liegt nahe, die bevorzugte Konformation von Cluster I als stabiler und als Hauptstrukturmodell für *c*-(SPLNVD) **10a** zu betrachten.

Tabelle 5.9: Für die *cis/trans*-Zuordnung relevante ^{13}C -Verschiebungen und NOE-Distanzen von **10a**.

		Signalsatz a	Signalsatz b
δ/ppm	Pro C^β	29.7	31.3
	Pro C^γ	25.8	22.6
d/pm	$H^{\alpha,S}/H^{\alpha,P}$	—	184
	$H^{\alpha,S}/Q^{\delta,P}$	210	—

Tabelle 5.10: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **10a**.

		Ser		Leu		Asn		Asp	
		H $^{\beta h}$	H $^{\beta l}$	H $^{\beta h}$	H $^{\beta l}$	H $^{\beta h}$	H $^{\beta l}$	H $^{\beta h}$	H $^{\beta l}$
$^3J/\text{Hz}$	H $^{\alpha}$ H $^{\chi}$	2.8	3.6	11.8	3.6	2.4	7.8	8.5	5.1
d/pm	H $^{\alpha}$ H $^{\chi}$	240	236	313	293	266	270	293	269
	H N H $^{\chi}$	320	343	353	375	374	382	383	423
Zuordnung		H $^{\beta h} = \text{H}^{\beta 3}$ (R) H $^{\beta l} = \text{H}^{\beta 2}$ (S)		H $^{\beta h} = \text{H}^{\beta 2}$ (R) H $^{\beta l} = \text{H}^{\beta 3}$ (S)		pseudo		pseudo	
Konformation	$\chi_1 = 60^\circ$	89%		7%					
	180°	2%		9%					
	-60°	9%		84%					

In Abbildung 5.17 sind eine schematische Darstellung der Struktur und eine *ball-and-stick* Darstellung der gemittelten RMD-Struktur gezeigt. Zusätzlich findet sich in Abbildung 5.18 eine Überlagerung der beiden Strukturfamilien als Stereodarstellung. Die Rückgrattorsionswinkel von c-(SPLNVD) **10a** sind in Tabelle 5.12 zusammengestellt; Tabelle 5.13 enthält eine Übersicht über die Bildungshäufigkeit der beobachteten Wasserstoffbrücken.

Das Hauptmerkmal der Struktur ist ein β I-Turn mit Pro in $i+1$ - und Leu in $i+2$ -Position. Der Turn wird in beiden Clustern ausgebildet und in 64% der Trajektorie durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Asn H N und Ser O stabilisiert. Die komplementäre Turnstruktur entspricht keinen Referenzgeometrien und wird auch nicht in signifikantem Maße durch Wasserstoffbrücken zwischen Rückgratatom stabilisiert. Ein β -Turn-Anteil zeigt sich nur in einer sporadisch (4%), vor allem in der Nebenkongformation auftretenden Wasserstoffbrücke zwischen Ser H N und Asn O. Eher ist bei der Orientierung der Val-Asp-Peptidbindung in Cluster II ein verzerrter γ -Turn um Asp zu erkennen. Erwähnenswert sind ferner eine Reihe von Wasserstoffbrücken unter Beteiligung vor allem der Seitenkette des Asp, welche wechselweise mit den Amidprotonen von Ser (29%), Val (13%) und Asp selbst (21%) interagiert.

Ein Vergleich der experimentellen mit den während der Simulation beobachteten Interproton-Distanzen (Tabelle 5.11) zeigt eine perfekte Übereinstimmung. Es wird keiner der experimentellen *restraints* überschritten.

Bei der Betrachtung der in Tabelle 5.12 aufgeführten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten liegen die gemessenen Werte für Ser und Leu im anhand der Simulation zu erwartenden Bereich. Asn und Asp liegen leicht außerhalb der Standardabweichung, wobei im Falle von Asp die beobachtete Schwankung

Tabelle 5.11: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(SPLNVD) **10a**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Ser H ^N	Val H ^N	368	405	366	Pro Q ^β	Pro Q ^δ	268	552	342
Ser H ^{β2}	Leu H ^N	400	440	326	Pro Q ^γ	Pro Q ^δ	281	569	225
Ser H ^{β2}	Asn H ^N	395	434	351	Leu H ^N	Leu H ^{β2}	375	412	221
Ser H ^{β3}	Asn H ^N	390	429	350	Leu H ^N	Leu H ^{β3}	353	388	305
Ser H ^α	Pro Q ^δ	210	435	226	Leu H ^N	Leu H ^γ	476	524	269
Pro Q ^δ	Leu H ^N	364	539	388	Leu H ^α	Leu H ^{β2}	313	344	277
Leu H ^α	Asn H ^N	324	356	317	Leu H ^α	Leu H ^{β3}	293	322	258
Asn H ^N	Val H ^N	392	431	354	Leu H ^α	Leu H ^γ	306	337	261
Asn H ^α	Val H ^N	288	317	299	Leu H ^α	Leu Q ^δ	285	642	347
Asn Q ^β	Val H ^N	306	469	243	Asn H ^N	Asn H ^α	282	310	283
Val H ^N	Asp H ^N	364	400	249	Asn H ^N	Asn Q ^β	339	509	277
Val H ^α	Asp H ^N	304	334	264	Asn H ^α	Asn Q ^β	234	378	254
Val H ^β	Asp H ^N	385	424	257	Asn Q ^β	Asn H ^{δ21}	283	440	269
Asp H ^N	Ser H ^N	282	310	266	Asn Q ^β	Asn H ^{δ22}	386	568	361
Asp H ^α	Ser H ^N	309	340	332	Val H ^N	Val H ^α	297	327	274
Asp Q ^β	Ser H ^N	421	610	305	Val H ^N	Val H ^β	333	366	278
Ser H ^N	Ser H ^α	268	295	274	Val H ^N	Val M ^{γ1}	396	554	354
Ser H ^N	Ser H ^{β2}	343	377	251	Val H ^N	Val M ^{γ2}	348	490	284
Ser H ^N	Ser H ^{β3}	320	352	269	Val H ^α	Val M ^{γ1}	287	409	281
Ser H ^α	Ser H ^{β2}	236	260	257	Val H ^α	Val M ^{γ2}	289	412	322
Ser H ^α	Ser H ^{β3}	240	264	246	Asp H ^N	Asp H ^α	306	337	247
Pro H ^α	Pro Q ^β	233	383	253	Asp H ^N	Asp Q ^β	283	439	286
Pro H ^α	Pro Q ^γ	270	424	322	Asp H ^α	Asp Q ^β	250	399	286

Tabelle 5.12: Rückgrattorsionswinkel in Grad, gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Hertz für c-(SPLNVD) **10a**.

	Ser		Pro		Leu		Asn		Val		Asp	
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
I	-75	150	-43	-41	-81	-15	-123	-136	-93	-47	-81	-61
II	-87	150	-47	-36	-85	-40	-125	-119	-99	119	66	-26
∅	-78	150	-44	-40	-82	-21	-123	-133	-95	-42	-70	-54
$^3J_{\text{ber}}$	6.4				7.0		9.7		8.4		5.4	
	(+1.2; -1.1)				(+1.3; -1.3)		(+1.4; -2.0)		(+1.4; -1.7)		(+1.3; -0.9)	
$^3J_{\text{exp}}$	6.9				8.4		6.2		4.4		7.5	

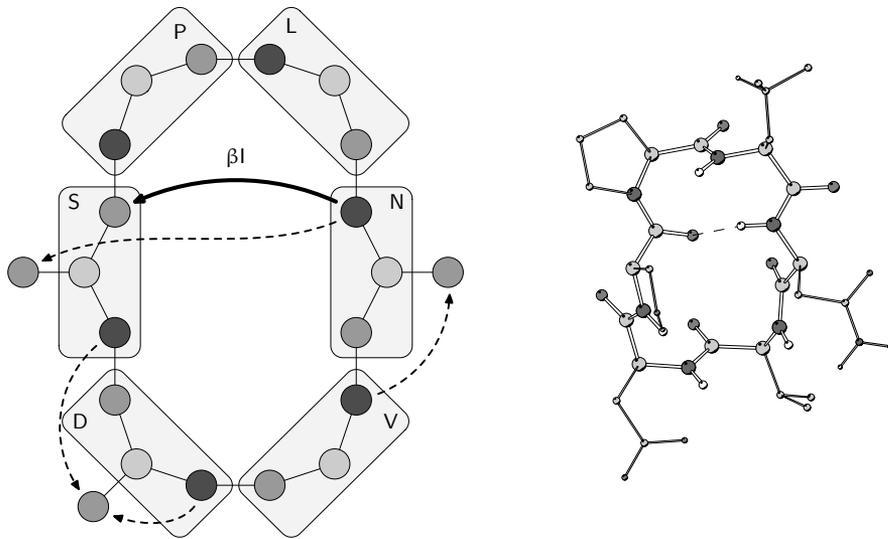


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung und *ball-and-stick* Repräsentation des RMD-Strukturmittels von *c*-(SPLNVD). Hauptcharakteristikum ist ein β I-Turn mit Pro in $i+1$ und Leu in $i+2$, der zu 64% durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert wird. Mit gestrichelten Pfeilen sind Wasserstoffbrücken zwischen Amidprotonen und Seitenketten eingezeichnet (siehe Tabelle 5.13).

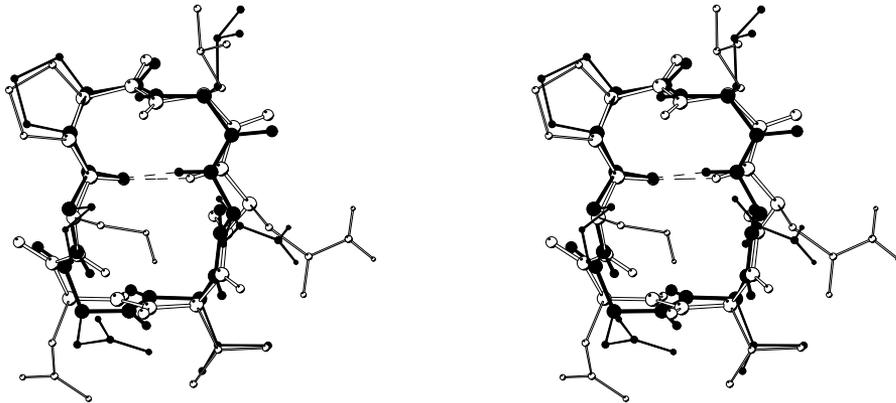


Abbildung 5.18: Überlagerung der zentralen RMD-Strukturen von *c*-(SPLNVD). Das Hauptkonformer (68%) ist in schwarz, die Struktur des kleineren Clusters (18%) in weiß dargestellt. Die Unterschiede resultieren aus einer Umkehrung der Peptidbindung zwischen Val und Asp; der β I-Turn wird in beiden Fällen ausgebildet.

Tabelle 5.13: Wasserstoffbrücken von c-(SPLNVD) **10a** je Cluster und gemittelt über die RMD. Im Falle der Beteiligung von Amidprotonen ist der Temperaturgradient $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ angegeben.

Donor	Akzeptor	% in Cluster			$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
		I	II	∅	
Ser H ^N	Asn O	0	17	4	-0.4
Ser H ^N	Asp O ^{δ1/2}	37	0	29	
Leu H ^N	Ser O ^γ	4	5	4	-2.2
Asn H ^N	Ser O	68	50	64	-0.4
Asn H ^N	Ser O ^γ	13	50	21	
Val H ^N	Asn O ^{δ1}	13	13	13	-4.9
Asp H ^N	Asp O ^{δ1/2}	26	0	21	-2.7
Ser H ^γ	Asp O ^{δ1/2}	35	0	26	
Asn H ^{δ21}	Asp O ^{δ1/2}	33	0	26	

des φ -Winkels bedacht werden muss, die die Verlässlichkeit der Berechnungen einschränkt. Der Wert für Val muss als Ausreißer interpretiert werden; einer experimentellen Kopplungskonstante von 4.4 Hz steht ein berechneter Wert von 8.4 Hz (+1.4 Hz; -2.0 Hz) gegenüber.

Die gemessenen Temperaturgradienten, mit den beobachteten Wasserstoffbrücken in Tabelle 5.13 aufgeführt, lassen sich gut mit dem Strukturvorschlag korrelieren. Ser H^N, häufig an Wasserstoffbrücken beteiligt und gegenüber dem Lösungsmittel durch Seitenketten abgeschirmt, hat mit -0.4 ppb K^{-1} einen entsprechend großen Gradienten. Dies gilt analog gilt für Asn H^N, ebenfalls mit $\Delta\delta/\Delta T = -0.4 \text{ ppb K}^{-1}$. Leu H^N und Asp H^N sind, wie eine Betrachtung der Moleküloberfläche zeigt, trotz partieller Beteiligung an Wasserstoffbrücken für das Solvens durchaus zugänglich, passend zu ihren mittelgroßen Gradienten von -2.2 bzw. -2.7 ppb K^{-1} . Val H^N, mit einem kleinen Temperaturgradienten von -4.9 ppb K^{-1} , ist nur gelegentlich an einer Wasserstoffbrücke zu Asp O^{δ1/2} beteiligt und ansonsten frei zugänglich.

Während der freien MD erweist sich die Struktur als außerordentlich stabil. Wie in der RMD werden beide Orientierungen der Val-Asp-Peptidbindung beobachtet. Die Hauptkonformation bleibt während der gesamten Simulationsdauer auch im Bereich von Val und Asp stabil. Der RMSD-Wert der zentralen Strukturen des Hauptclusters von RMD und FMD beträgt lediglich 14 pm. Die Verletzungen der experimentellen Distanzen sind mit drei Überschreitungen und einer Summenabweichung von 42 pm kaum nennenswert. Das Wasserstoffbrückenmuster einschließlich der Seitenketten bleibt ebenfalls erhalten.

Die Nebenkonformation erweist sich als weniger stabil, insbesondere im Bereich von Val und Asp, deren ψ - bzw. φ -Winkel im Laufe der FMD deutlich schwanken. Dies ist ein weiteres Argument für die Verwendung von Cluster I als Strukturmodell für c-(SPLNVD).

Als Fazit lässt sich festhalten, dass das vorgestellte Modell für **10a** in sehr gutem Einklang mit allen Validierungskriterien ist. Als Arbeitsgrundlage weiterer Untersuchungen kann die zentrale Struktur von Cluster I oder, dieser nahezu identisch, das Strukturmodell der RMD herangezogen werden.

Signalsatz b

Beim zweiten Signalsatz von c-(SPLNVD) liegen die gemessenen $^3J_{H\alpha H\beta}$ -Kopplungskonstanten fast ausschließlich im Bereich zwischen 4 und 8 Hz, der keine sichere Aussage für die Zuordnung diastereotoper β -Protonen erlaubt. Auch Distanzgeometrieläufe mit entgegengesetzten Zuordnungen bringen keine eindeutigen Erkenntnisse. Aus diesem Grund werden die Berechnungen für **10b** generell mit Pseudoatomen durchgeführt.

Aus dem NOE-Spektrum lassen sich insgesamt 40 Distanzinformationen entnehmen, 23 intraresiduale, 15 sequentielle und 2 weiterreichende Abstände (Tabelle 5.14). Die Distanzgeometrie führt zu zwei Clustern mit etwas unterschiedlicher Ausrichtung der Peptidbindung zwischen Asp und Ser. Die zentralen Strukturen beider Cluster werden als Startstrukturen für RMD-Läufe verwendet.

Das Torsionswinkelclustering der RMD-Trajektorien resultiert in insgesamt fünf Strukturfamilien, wobei Cluster I mit 44% der Gesamttrajektorie deutlich dominiert. Die verbleibenden Cluster haben hingegen nur Anteile von 11, 10, 9 und 6%. Die Unterschiede liegen, wie schon in der DG, zum einen im Bereich der Asp-Ser-Peptidbindung. Zum anderen zeigt auch die Peptidbindung zwischen Leu und Asn Flexibilität. Hierbei ist zu bemerken, dass die von der Hauptkonformation abweichenden Orientierungen jeweils nach kurzer Zeit zu dieser zurückkehren.

Eine schematische Darstellung der Struktur sowie die zentrale Struktur des meistpopulierten Clusters zeigt Abbildung 5.19. Zur Repräsentation durch eine einzelne Struktur ist am besten eine gewichtet gemittelte Struktur geeignet, die der Struktur von Cluster I weitestgehend entspricht (Abbildung 5.20). Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen den Clustern zeigt Abbildung 5.21 eine Überlagerung der zentralen Strukturen. In den Tabellen 5.15 und 5.16 finden sich Zusammenstellungen der Rückgrattorsionswinkel sowie der ausgebildeten Wasserstoffbrücken während der RMD.

Auffälligstes Strukturmerkmal ist ein β -Turn-Element mit Ser in $i+1$ und

Tabelle 5.14: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(SPLNVD) **10b**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Ser H α	Leu H N	247	272	262	Pro H α	Pro Q $^\beta$	260	411	237
Leu Q $^\beta$	Asp H N	298	458	371	Pro Q $^\beta$	Pro Q $^\delta$	277	564	345
Ser H α	Pro H α	201	221	170	Leu H N	Leu H α	289	318	281
Pro H α	Leu H N	321	353	251	Leu H N	Leu Q $^\beta$	334	502	279
Pro Q $^\delta$	Leu H N	393	575	402	Leu H N	Leu H $^\gamma$	360	396	336
Leu H α	Asn H N	233	256	237	Leu H α	Leu Q $^\beta$	264	418	256
Leu Q $^\beta$	Asn H N	311	474	263	Leu H $^\gamma$	Leu H $^\gamma$	267	294	237
Leu H $^\gamma$	Asn H N	310	341	287	Leu H α	Leu Q $^\delta$	261	607	347
Asn H N	Val H N	294	323	302	Asn H N	Asn H α	265	291	234
Asn H α	Val H N	316	348	345	Asn H N	Asn Q $^\beta$	280	436	286
Asn Q $^\beta$	Asn Q $^\delta$	287	788	353	Asn H α	Asn Q $^\beta$	237	383	244
Val H N	Asp H N	262	288	232	Asn H α	Asn Q $^\delta$	367	765	398
Val Q $^\gamma$	Asp H N	348	736	406	Val H N	Val H α	307	338	278
Val H α	Asp H N	324	356	347	Val H N	Val H $^\beta$	253	278	249
Val H $^\beta$	Asp H N	293	322	259	Val H N	Val Q $^\gamma$	320	694	326
Asp H N	Ser H N	312	343	372	Val H α	Val H $^\beta$	232	255	270
Asp H α	Ser H N	244	268	252	Val H α	Val Q $^\gamma$	276	630	258
Ser H N	Ser H α	298	328	269	Asp H N	Asp H α	257	283	282
Ser H N	Ser Q $^\beta$	274	428	278	Asp H N	Asp Q $^\beta$	291	449	255
Ser H α	Ser Q $^\beta$	224	366	244	Asp H α	Asp Q $^\beta$	248	396	251

Tabelle 5.15: Rückgrattorsionswinkel in Grad, je Cluster gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Hertz für c-(SPLNVD) **10b**.

	Ser		Pro		Leu		Asn		Val		Asp	
	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
I	-102	125	-99	50	-122	171	-28	-54	-93	-46	-120	-155
II	-88	130	-103	55	-116	-114	-106	-55	-90	-45	-121	-166
III	-4	113	-98	29	-110	174	-34	-50	-88	-47	-155	138
IV	-107	121	-102	50	-137	113	62	-78	-99	-40	-108	-160
V	-162	128	-85	13	-98	162	-31	-48	-77	-42	-128	-99
\emptyset	-96	124	-99	45	-120	172	-30	-56	-92	-45	-123	-160
$^3J_{\text{ber}}$	8.5				9.7		2.0		8.1		9.7	
	(±1.5;±1.6)				(±1.4;±1.8)		(±1.0;±0.1)		(±1.4;±1.6)		(±1.4;±1.0)	
$^3J_{\text{exp}}$	—				9.1		3.7		6.3		6.2	

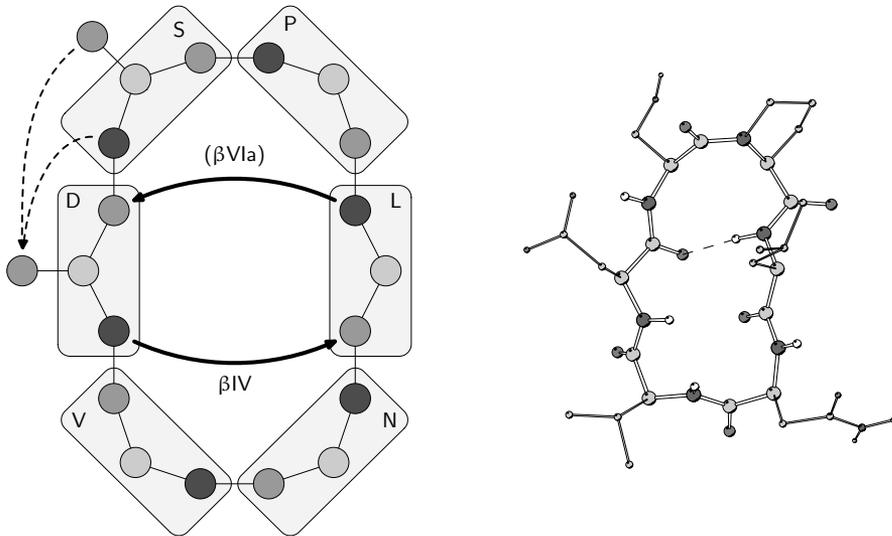


Abbildung 5.19: Schematische Darstellung und *ball-and-stick* Repräsentation des RMD-Strukturmittels von c-(SPLNVD) **10b**. Ein verzerrter β VIa-Turn mit Pro in $i+2$ ist das bestimmende Strukturelement und wird zu 64% durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, der gegenüberliegende β IV-Turn zu 27%.

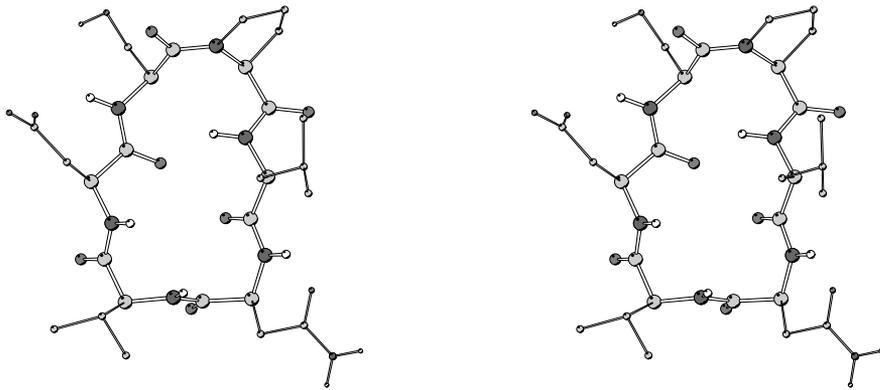


Abbildung 5.20: Durchschnittsstruktur der RMD von c-(SPLNVD) **10b** in Stereodarstellung.

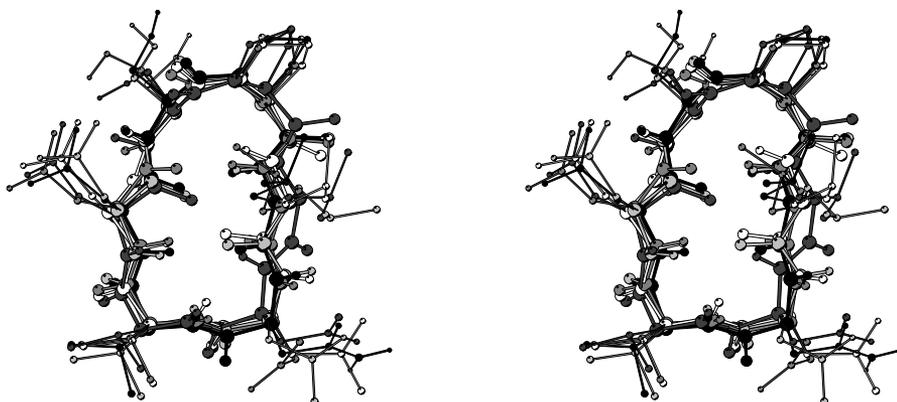


Abbildung 5.21: Überlagerung aller Cluster aus der RMD von c-(SPLNVD) **10b** in Stereodarstellung: I (schwarz), II (dunkelgrau), III (mittelgrau), IV (hellgrau), V (weiß). Die Unterschiede konzentrieren sich auf die Orientierungen der Peptidbindungen zwischen Leu und Asn sowie zwischen Asp und Ser; die Anordnung der Aminosäuren bleibt erhalten.

Tabelle 5.16: Wasserstoffbrücken von c-(SPLNVD) **10b** je Cluster und gemittelt über die RMD. Im Falle der Beteiligung von Amidprotonen ist der Temperaturgradient $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ angegeben.

Donor	Akzeptor	% in Cluster						$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
		I	II	III	IV	V	∅	
Ser H ^N	Asp O ^{δ1}	46	50	10	54	17	41	-5.9
Ser H ^N	Asp O ^{δ2}	45	39	36	44	24	41	
Leu H ^N	Asp O	66	79	84	54	1	64	-2.6
Asn H ^N	Asn O ^{δ1}	10	1	8	0	4	7	-3.9
Val H ^N	Asn O ^{δ1}	11	13	5	14	12	11	-0.9
Asp H ^N	Leu O	26	0	21	54	49	27	-0.6
Ser H ^γ	Asp O ^{δ1}	27	33	41	9	37	28	
Ser H ^γ	Asp O ^{δ2}	23	21	51	13	26	25	

Pro in $i+2$ -Position. Die Struktur ähnelt einem β VIA-Turn, wobei der φ -Winkel des Ser und der ψ -Winkel des Pro gegenüber der Referenzgeometrie um 36 bzw. 63° abweichen. Die charakteristische Wasserstoffbrücke zwischen Leu H^N und Asp O wird während 64% der Trajektorie ausgebildet. Die gegenüberliegende Turnstruktur entspricht bezüglich ihrer Torsionswinkel keinen anderen Referenzgeometrien, ist also als β IV-Turn einzuordnen. Anhand einer zu 27% populierten Wasserstoffbrücke zwischen Asp H^N und Leu O ist der β -Turn-Charakter erkennbar. Weitere Wasserstoffbrücken werden vor allem unter Beteiligung der Seitenkette des Asp gebildet, Bindungspartner sind das Amidproton des Ser sowie dessen Seitenkette. Nur sporadisch kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Seitenkette des Asn und Asn H^N bzw. Val H^N.

Das Modell erfüllt die experimentellen Distanzvorgaben sehr gut. Die Summenabweichung beträgt lediglich 44 pm, wobei nur zwei *restraints* leicht überschritten werden (Tabelle 5.14). Der β -Turn um Asn und Val wird durch den mittelstarken NOE zwischen Val H^N und Asp H^N gestützt (exp. 262 pm, RMD 232 pm).

Beim Vergleich der experimentellen mit den aus den gemittelten φ -Winkel berechneten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (Tabelle 5.15) stimmt der Wert für Leu nahezu perfekt überein. Für Asn wird übereinstimmend eine sehr kleine Kopplungskonstante vorgefunden, wobei der berechnete Wert mit 2.0 Hz (+1.0; -0.1) noch etwas unter dem gemessenen Wert von 3.7 Hz liegt. Der gemessene Wert für Val ist unwesentlich kleiner als im Rahmen der Standardabweichung der Karplus-Funktion berechnet. Bei Asp fällt die Differenz zwischen Simulation und experimentellem Wert mit 1.7 Hz etwas größer aus.

Leu H^N und Asp H^N, zu 64 bzw. 27% an β -Turn-Wasserstoffbrücken beteiligt, haben mit -2.6 bzw. -0.6 ppb K⁻¹ erwartungsgemäß große Temperaturgradienten (Tabelle 5.16). Asn H^N ist kaum an Wasserstoffbrücken beteiligt, passend hierzu wird ein Gradient von -3.9 ppb K⁻¹ gefunden. Ser H^N bildet zwar öfter eine Wasserstoffbrücke mit einem der Carboxyl-Sauerstoffatome des Asp, jedoch ist dessen Seitenkette offenbar zu beweglich, um eine effektive Abschirmung gegenüber dem Lösungsmittel zu bewirken, wie sich in einem Temperaturgradienten von -5.9 ppb K⁻¹ zeigt. Der Gradient von Val H^N ist mit -0.9 ppb K⁻¹ größer als anhand der Struktur zu erwarten, da abgesehen von einer nur gering populierten Wasserstoffbrücke zur Asn-Seitenkette keine Abschirmungseffekte sichtbar sind.

Die schon in der RMD erkennbare Flexibilität von c-(SPLNVD) **10b** zeigt sich erwartungsgemäß in auch in der freien Dynamik. Neben einer mit 40% dominanten Konformation treten eine Reihe weiterer kurzlebiger Strukturen auf. Die Unterschiede liegen im Bereich der Peptidbindungen Pro-Leu und

Leu-Asn, wo es zu einer leichten Weitung des Ringes kommt. Der RMSD-Wert der zentralen Strukturen der meistpopulierten Cluster aus RMD und FMD beträgt 49 pm; die Topologie des Peptids bleibt stets erhalten. Auch während der FMD werden die Distanzvorgaben sehr gut erfüllt; die Summenabweichung durch fünf Überschreitungen beträgt 110 pm.

Zusammenfassend steht mit dem in Abbildung 5.19 dargestellten Modell ein plausibler Strukturvorschlag mit sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen Distanzvorgaben zur Verfügung. Dabei muss bedacht werden, dass die gemittelte Struktur nur eine Momentaufnahme der tatsächlichen Verhältnisse in Lösung darstellen kann. **10b** zeigt in einzelnen Bereichen deutlich Flexibilität, die bei weitergehenden Arbeiten mit der Struktur berücksichtigt werden sollte.

5.4.4 cyclo-(-Ser- β^h Pro-Leu-Asn-Ile-Asp-) 11

Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale für c-(S $^{\beta^h}$ PLNID) ist in den Tabellen 5.41 und 5.42 am Ende des Kapitels zusammengefasst.

Zunächst erfolgt die Bestimmung der Konfiguration der Peptidbindung zwischen Ser und β^h Pro. Hierfür sind in Analogie zur Xaa-Pro-Bindung die Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\delta(\text{C}^\gamma, \text{C}^\delta)$ des β^h Pro sowie die Stärke der NOE zwischen Ser $\text{H}^N/\text{H}^\alpha$ und β^h Pro $\text{H}^\beta/\text{H}^{\epsilon 1/2}$ bedeutsam. Die Differenz $\Delta\delta(\text{C}^\gamma, \text{C}^\delta)$ beträgt 10.1 ppm und spricht somit für eine *cis*-Konfiguration. Hingegen ergeben sich aus dem NOE-Spektrum die folgenden Abstände: $d_{\text{SerHN}, \beta^h\text{ProH}^\beta} = 441$ pm, $d_{\text{SerHN}, \beta^h\text{ProH}^{\epsilon 1}} = 420$ pm, $d_{\text{SerH}^\alpha, \beta^h\text{ProH}^{\epsilon 1}} = 244$ pm. Anhand der beobachteten NOE ist insofern eine *trans*-Konfiguration wahrscheinlicher. Eine sichere Entscheidung ist allein anhand dieser Kriterien nicht möglich.

Aus diesem Grund werden Distanzgeometrie- und RMD-Rechnungen jeweils mit *cis*- und *trans*-Konfiguration durchgeführt. Dabei werden in der Distanzgeometrie für die *cis*-Konfiguration um 50% höhere NOE-Verletzungsenergien beobachtet. Während der RMD-Läufe sind die Summenabweichungen von den experimentellen NOE-Distanzen bei der *cis*-Konfiguration etwa dreimal so hoch wie bei *trans*-Konfiguration. Diese Befunde sprechen klar für eine *trans*-Konfiguration. Daher wird die Ser- β^h Pro-Peptidbindung von c-(S $^{\beta^h}$ PLNID) in *trans*-Konfiguration modelliert.

Die Zuordnung der diastereotopen Protonen gelingt anhand charakteristischer Kopplungskonstanten und NOE-Distanzen für Leu und Asp (Tabelle 5.17). Bei beiden Aminosäuren dominiert das Rotamer mit $\chi_1 = -60^\circ$. Die Daten für Asn sprechen für ein Rotamerengleichgewicht der Seitenkette; es wird mit einem Pseudoatom für die β -Protonen gerechnet. Signalüberlagerun-

gen verhindern eine sichere Bestimmung der für die diastereotope Zuordnung nötigen NOE-Distanzen für Ser und β^h Pro, weshalb Pseudoatome für Ser Q^β und β^h Pro Q^α verwendet werden.

Aus dem NOE-Spektrum können insgesamt 42 Interproton-Distanzen entnommen werden. Davon sind 27 intraresiduale, 9 sequentielle und 6 weiterreichende Abstände (Tabelle 5.18).

Die Distanzgeometrie liefert sehr homogene Ergebnisse mit nur minimalen Verletzungen der experimentellen Distanzen; die Struktur des Peptids ist durch die beobachteten NOE offenbar gut definiert. Die zentrale Struktur aus dem Clustering der DG bleibt während der anschließenden RMD stabil, so dass alle während der Trajektorie beobachteten Strukturen in einen Cluster fallen. Ein Strukturschema sowie eine graphische Darstellung der zentralen Struktur zeigt Abbildung 5.22. Zusätzlich ist in Abbildung 5.23 eine Stereodarstellung zu finden. Zusammenstellungen der Torsionswinkel und Wasserstoffbrücken während der Simulation finden sich in den Tabellen 5.19 und 5.20.

Bei der Betrachtung der Struktur fällt sofort ein $\Psi\beta$ -Strukturelement ins Auge, bei dem β^h Pro die $i+1$ -Position besetzt. Der Turn ist fast immer (zu 92%) durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Asn H^N und Ser O stabilisiert. Die Rückgrattorsionswinkel des Turns – ohne Berücksichtigung des μ -Winkels des β^h Pro – betragen $\varphi_{i+1} = -70^\circ$, $\psi_{i+1} = -125^\circ$, $\varphi_{i+2} = -120^\circ$ und $\psi_{i+2} = 13^\circ$. Diese Werte entsprechen keinem der klassischen Referenz- β -Turns. Der μ Winkel des β^h Pro beträgt durchschnittlich 108° .

Die Richtungsumkehr der Peptidkette auf der dem $\Psi\beta$ -Turn gegenüberliegenden Seite des Moleküls erfolgt ebenfalls auf ungewöhnliche Art und Weise. Es liegt kein klarer, einzelner β -Turn vor, sondern eine Überlagerung zweier

Tabelle 5.17: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **11**.

		Leu		Asn		Asp	
		H^{β^h}	H^{β^1}	H^{β^h}	H^{β^1}	H^{β^h}	H^{β^1}
$^3J/\text{Hz}$	$H^\alpha H^\alpha$	11.7	3.4	5.6	4.3	10.1	3.9
d/pm	$H^\alpha H^\alpha$	299	258	243	242	274	254
	$H^N H^\alpha$	258	326	305	300	256	279
Zuordnung		$H^{\beta^h} = H^{\beta^2}$ pro-(<i>R</i>) $H^{\beta^1} = H^{\beta^3}$ pro-(<i>S</i>)		pseudo		$H^{\beta^h} = H^{\beta^2}$ pro-(<i>S</i>) $H^{\beta^1} = H^{\beta^3}$ pro-(<i>R</i>)	
Konformation	$\chi_1 = 60^\circ$	10%				20%	
	180°	7%				12%	
	-60°	83%				68%	

Tabelle 5.18: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c-(S^{βh}PLNID) **11**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Ser H ^N	Asn H ^N	308	339	350	^{βh} Pro H ^β	^{βh} Pro Q ^δ	275	430	345
Ser Q ^β	Leu H ^N	371	548	478	Leu H ^N	Leu H ^α	287	316	273
Ser Q ^β	Asn H ^N	338	508	430	Leu H ^N	Leu H ^{β2}	258	284	228
^{βh} Pro Q ^α	Asn H ^N	315	478	411	Leu H ^N	Leu H ^{β3}	326	359	332
Asn Q ^β	Asp H ^N	227	371	311	Leu H ^N	Leu H ^γ	275	303	257
Ile H ^α	Ser H ^N	374	411	419	Leu H ^α	Leu H ^{β2}	299	329	284
^{βh} Pro Q ^α	Leu H ^N	211	350	258	Leu H ^α	Leu H ^{β3}	258	284	252
Asp H ^N	Ser H ^N	225	248	246	Leu H ^α	Leu H ^γ	311	342	265
Asp H ^N	Ser Q ^β	319	484	492	Asn H ^N	Asn H ^α	271	298	282
^{βh} Pro H ^β	Leu H ^N	338	372	259	Asn H ^N	Asn Q ^β	269	422	280
^{βh} Pro H ^β	Asn H ^N	325	358	335	Asn H ^α	Asn Q ^β	216	357	253
Leu H ^N	Asn H ^N	238	262	244	Asn Q ^β	Asn Q ^δ	236	703	340
Leu H ^α	Asn H ^N	291	320	320	Ile H ^N	Ile H ^β	233	256	229
Asn H ^α	Ile H ^N	241	265	247	Ile H ^N	Ile Q ^γ	237	383	271
Asn H ^α	Ile H ^α	387	426	423	Ile H ^α	Ile H ^β	234	257	261
Ser H ^N	Ser H ^α	256	282	282	Ile H ^α	Ile Q ^γ	284	440	268
Ser H ^N	Ser Q ^β	266	419	282	Asp H ^N	Asp H ^α	270	297	292
^{βh} Pro Q ^α	^{βh} Pro H ^β	296	392	253	Asp H ^N	Asp H ^{β2}	256	282	304
^{βh} Pro Q ^α	^{βh} Pro Q ^γ	245	519	279	Asp H ^N	Asp H ^{β3}	279	307	254
^{βh} Pro Q ^α	^{βh} Pro Q ^ε	296	591	381	Asp H ^α	Asp H ^{β2}	274	301	250
^{βh} Pro H ^β	^{βh} Pro Q ^γ	238	384	245	Asp H ^α	Asp H ^{β3}	254	279	233

Tabelle 5.19: Rückgrattorsionswinkel in Grad, gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete ³J_{HNHα}-Kopplungskonstanten in Hertz für c-(S^{βh}PLNID) **11**.

	Ser		^{βh} Pro			Leu		Asn		Ile		Asp	
	φ	ψ	φ	μ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
	-139	122	-61	108	-118	-88	-19	-117	172	-63	-36	-80	-34
³ J _{ber}	9.0					7.6		9.7		4.6		6.8	
	(±1.4; -1.8)					(±1.4; -1.4)		(±1.4; -2.0)		(±1.3; -0.7)		(±1.3; -1.3)	
³ J _{exp}	7.4					8.8		8.0		3.6		9.2	

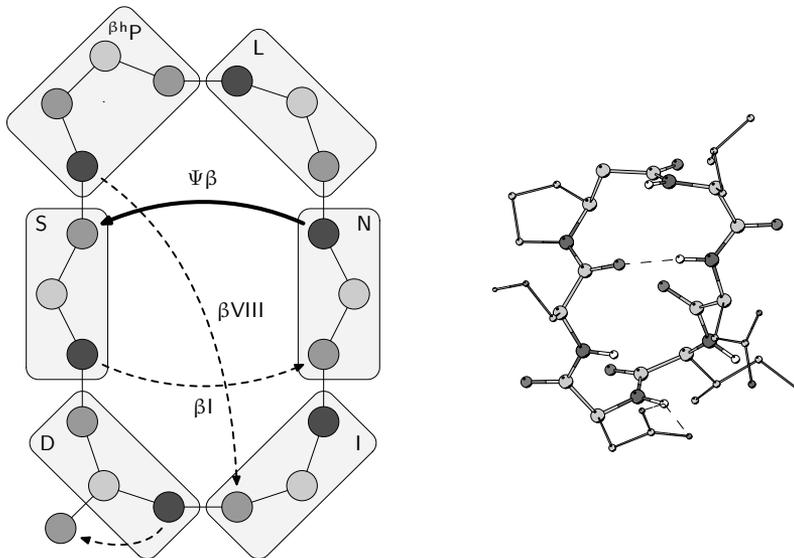


Abbildung 5.22: Strukturvorschlag für $c\text{-}(S^{\beta^h}\text{PLNID})$ **11** in schematischer und *ball-and-stick* Darstellung. Hauptmerkmale sind ein Wasserstoffbrücken-stabiler $\Psi\beta$ -Turn mit $\beta^h\text{Pro}$ in $i+1$ sowie ein Hybrid aus einem βI -artigen und einem βVIII -artigen Turn (gestrichelt), wobei Ile bzw. Asp die $i+1$ -Position besetzt. Der verzerrte βI -Turn wird durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, die in 26% der Trajektorie ausgebildet wird.

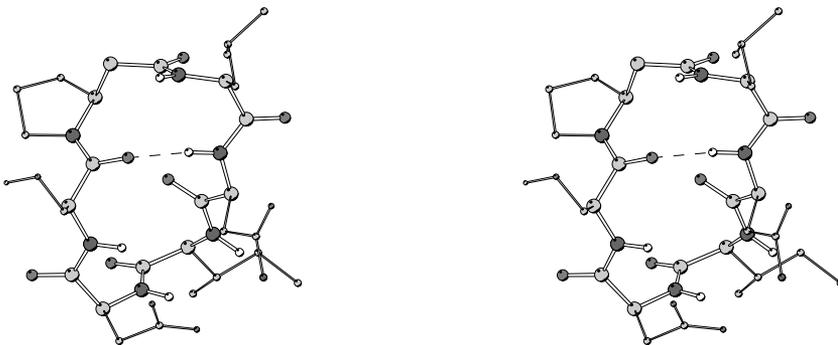


Abbildung 5.23: Stereodarstellung der zentralen RMD-Struktur von **11**.

Tabelle 5.20: Wasserstoffbrücken von c-(S^{βh}PLNID) **11**, gemittelt über die RMD. Im Falle der Beteiligung von Amidprotonen ist der Temperaturgradient $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ angegeben.

Donor	Akzeptor	Häufigkeit in %	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T} / \frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
Ser H ^N	Asn O	26	0.1
Ser H ^N	Asp O ^{δ1}	6	
Ser H ^N	Asp O ^{δ2}	3	
Asn H ^N	Ser O	92	-2.9
Ile H ^N	Asn O ^{δ1}	8	-1.0
Asp H ^N	Asp O ^{δ1}	39	-2.9
Asp H ^N	Asp O ^{δ2}	33	-2.9
Asn H ^{δ21}	Asp O ^{δ1}	52	
Asn H ^{δ21}	Asp O ^{δ2}	44	

β-Turns. Deutlich erkennbar, wenn auch leicht verzerrt, ist ein βVIII-Turn mit Asp in $i+1$ und Ser in $i+2$. Dieser Turntyp wird nicht durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert; in diesem Fall wäre ohnehin keine solche möglich, da ^{βh}Pro die $i+3$ -Position einnimmt. Stärker abweichend von der Referenzgeometrie trägt ein verzerrter βI-Turn mit Ile in $i+1$ und Asp in $i+2$ zur Gesamtstruktur bei. Der Anteil des βI-Turns zeigt sich auch in der zu 26% ausgebildeten Wasserstoffbrücke zwischen Ser H^N und Asn O.

Ein weiteres Charakteristikum der Struktur ist die verzweigte Wasserstoffbrücke zwischen den Seitenketten von Asp und Asn. Dabei besteht fast dauerhaft Kontakt zwischen Asp O^{δ1} oder Asp O^{δ2} und Asn H^{δ21}. Weitere Wasserstoffbrückenkontakte bestehen zwischen Asp O^{δ1/2} und Asp H^N (39%/33%) und seltener (20%) Ser H^N sowie gelegentlich (8%) zwischen Ile H^N und Asn O^{δ1}.

Der Vergleich zwischen experimentellen Distanzen und Abständen während der RMD zeigt eine sehr gute Übereinstimmung von Modell und Experiment. Es liegen nur 7 geringfügige Überschreitungen von durchschnittlich 9 pm vor, was eine Summenabweichung von 59 pm ergibt, zumeist unter Beteiligung von Amidprotonen. Der βI-Anteil um Ile und Asp zeigt sich im zwischen Asp H^N und Ser H^N beobachteten NOE (exp. 225 pm, RMD 246 pm).

Auch die aus den über die RMD-Trajektorie gemittelten Torsionswinkeln errechneten ³J_{HNHα}-Kopplungskonstanten sind konform zu den experimentell ermittelten Werten (Tabelle 5.19). Ser und Leu liegen im Normalbereich der Karpluskurve. Der experimentelle Wert für Ile unterschreitet diesen leicht, bestätigt dabei aber die Erwartung einer sehr kleinen Kopplungskonstante. Der experimentelle Wert für Asp ist etwa 1 Hz größer als anhand der Trajektorie

berechnet.

Die Temperaturgradienten der Amidprotonen (Tabellen 5.20 und 5.41) lassen sich ebenfalls gut mit strukturellen Eigenschaften der Struktur korrelieren. Besonders auffällig ist der positive Temperaturgradient von 0.1 ppb K^{-1} von Ser. In der Tat ist dieses Proton an Wasserstoffbrücken beteiligt und, wie eine Betrachtung der dem Lösungsmittel zugänglichen Moleküloberfläche zeigt, darüber hinaus durch die Seitenketten von Asp, Asn und Ser dem Lösungsmittel nahezu völlig unzugänglich. In ähnlicher Weise wird auch das Amidproton von Ile durch die Seitenketten von Asp und Asn abgeschirmt, jedoch nicht vollständig, was gut zu dem gemessenen Temperaturgradienten von -1.0 ppb K^{-1} passt. Etwas kleiner, als aufgrund der fast durchgehend populierten Wasserstoffbrücke zu erwarten wäre, ist der Temperaturgradient des Asn H^{N} mit -3.2 ppb K^{-1} . Da das Proton dem Lösungsmittel jedoch durchaus zugänglich ist, erscheint der Wert nicht unplausibel. Es bleibt das Amidproton des Leu, das weder an Wasserstoffbrücken beteiligt noch gegenüber dem Lösungsmittel abgeschirmt ist. Entsprechend findet sich hier mit -3.7 ppb K^{-1} der kleinste Temperaturgradient von $c\text{-}(S^{\beta\text{h}}\text{PLNID})$.

Während einer FMD bleibt die Struktur aus der RMD nahezu unverändert. Auch während der FMD tritt nur eine einzige Strukturfamilie auf. Der RMSD-Wert der zentralen Strukturen aus RMD und FMD beträgt 31 pm. Es kommt zu keinen Umordnungen der Topologie; auch die Torsionswinkel schwanken nur unwesentlich. Erwartungsgemäß erfüllt die FMD-Struktur die experimentellen NOE-Distanzen nicht mehr so gut wie die RMD-Struktur. Dabei ist eine Summenabweichung von 296 pm durch 7 Überschreitungen von durchschnittlich 42 pm für eine freie Dynamik immer noch ein ausgezeichneter Wert, zumal nur *restraints* unter Beteiligung von Amidprotonen verletzt werden.

Zusammenfassend führt die Strukturuntersuchung von $c\text{-}(S^{\beta\text{h}}\text{PLNID})$ **11** zu einem interessanten Strukturmodell mit einem $\Psi\beta$ - und einen $\beta\text{I}/\beta\text{VIII}$ -Hybridturn als charakteristische Merkmale. Der Strukturvorschlag ist plausibel und erweist sich unter allen Validierungskriterien als konform mit den experimentellen Daten.

5.4.5 cyclo-(- $\beta^{\text{h}}\text{Ser-Pro-Leu-}\beta^{\text{h}}\text{Asn-Ile-Asp-}$) **12**

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten für $c\text{-}(\beta^{\text{h}}\text{SPL}\beta^{\text{h}}\text{NID})$ **12** in $\text{DMSO-}D_6$ sind in den Tabellen 5.43 und 5.44 zusammengefasst.

Die Konfiguration der $\beta^{\text{h}}\text{Ser-Pro}$ -Peptidbindung lässt sich anhand von NOE-Distanzen und chemischen Verschiebungen ermitteln. Die aus dem NOE-Spektrum erhaltenen Abstände zwischen $\beta^{\text{h}}\text{Ser H}^{\alpha 2/3}$ und Pro H^{α} betragen 236 bzw. 223 pm; für Ser H^{β} und Pro H^{α} wird eine Distanz von 309 pm gemes-

sen. Ein NOE zwischen Ser H^N und Pro H^α ist vorhanden, wenn auch wegen Signalüberlappung nicht exakt quantitativ auswertbar. Hingegen werden keinerlei NOE zwischen den δ-Protonen des Pro und Protonen des Ser beobachtet. Zusammen mit der Differenz der chemischen Verschiebung $\Delta\delta(C^\beta, C^\gamma) = 9.0$ ppm des Pro sprechen die Daten eindeutig für eine *cis*-Konfiguration.

Eine Zuordnung der diastereotopen Protonen ist für ^{β^h}Ser, Leu und Asp möglich (Tabelle 5.21). Anhand der Zuordnung ist für ^{β^h}Ser ein μ -Winkel von 180° zu erwarten. Um die Zuordnung ergänzend abzusichern, wird auch eine Distanzgeometrie mit einem Pseudoatom ^{β^h}Ser Q^α durchgeführt. Dabei werden ausschließlich Strukturen mit $\mu = 180^\circ$ erhalten. Im Falle von ^{β^h}Asn verhindern Signalüberlagerungen im NOESY eine sichere Zuordnung, so dass mit einem Pseudoatom für die α-Protonen gerechnet wird.

Aus dem NOESY können 41 Abstandsinformationen gewonnen werden, 28 intraresiduale, 12 sequentielle und 1 weiterreichender (Tabelle 5.22).

Die Distanzgeometrie zeigt bereits, dass *c*-(^{β^h}SPL^{β^h}NID) innerhalb der *restraints* einen gewissen konformationellen Spielraum besitzt. Die 1000 generierten Strukturen fallen in zwei häufig populierte Cluster mit Anteilen von 40 und 33% und eine weniger bedeutende Strukturfamilie mit 13%. Die Unterschiede bestehen in den Torsionswinkeln von ^{β^h}Asn und den von diesen abhängigen ψ_{Leu} und φ_{Ile} , wobei sich auch verschiedene Einstellungen des μ -Winkels von ^{β^h}Asn für Cluster I ($\approx 60^\circ$) und II ($\approx -60^\circ$) finden.

In der RMD erweist sich die zentrale Struktur von Cluster I als sehr stabil (Abbildung 5.24). Die negative Einstellung des μ -Winkels von ^{β^h}Asn in Cluster II hingegen geht nach etwa der halben Simulationszeit (1.2 ns) in die offensichtlich günstigere Einstellung von 60° über. Dies geht mit einer generel-

Tabelle 5.21: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **12**.

	^{β^h} Ser		Leu		Asp			
	H ^{α^h}	H ^{α^l}	H ^{β^h}	H ^{β^l}	H ^{β^h}	H ^{β^l}		
³ J/Hz	H ^β H ^x	n. b.	11.8	H ^α H ^x	4.0	11.5	10.6	2.8
<i>d</i> /nm	H ^β H ^x	229	269	H ^α H ^x	256	278	250	230
	H ^N H ^x	236	225	H ^N H ^x	286	246	244	304
Zuordnung	H ^{α^h} = H ^{α³}	pro-(<i>R</i>)		H ^{β^h} = H ^{β³}	5B pro-(<i>S</i>)		H ^{β^h} = H ^{β²}	pro-(<i>S</i>)
	H ^{α^l} = H ^{α²}	pro-(<i>S</i>)		H ^{β^l} = H ^{β²}	pro-(<i>R</i>)		H ^{β^l} = H ^{β³}	pro-(<i>R</i>)
Konformation	$\mu = 60^\circ$	n. b.		$\chi_1 = 60^\circ$	6%		$\chi_1 = 60^\circ$	26%
	180°	84%		180°	13%		180°	1%
	-60°	n. b.		-60°	81%		-60°	73%

len Reduktion der zuvor beobachteten Fluktuationen mehrerer Torsionswinkel und einer für den Rest der Simulation stabilen Struktur einher. Bei einer Gesamtbetrachtung der RMD-Trajektorien sind daher vor allem zwei Strukturen mit $\mu \approx 60^\circ$ relevant, die 51% und 21% der Trajektorie abdecken. Die bereits in der DG beobachteten Unterschiede der Orientierungen der Leu- β^h Asn- und der β^h Asn-Ile-Peptidbindung finden ihre Entsprechung in diesen beiden RMD-Clustern. Die negativen Einstellungen des μ -Winkels sind instabil; zwei kleine Cluster von 9 und 6% können als wenig relevant betrachtet werden. Die Diskussion der Struktur konzentriert sich daher im Folgenden auf die RMD-Cluster I und II als Modell für c -(β^h SPL β^h NID).

Eine schematische Darstellung der Struktur sowie ein Modell der zentralen RMD-Struktur von Cluster I sind in Abbildung 5.24 zu finden. Abbildung 5.25 zeigt eine Überlagerung der beiden dominanten Cluster I und II. Die Rückgrattorsionswinkel sind in Tabelle 5.23 zusammengefasst.

Tabelle 5.22: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für c -(β^h SPL β^h NID) **12**.

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
β^h Ser H ^N	β^h Ser H ^{α2}	225	248	242	Ile H ^{α}	Ile H ^{β}	220	242	252
β^h Ser H ^N	β^h Ser H ^{α3}	236	260	259	Ile H ^{α}	Ile Q ^{γ}	280	436	275
β^h Ser H ^N	β^h Ser H ^{β}	274	301	287	Asp H ^N	Asp H ^{α}	267	294	267
β^h Ser H ^N	β^h Ser Q ^{γ}	278	433	299	Asp H ^N	Asp H ^{β2}	244	268	245
β^h Ser H ^{α2}	β^h Ser H ^{β}	269	296	287	Asp H ^N	Asp H ^{β3}	304	334	206
β^h Ser H ^{α3}	β^h Ser H ^{β}	229	252	236	Asp H ^{α}	Asp H ^{β2}	250	275	237
β^h Ser H ^{β}	β^h Ser Q ^{γ}	195	330	244	Asp H ^{α}	Asp H ^{β3}	230	253	264
Pro H ^{α}	Pro Q ^{β}	203	340	241	β^h Ser H ^{α2}	Pro H ^{α}	226	249	213
Pro H ^{α}	Pro Q ^{γ}	287	445	375	β^h Ser H ^{α3}	Pro H ^{α}	223	245	200
Pro Q ^{γ}	Pro Q ^{δ}	195	450	225	Pro H ^{α}	Leu H ^N	291	320	288
Leu H ^N	Leu H ^{β2}	246	271	221	β^h Asn Q ^{α}	Ile H ^N	216	357	255
Leu H ^N	Leu H ^{β3}	286	315	317	β^h Asn H ^{β}	Ile H ^N	329	362	366
Leu H ^N	Leu H ^{γ}	240	264	255	Ile H ^N	Asp H ^{β3}	312	343	363
Leu H ^N	Leu Q ^{δ}	321	696	409	Ile H ^{β}	Asp H ^N	336	370	300
Leu H ^{α}	Leu H ^{β2}	278	306	280	Asp H ^N	β^h Ser HN	237	261	249
Leu H ^{α}	Leu H ^{β3}	256	282	249	Asp H ^{α}	Ser H ^N	281	309	330
Leu H ^{α}	Leu H ^{γ}	277	305	263	Asp H ^{β2}	β^h Ser H ^N	314	345	358
β^h Asn Q ^{α}	β^h Asn H ^{β}	221	363	242	Asp H ^{β3}	β^h Ser H ^N	273	300	264
β^h Asn H ^{β}	β^h Asn Q ^{ϵ}	340	724	404	Asp H ^{β3}	β^h Ser Q ^{γ}	351	523	473
Ile H ^N	Ile H ^{α}	270	297	282	β^h Ser H ^N	Ile H ^{α}	328	361	368
Ile H ^N	Ile H ^{β}	243	267	254					

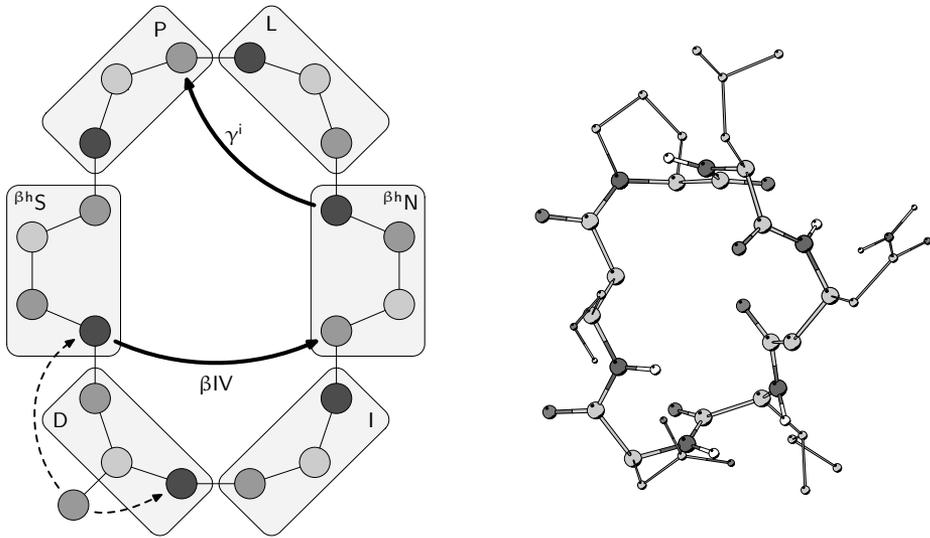


Abbildung 5.24: Schematische Darstellung und Modell der zentralen Struktur von Cluster I. Strukturelemente sind ein γ^i -Turn um Leu sowie ein βIV -Turn um Ile und Asp.

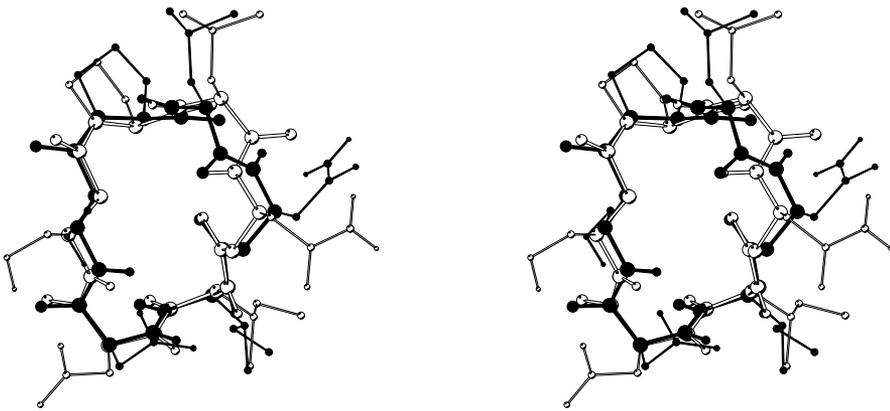


Abbildung 5.25: Stereodarstellung einer Überlagerung der zentralen Strukturen von Cluster I (schwarz) und Cluster II (weiß) aus der RMD.

Tabelle 5.23: Rückgrattorsionswinkel in Grad, je Cluster gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Hertz für c-($\beta^{\text{hSPL}}\beta^{\text{hNID}}$) **12**.

	β^{hSer}			Pro		Leu		β^{hAsn}			Ile		Asp	
	φ	μ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	μ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
I	-126	169	177	-82	-9	-85	97	59	64	123	-88	-27	-57	-41
II	-128	172	-164	-94	13	-84	-54	-127	64	130	-90	-30	-58	-41
III	-155	-174	155	-100	95	-111	-49	-99	-52	-92	-105	3	30	11
IV	-147	-178	155	-94	35	-78	-45	-95	-59	-100	-92	-27	-46	-40
${}^3J_{\text{ber}}$	9.5					7.6		6.6			8.0		3.9	
	(±1.4; -1.9)					(±1.4; -1.5)		(±1.8; -1.5)			(±1.4; -1.6)		(±1.2; -0.5)	
${}^3J_{\text{exp}}$	7.9					7.9		8.5			3.7		7.5	

Die Struktur zeigt nur geringe Übereinstimmung mit Referenz-Sekundärstrukturen. Ein β -artiges Turnelement mit Ile in $i+1$ und Asp in $i+2$ -Position wird durch die mit 23% am häufigsten ausgebildete Wasserstoffbrücke zwischen β^{hSer} H^N und β^{hAsn} O stabilisiert. Die Torsionswinkel stimmen nicht mit anderen Referenzgeometrien überein, weshalb der Turn in die Kategorie βIV fällt. Gegenüberliegend befindet sich Leu in der zentralen Position eines γ^i -Turns, der gelegentlich (13%) durch eine Wasserstoffbrücke zwischen β^{hAsn} H^N und Pro O stabilisiert wird. Die Ausbildung einer Struktur mit zwei gegenüberliegenden reinen β -Turns ist nicht möglich, da β^{hAsn} hierfür wie β^{hSer} einen μ -Winkel von 180° einnehmen müsste, jedoch eine Einstellung von 60° beobachtet wird. Zudem ist die beobachtete Flexibilität um β^{hAsn} zu berücksichtigen. Die Sequenz D β^{hSP} mit den für die Bindung an VCAM-1 wichtigen Aminosäuren Asp und Pro wird in einer starren gestreckten Konformation präsentiert.

Die Übereinstimmung des Modells mit den anhand der NOE bestimmten Distanzen ist gut. Es sind zehn geringfügige Überschreitungen zu verzeichnen, die sich zu einer Summenabweichung von 94 pm addieren (Tabelle 5.22). Ein mittelstarker NOE zwischen Asp H^N und β^{hSer} H^N unterstützt den vorgeschlagenen βIV -Turn. Die experimentell bestimmten ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten (Tabelle 5.23) von β^{hSer} , Leu und β^{hAsn} liegen im Bereich der anhand der Karplus-Funktion aus der Trajektorie berechneten Werte. Für Ile und Asp ist die Abweichung deutlicher, ohne dass hierfür ein Grund erkennbar wäre. Während der RMD-Simulation werden nur wenige Wasserstoffbrücken beobachtet. Am häufigsten ist β^{hSer} H^N beteiligt, was gut mit einem Temperaturgradienten von -2.7 ppb K^{-1} korreliert. β^{hAsn} H^N ist zu 13% an der Ausbildung der den γ^i -Turn stabilisierenden Wasserstoffbrücke beteiligt und während der restlichen Simulation zum Molekülzentrum orientiert, so dass der Temperaturgradient von -0.1 ppb K^{-1} erklärt werden kann. Ile H^N (-4.7 ppb K^{-1}) ist

Tabelle 5.24: Wasserstoffbrücken von c-($\beta^{\text{hSPL}}\beta^{\text{hNID}}$) **12** je Cluster und gemittelt über die RMD. Im Falle der Beteiligung von Amidprotonen ist der Temperaturgradient $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ angegeben.

Donor	Akzeptor	% in Cluster					$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
		I	II	III	IV	\emptyset	
$\beta^{\text{hSer}} \text{H}^{\text{N}}$	$\beta^{\text{hAsn}} \text{O}$	28	19	6	23	23	-2.7
$\beta^{\text{hSer}} \text{H}^{\text{N}}$	Asp O^{δ}	10	10	57	17	15	
$\beta^{\text{hAsn}} \text{H}^{\text{N}}$	Pro O	13	0	0	0	8	-0.1
Asp H^{N}	Asp O^{δ}	17	13	22	10	16	-4.7

nicht, Asp H^{N} (ebenfalls -4.7 ppb K^{-1}) nur gelegentlich an einer Wasserstoffbrücke mit der flexiblen Asp-Seitenkette beteiligt. Lediglich der Wert für Leu ist mit -1.3 ppb K^{-1} recht groß, da keine entsprechende, signifikant populierete Wasserstoffbrücke beobachtet werden kann. Eine Betrachtung der Struktur zeigt aber, dass Leu H^{N} zwischen den Seitenketten von Pro und Leu dem Lösungsmittel nur wenig exponiert ist.

Die beiden Hauptstrukturen der RMD werden in einer FMD als Startstrukturen verwendet. Dabei dominiert in beiden Fällen eine Konformation, die derjenigen von Cluster I der RMD sehr ähnlich ist. Sie umfasst 79% der Gesamttrajektorie; der RMSD-Wert für die zentralen Strukturen der Hauptcluster aus RMD und FMD beträgt 60 pm. Um β^{hAsn} ist eine kurzzeitige Umorientierung der Torsionswinkel zu beobachten, die aber rasch wieder in die Hauptkonformation übergeht. Erwartungsgemäß nimmt die Abweichung von den experimentellen Distanzen deutlich zu auf eine Summenüberschreitung von 656 pm. Insbesondere im Bereich von Ile und Asp weitet sich der β -artige Turn gegenüber der RMD, wodurch die größeren Überschreitungen entstehen. Die generelle Topologie der RMD bleibt unverändert, auch das Wasserstoffbrückenmuster bleibt erhalten.

Bei einer zusammenfassenden Betrachtung empfiehlt sich insbesondere das Hauptkonformer I aus der RMD als Strukturmodell für c-($\beta^{\text{hSPL}}\beta^{\text{hNID}}$). Neben einer guten Übereinstimmung mit den experimentellen Daten erweist es sich auch in der FMD als bevorzugte Konformation. In allen Konformationen wird die Teilsequenz $\text{D}^{\beta^{\text{hSP}}}$ in einer identischen gestreckten Anordnung präsentiert, die keine nennenswerte Flexibilität zeigt.

5.4.6 cyclo-(-Val- β^{hAla} -Phe-Leu-Ile-) **13**

Das Peptid c-($\text{V}^{\beta^{\text{hAFI}}}$) nimmt eine Sonderstellung unter den untersuchten β^{hXaa} -haltigen Peptiden ein. Im Gegensatz zu den übrigen Peptiden ist es

ein reines Modellpeptid zur Untersuchung des strukturellen Einflusses der β -Homoaminosäure als einzigem Strukturbildner, ohne als Integrin-Ligand fungieren zu sollen. Ferner erfolgen die Messungen in TFE, um Vergleichbarkeit mit Studien einer kollaborierenden Arbeitsgruppe zu gewährleisten, die zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit noch nicht vorlagen. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten in TFE-D_2 sind in den Tabellen 5.45 und 5.46 zusammengefasst.

Eine Zuordnung diastereotoper Protonen ist für $\beta^{\text{h}}\text{Ala}$ und Leu möglich. Im Falle von Phe fallen die β -Protonen zusammen, so dass mit einem Pseudoatom gerechnet wird. Die relevanten Daten sind in Tabelle 5.25 zusammengefasst. Der μ -Winkel des $\beta^{\text{h}}\text{Ala}$ ist anhand der getroffenen Zuordnung im Bereich von -60° zu erwarten.

Aus dem NOE-Spektrum lassen sich Informationen über 31 Proton-Proton-Distanzen entnehmen, davon 13 sequentielle und 18 intraresiduale (Tabelle 5.26). Die Distanzgeometrie zeigt sehr homogene Ergebnisse und führt zu einer einzelnen Strukturfamilie. Die Struktur bleibt auch während der RMD stabil, so dass die zentrale Struktur des anschließenden Clusterings als Modell für $c\text{-(V}^{\beta^{\text{h}}}\text{AFLI)}$ diskutiert werden kann. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 5.26 gezeigt, eine Stereodarstellung des Moleküls Abbildung 5.27.

$\beta^{\text{h}}\text{Ala}$ nimmt die zentrale Position in einem $\Psi\gamma$ -Turn ein. Zu 67% wird dieser durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Phe H^{N} und Val O stabilisiert. Der Abstand zwischen Phe C^α und Val C^α beträgt 0.53 nm, so dass anhand des Abstandskriteriums von einem β -Turn mit Leu und Ile Aminosäuren in $i+1$ und $i+2$ gesprochen werden kann. Eine korrespondierende Wasserstoffbrücke wird jedoch nicht beobachtet. Vielmehr wird ein γ -Turn mit Leu in $i+1$ ausge-

Tabelle 5.25: Daten zur Zuordnung diastereotoper Protonen für **13** in TFE-D_2 .

	$\beta^{\text{h}}\text{Ala}$		Leu			
	$\text{H}^{\alpha\text{h}}$	$\text{H}^{\alpha\text{l}}$	$\text{H}^{\beta\text{h}}$	$\text{H}^{\beta\text{l}}$		
$^3J/\text{Hz}$	$\text{H}^\beta\text{H}^\alpha$	2.7	13.3	$\text{H}^\alpha\text{H}^\alpha$	4.7	10.7
d/nm	$\text{H}^\beta\text{H}^\alpha$	247	253	$\text{H}^\alpha\text{H}^\alpha$	259	273
	$\text{H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$	290	277	$\text{H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$	n. b.	318
Zuordnung	$\text{H}^{\alpha\text{h}} = \text{H}^{\alpha\text{3}}$ pro-(R) $\text{H}^{\alpha\text{l}} = \text{H}^{\alpha\text{2}}$ pro-(S)		$\text{H}^{\beta\text{h}} = \text{H}^{\beta\text{3}}$ pro-(S) $\text{H}^{\beta\text{l}} = \text{H}^{\beta\text{2}}$ pro-(R)			
Konformation	$\mu = 60^\circ$	1%		$\chi_1 = 60^\circ$	7%	
	180°	1%		180°	19%	
	-60°	98%		-60°	74%	

Tabelle 5.26: Gemessene NOE (exp), unter Berücksichtigung von Toleranzen und Korrekturen resultierende Maximaldistanz (max) sowie während der RMD im Mittel beobachteter Abstand (MD) für $c\text{-}(V^{\beta^h\text{AFLI}})$ **13** in TFE- D_2 .

Atom 1	Atom 2	r/pm			Atom 1	Atom 2	r/pm		
		exp	max	MD			exp	max	MD
Val H^α	$\beta^h\text{Ala } H^N$	262	288	226	$\beta^h\text{Ala } H^N$	$\beta^h\text{Ala } H^{\alpha 3}$	290	319	335
Val H^β	$\beta^h\text{Ala } H^N$	223	245	258	$\beta^h\text{Ala } H^N$	$\beta^h\text{Ala } H^\beta$	238	262	283
$\beta^h\text{Ala } H^N$	Phe H^N	246	271	296	$\beta^h\text{Ala } H^{\alpha 2}$	$\beta^h\text{Ala } H^\beta$	253	278	283
$\beta^h\text{Ala } H^{\alpha 2}$	Phe H^N	226	249	264	$\beta^h\text{Ala } H^{\alpha 3}$	$\beta^h\text{Ala } H^\beta$	247	272	255
$\beta^h\text{Ala } H^{\alpha 3}$	Phe H^N	278	306	330	$\beta^h\text{Ala } H^\beta$	$\beta^h\text{Ala } M^\gamma$	281	401	237
Phe H^N	Leu H^N	357	393	384	Phe H^N	Phe H^α	267	294	279
Phe H^α	Leu H^N	233	256	209	Phe H^N	Phe Q^β	241	387	293
Phe Q^β	Leu H^N	301	462	409	Phe H^α	Phe Q^β	243	390	253
Leu H^α	Ile H^N	279	307	331	Leu H^N	Leu H^α	223	245	196
Ile H^N	Val H^N	314	345	237	Leu H^N	Leu $H^{\beta 2}$	318	350	321
Ile H^N	Val H^α	335	369	389	Leu H^α	Leu $H^{\beta 2}$	273	300	283
Ile H^α	Val H^N	269	296	340	Leu H^α	Leu $H^{\beta 3}$	259	285	260
Ile H^β	Val H^N	278	306	190	Ile H^N	Ile H^α	245	270	286
Val H^N	Val H^α	254	279	275	Ile H^N	Ile H^β	237	261	261
Val H^α	Val H^β	253	278	242	Ile H^α	Ile H^β	260	286	281
$\beta^h\text{Ala } H^N$	$\beta^h\text{Ala } H^{\alpha 2}$	277	305	224					

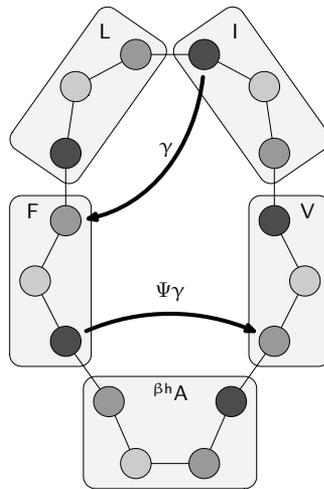


Abbildung 5.26: Schematische Darstellung der Struktur von $c\text{-}(V^{\beta^h\text{AFLI}})$.

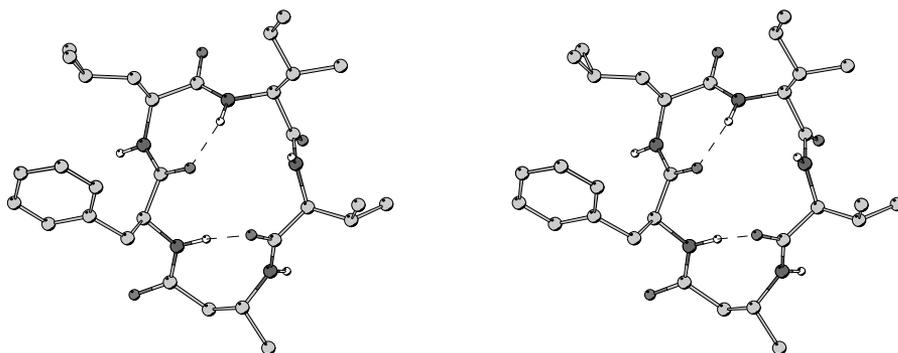


Abbildung 5.27: Stereodarstellung der zentralen Struktur aus der RMD von c -(V $^{\beta}$ hAFLI). Markante Strukturelemente sind ein $\Psi\gamma$ -Turn um $^{\beta}$ hAla sowie ein γ -Turn um Leu.

bildet, wobei die Wasserstoffbrücke zwischen Ile H^N und Phe O mit 90% fast immer populiert ist. Weitere Wasserstoffbrücken werden nicht beobachtet.

Beim Vergleich der experimentellen mit den während der RMD beobachteten Interprotondistanzen (Tabelle 5.26) sind einige Überschreitungen zu vermerken, meist unter Beteiligung von Amidprotonen. Insgesamt summieren sich 12 Überschreitungen auf eine Abweichung von 202 pm, so dass von einer zufriedenstellenden Übereinstimmung gesprochen werden kann.

Die mittleren Rückgrattorsionswinkel während der RMD sind in Tabelle 5.27 zusammengestellt. Die aus den simulierten φ -Winkeln berechneten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten stimmen sehr gut mit den experimentellen Werten überein. Lediglich der Wert für Ile liegt etwas unterhalb des Erwartungsbereiches.

Der Temperaturgradient von Ile H^N beträgt -0.2 ppb K^{-1} , im Einklang mit dessen Beteiligung an der den γ -Turn stabilisierenden, mit 90% nahezu permanent ausgebildeten Wasserstoffbrücke. Für Phe wird ein Gradient von -5.7 ppb K^{-1} gemessen, wobei angesichts des zu 67% Wasserstoffbrücken-stabilisierten $\Psi\gamma$ -Turns um Leu ein deutlich größerer Wert zu erwarten wäre,

Tabelle 5.27: Rückgrattorsionswinkel in Grad, gemittelt über die RMD, sowie gemessene und berechnete $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Hertz für c -(V $^{\beta}$ hAFLI) **13** in TFE-D₂.

	Val		$^{\beta}$ hAla			Phe		Leu		Ile	
	φ	ψ	φ	μ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ
	-130	114	118	-88	34	-155	117	61	-46	-116	-72
$^3J_{\text{ber}}$	9.5		2.9			7.3		6.9		9.7	
	(+1.4;-1.9)		(+1.5;-0.4)			(+1.4;-1.4)		(+1.9;-1.5)		(+1.4;-2.0)	
$^3J_{\text{exp}}$	8.8		n. b.			6.9		7.1		7.1	

wie auch bei Betrachtung der lösungsmittelzugänglichen Moleküloberfläche, so dass der Grund für diesen verhältnismäßig kleinen Wert unklar bleibt. Die experimentellen Gradienten für Val und Leu korrelieren mit -4.8 bzw. -5.3 ppb K^{-1} gut mit der Exposition zum Lösungsmittel im Strukturmodell.

Während der FMD ist eine deutlichere Tendenz zur Ausbildung eines den γ -Turn überlagernden β -Turns mit Leu in $i+1$ zu erkennen als während der RMD, wie eine zu 16% ausgebildete Wasserstoffbrücke zwischen Val H^{N} und Phe O indiziert. Die generelle Topologie des Peptids bleibt davon unberührt erhalten. Das abschließende Clustering führt wiederum nur zu einer Strukturfamilie. Der RMSD-Wert der zentralen Strukturen aus RMD und FMD beträgt 35 pm.

Zusammenfassend zeigt c-(V^{βh}AFLI) eine wohldefinierte Struktur mit nur geringer Flexibilität im Laufe der MD-Simulationen. Das erhaltene Strukturmodell ist plausibel und erfüllt zufriedenstellend die experimentellen Vorgaben.

5.5 Diskussion

Für alle untersuchten Peptide konnten sinnvolle Strukturvorschläge erarbeitet werden, die sich im Einklang mit den experimentellen Daten befinden. Die Ergebnisse sollen nun unter den in Abschnitt 5.3 formulierten Zielen dieses Teilprojekts betrachtet werden:

- Inwieweit kann eine Mimikry der Bindungsstelle von VCAM-1 für das Integrin $\alpha_4\beta_1$ durch die Peptide erfolgen?
- Stimmen die Strukturen mit dem erwarteten Einfluss der enthaltenen Strukturbildner überein, insbesondere der β -Homoaminosäuren, und ergeben sich diesbezüglich neue Aspekte?

5.5.1 Mimikry von VCAM-1

Wie bereits eingangs erwähnt wurde, sind unter den in den Peptiden **8** bis **12** enthaltenen Aminosäuren vor allen Dingen Asp und Pro für die Bindung von VCAM-1 an das Integrin $\alpha_4\beta_1$ wichtig.^[353,354] Um ein Maß der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Peptiden und VCAM-1 zu erhalten, wird daher die Teilsequenz DSP bestmöglich mit der entsprechenden Teilsequenz in VCAM-1 überlagert. Dabei werden zum einen nur die Rückgrat-atome, zum anderen zusätzlich die C^β -Atome für die Berechnung des RMSD-Wertes herangezogen, um auch die Orientierung der Seitenketten zu berücksichtigen. Die in Tabelle 5.28 zusammengestellten Werte zeigen, dass die untersuchten Peptide in sehr un-

terschiedlichem Maße der Struktur der VCAM-1-Bindungsstelle entsprechen. Die beste Übereinstimmung erreichen dabei **8** und **10a**. Mit Werten von ca. 0.8 nm (ohne C^β) und 0.9 nm (mit C^β) geben sie die Struktur im VCAM-1 recht gut wieder. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 5.28 eine Überlagerung der TQIDSPLN-Schleife mit dem Hauptkonformer von **8**. Eine schlechte Übereinstimmung zeigen vor allem **9** und **10b**, bei denen durch die *cis*-Peptidbindung zwischen Ser und Pro eine von VCAM-1 deutlich abweichende Topologie erzwungen wird. Die Werte der Peptide **11** und **12** sind wegen der β -Aminosäure in der überlagerten Teilsequenz nur bedingt vergleichbar, zeigen aber, dass trotz des zusätzlichen Rückgratatoms noch eine relativ gute Annäherung an die Proteinstruktur möglich ist.

Während also von einer teilweise durchaus guten strukturellen Mimikry gesprochen werden kann, ist keines der untersuchten Peptide in der Lage, die Bindung zwischen VCAM-1 und $\alpha_4\beta_1$ signifikant zu inhibieren (Tabelle 5.28), wie S. Urman in Zelladhäsionstests ermittelte. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, das durch die erhaltenen Strukturen nicht plausibel erklärt werden kann. Der Inhibitionseffekt ist offenbar vom Grad der Ähnlichkeit bezüglich der DSP-Sequenz unabhängig. Wie in 5.2.4 bereits erwähnt, weisen auch die von Strijowski synthetisierten analogen Peptide mit ACHC und ACPC als Prolin-Mimetika keinen nennenswerten Inhibitionseffekt auf. Während in diesem Fall noch angeführt werden kann, dass der Ersatz des für die Bindung wichtigen

*Tabelle 5.28: RMSD-Werte der Atome N, C^α , C und O von Asp, Ser und Pro in den Peptiden **8** bis **12** zu VCAM-1. Zur Berücksichtigung der Seitenkettenorientierung ist auch ein RMSD-Wert unter Einbeziehung der C^β -Atome angegeben. Für **11** wurden nur N, C^β und ggf. C^α des β^h Pro für die Berechnung herangezogen. Für **12** wurden C^β und C^α des β^h Ser nicht berücksichtigt. Die Werte der inhibitorischen Wirkung auf die Bindung zwischen $\alpha_4\beta_1$ und VCAM-1 wurden bei einer Peptidkonzentration von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ bestimmt und auf den Wert für den Antikörper normiert. Für **10** steht kein Inhibitionswert zur Verfügung; das vermutlich sehr ähnliche c-(SPLNID) zeigt keinerlei inhibitorische Wirkung (0%).*

Peptid	RMSD (N, C^α ,C,O)/nm	RMSD (N, C^α , C^β ,C,O)/nm	Inhibition /%
c-(SPLND) 8	0.081	0.088	0
c-(SPL β^h ND) 9	0.178	0.187	10
c-(SPLNVD) 10a	0.080	0.090	–
c-(SPLNVD) 10b	0.320	0.305	–
c-(S β^h PLNID) 11	0.094	0.111	6
c-(β^h SPL β^h NID) 12	0.110	0.134	2
Antikörper CD49	—	—	100

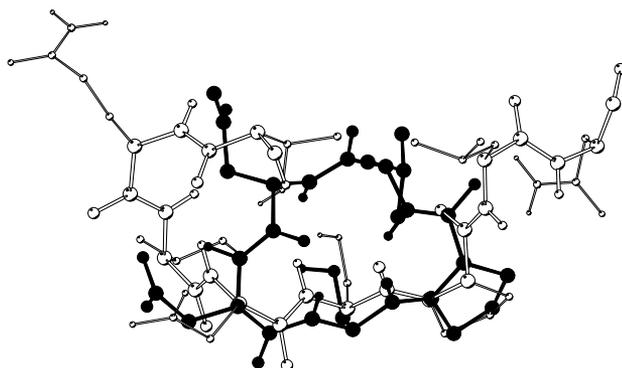


Abbildung 5.28: Überlagerung der Sequenz TQIDSPLN (weiß) aus der Röntgenstruktur^[350] des VCAM-1 mit c-(SPLND) **8** (schwarz). Die bestmögliche Anpassung wurde für die Rückgrat- und C β -Atome der Teilsequenz DSP berechnet; der RMSD-Wert beträgt 0.088 nm.

Pro sich negativ auf die Aktivität auswirken könnte, greift dieses Argument für die hier untersuchten Peptide nicht.

Insofern ist die Hypothese infrage zu stellen, dass die Sequenz SPLNID für das Design affiner Peptide ausreicht. Eventuell wäre mit einer anderen Subsequenz von TQIDSPLN eine bessere biologische Aktivität zu erzielen. In der Tat gibt es Hinweise, dass Gln ebenfalls für die Bindung erforderlich ist.^[353] Allerdings zeigen auch einige weitere, wiederum von Malešević synthetisierte und von Urman getestete Peptide auf Basis der Sequenz TQIDSP kaum Inhibitionseffekt. Denkbar ist daher auch, dass ein Hexapeptid generell nicht ausreicht, um alle für die Bindung zwischen VCAM-1 und $\alpha_4\beta_1$ nötigen strukturellen Merkmale auszubilden. Die eingangs erwähnten Oktapeptide lassen zumindest erwarten, dass prinzipiell auf Basis der Sequenz TQIDSPLN funktionelle Mimetika von VCAM-1 erhalten werden können.^[353] Allerdings konnte Urman in Versuchen mit entsprechenden, von Strijowski synthetisierten Oktapeptiden deren literaturbeschriebene Aktivität nicht reproduzieren.

5.5.2 Einfluss der Strukturbildner

Es ist zunächst davon auszugehen, dass die in den Peptiden c-(SPL β^h ND) **9**, c-(S β^h PLNID) **11**, c-(β^h SPL β^h NID) **12** und c-(V β^h AFLI) **13** inkorporierten β^3 -Aminosäuren einen den Ergebnissen von Schumann *et al.* entsprechenden Einfluss auf die Sekundärstruktur der Cyclopeptide haben und die $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma$ -Turns bevorzugen.^[63] Eine Zusammenstellung der in den untersuchten Peptiden beobachteten Turnstrukturen unter Beteiligung der β -Homoaminosäure findet sich in Tabelle 5.29.

Tabelle 5.29: Sekundärstrukturelemente und μ -Winkel der β -Homoaminosäuren.

	$\beta^{\text{h}}\text{Xaa}$	Turn, Position	$\mu/^\circ$
Pentapeptide			
c-(SPL β^{h} ND) 9	β^{h} Asn	$\Psi\gamma, i+1$	73
c-(V β^{h} AFLI) 13	β^{h} Ala	$\Psi\gamma, i+1$	-88
Hexapeptide			
c-(S β^{h} PLNID) 11	β^{h} Pro	$\Psi\beta, i+1$	108
c-(β^{h} SPL β^{h} NID) 12	β^{h} Ser	$\beta, i+3$	169
	β^{h} Asn	β, i	64

In der Tat wird genau dies für das Pentapeptid **13** beobachtet. Neben β^{h} Ala enthält **13** keinen weiteren strukturbildenden Baustein und belegt somit besonders klar das $\Psi\gamma$ -Turn-induzierende Potential von β -Homoaminosäuren. Ein Vergleich der Pentapeptide c-(SPLND) **8** und c-(SPL β^{h} ND) **9** zeigt, dass die β -Homoaminosäure auch ein stärkerer Strukturbildner als Pro ist. Während Pro in **8** die bevorzugte $i+1$ -Position eines β I-Turns einnimmt, ändert sich die Topologie durch den Austausch von Asn gegen β^{h} Asn grundlegend: In der zentralen Position eines $\Psi\gamma$ -Turn erzwingt β^{h} Asn die Ausbildung eines komplementären β VIa-Turns mit Pro in $i+2$ und einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser und Pro. Schumann *et al.* beobachteten für c-(RGDf β L) bereits, dass eine β -Aminosäure den Einfluss einer D-Aminosäure auf die Sekundärstruktur zu überkompensieren vermag.^[63,160] Entsprechendes gilt offenbar auch für den Grad des Einflusses von β -Aminosäuren und Prolin. Ferner ist die Beobachtung interessant, dass beide Möglichkeiten einer *gauche*-Konformation des μ -Winkels realisiert werden; dieser beträgt im Mittel 73° bei **9** und -88° bei **13**.

Das Hexapeptid c-(SPLNVD) **10** tritt in zwei Konformationen auf, die aus einer *cis/trans*-Isomerie der Ser-Pro-Peptidbindung resultieren. Pro nimmt dabei jeweils eine typische Position ein: $i+1$ eines β I-Turns in *trans*- und $i+2$ eines β VI-Turns in *cis*-Konfiguration. Der Einbau von β^{h} Pro anstelle von Pro in c-(S β^{h} PLNID) **11** hat einen deutlichen Einfluss auf die Struktur: Es wird nur noch eine wohldefinierte Konformation eingenommen, bei der sich β^{h} Pro in der $i+1$ -Position eines $\Psi\beta$ -Turns befindet. Der μ -Winkel des β^{h} Pro beträgt 108° . Offenbar ist die Ausbildung des Turns energetisch begünstigt, so dass der Nachteil einer fast ekliptischen Konformation kompensiert wird. Als sekundäre Aminosäure nimmt β^{h} Pro eine Sonderstellung unter den bisher in Cyclopeptiden untersuchten β -Aminosäuren ein, vergleichbar dem Pro unter den

α -Aminosäuren. Es ist daher nicht *a priori* davon auszugehen, dass es der allgemeinen Tendenz zur Einnahme der $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma$ -Turns folgt. Zum Vergleich steht bisher nur die Studie von Malešević *et al.* zur Verfügung, die für das Pentapeptid c -(AV β^h PFG) zwei Konformationen in DMSO-D₆ beschreibt. Im Hauptkonformer befindet sich β^h Pro in $i+1$ eines $\Psi\gamma$ -Turn, während es in der Nebenkonzformation die $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma/\Psi\beta$ -Hybrids einnimmt, also eine **11** ähnliche Struktur ausgebildet wird. Es ist beim Vergleich jedoch zu bedenken, dass es sich um Peptide verschiedener Größe handelt, worauf im Folgenden noch eingegangen werden wird.

Das Hexapeptid c -(β^h SPL β^h NID) **12** enthält zwei β^3 -substituierte Aminosäuren. Bisher sind Cyclopeptide mit zwei β -Aminosäuren nur von Pavone *et al.* untersucht worden, wobei das unsubstituierte β Ala verwendet wurde. Dabei wurden zwei gegenüberliegende β -Turns beobachtet; jedes β Ala befand sich in Position i des einen und Position $i+3$ des anderen (siehe Abschnitt 5.1, besonders Abbildung 5.5). Ein solches Arrangement wäre auch für **12** denkbar, während die Ausbildung zweier gegenüberliegender $\Psi\gamma$ -Turns in einem um zwei Atome erweiterten Hexapeptid eher unwahrscheinlich scheint. Die tatsächlich beobachtete Struktur weist ein β -artiges Turnelement mit β^h Asn in Position i und β^h Ser in $i+3$ auf. Der komplementäre Turn ist nicht klar zu klassifizieren. Um Leu wird ein γ^i -Turn gebildet. Zusätzlich weist das Peptid in diesem Bereich deutliche Flexibilität auf. Es ist nicht klar zu erkennen, worin der strukturinduzierende Einfluss der β -Aminosäuren besteht. Bemerkenswerterweise nimmt allerdings Pro die $i+1$ -Position der ungewöhnlichen Turnstruktur ein, obwohl die β^h Ser-Pro-Peptidbindung *cis*-Konfiguration hat. In jedem Fall bewirkt der Einfluss von β^h Ser und β^h Asn also ein Abweichen von einem klassischen Prolin-Turn.

Die bisherigen Betrachtungen belegen den strukturinduzierenden Einfluss von β^3 -Aminosäuren in Pentapeptiden eindeutig. Im Falle von Hexapeptiden ist hingegen keine klare Präferenz zur Ausbildung bestimmter Turnstrukturen infolge der Inkorporation von β -Aminosäuren erkennbar. Die Erweiterung der Ringgröße auf 19 bzw. im Falle des Einbaus zweier β -Aminosäuren wie bei **12** auf 20 Atome hat eine Verringerung der konformationellen Restriktion durch die Cyclisierung und des Einflusses potentieller Strukturbildner zur Folge. Vergleichbares ist auch von Schumann für die von ihm untersuchten Hexapeptide beschrieben worden.^[160] Ein gezieltes Design unter Verwendung von β -Aminosäuren scheint daher für Hexapeptide aufgrund der intrinsischen Flexibilität nur sehr eingeschränkt möglich. Ob β^h Pro in Hexapeptiden zur Induktion von $\Psi\beta$ -Turns in der Lage ist, wie ein Vergleich von **10** und **11** vermuten lassen kann, bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend stärken die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse

die Stellung von β -Homoaminosäuren als strukturbildende Bausteine, die im Rahmen eines rationalen Peptiddesigns Verwendung finden können. In Pentapeptiden ist die gezielte Generierung eines $\Psi\gamma$ -Turns durch eine β -Homoaminosäure möglich. Deren Präferenz für die $i+1$ -Position des $\Psi\gamma$ -Turns kann den Einfluss anderer Strukturbildner wie Prolin und D-Aminosäuren aufheben.

5.6 Experimenteller Teil

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte, mit Ausnahme der folgenden Ergänzungen, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben. Die Konzentration der Peptide betrug zwischen 5 und 10 mM. **8** bis **12** wurden in DMSO- D_6 , **13** in TFE- D_2 gemessen. Die chemischen Verschiebungen wurden auf das DMSO- D_6 -Lösungsmittelsignal bei 2.49 ppm (1H) und 39.6 ppm (^{13}C) bzw. auf das TFE- D_2 -Lösungsmittelsignal bei 3.88 ppm (1H) und 61.5 ppm (^{13}C) kalibriert. Die Akquisitions- und Prozessierungsparameter sind in den Tabellen 5.30 bis 5.32 aufgeführt. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind in den Tabellen 5.33 bis 5.46 zusammengestellt. Die *molecular modeling* Rechnungen erfolgten gemäß der in Abschnitt 3.8 dargelegten Vorgehensweise. Für Berechnungen in TFE wurde eine von T. Huber anhand der Parameter von Fioroni *et al.* erstellte Box verwendet.^[355]

Tabelle 5.30: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(SPLND) **8** und c-(SPL^βHND) **9**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, OIP [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter	Prozessierung
c-(SPLND) 8							
¹ H	zg30	64K	32	5.00, 10.01	0.1		32K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfph	8K×512	16	5.00, 10.01	0.7×11.7		1K×1K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2etgpsi	2K×256	16	5.00, 10.01	2.9×23.5	$\tau_m = 60$ ms	1K×1K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
HSQC	invietgpsi	4K×256	16	5.00, 10.01 74.6, 165.7	1.5×48.8	$J_{C,H} = 145$ Hz	1K×1K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gpplrndqf	4K×512	16	5.00, 10.01 105.0, 222.4	1.5×65.5	$J_{C,H} = 145$ Hz	1K×1K, sin ²
ROESY	roesyph	2K×256	16	5.00, 10.01	2.9×23.5	$\tau_m = 200$ ms	1K×1K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyph	8K×512	16	5.00, 10.01	0.7×11.7	$\tau_m = (200 + 50i)$ ms, $i \in [0, 4]$	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
c-(SPL^βHND) 9							
¹ H	zg30	64K	64	5.00, 10.52	0.1		32K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7		2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4ph	2K×256	32	5.00, 10.52 45.0, 92.0	3.1×54.2	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gpplrndqf	4K×512	16	5.00, 10.52 110.0, 220.0	1.5×64.8	$J_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin ²
ROESY	roesyph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 200$ ms	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyph	4K×512	16	5.00, 10.52	1.5×12.9	$\tau_m = (320 + 40i)$ ms, $i \in \{0, 1, 1.5, 2, 3\}$	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$

Tabelle 5.31: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von c-(SPLNVD) **10** und c-(S^{6H}PLNID) **11**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, O1P [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter	Prozessierung
c-(SPLNVD) 10							
¹ H	zg30	64K	128	6.18, 13.48	0.1		64K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfbh	2K×256	16	6.08, 13.50	4.0×31.6		2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	2K×256	16	6.08, 13.50	4.0×31.6	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, sin, + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4ph	2K×256	16	6.18, 13.48	4.0×131.1	$1/_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
				105.0, 222.4			
HMBC	inv4lplrndqf	2K×128	64	6.18, 13.48	4.0×262.2	$1/_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin ²
				105.0, 222.4			
ROESY	roesyph.2	4K×256	32	6.18, 13.50	2.0×31.6	$\tau_m = (140 + 20i)$ ms, $i \in [0, 3]$	4K×4K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesygpph	4K×256	16	6.18, 13.50	2.0×31.6	$\tau_m = 360$ ms	4K×4K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
c-(S^{6H}PLNID) 11							
¹ H	zg30	64K	64	5.00, 10.52	0.1		64K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfbh	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7		2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4ph	2K×256	32	5.00, 10.52	3.1×54.2	$1/_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
				45.0, 92.0			
HMBC	inv4gplplrndqf	4K×512	16	5.00, 10.52	1.5×64.8	$1/_{C,H} = 145$ Hz	2K×2K, sin ²
				110.0, 220.0			
ROESY	roesyph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 200$ ms	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyph	4K×512	16	5.00, 10.52	1.5×12.9	$\tau_m = (320 + 40i)$ ms, $i \in [0, 3]$	2K×2K, sin ² , + $\frac{\pi}{2}$

Tabelle 5.32: Akquisitions- und Prozessierungsparameter von $c\text{-}(\beta^{\text{h}}\text{SPL}^{\beta^{\text{h}}}\text{NID})$ **12** und $c\text{-}(\nu^{\beta^{\text{h}}}\text{AFLI})$ **13**.

Experiment	Pulsprogramm	TD	NS	SW, OIP [ppm]	Auflösung [Hz/Punkt]	Weitere Parameter	Prozessierung
$c\text{-}(\beta^{\text{h}}\text{SPL}^{\beta^{\text{h}}}\text{NID})$ 12							
^1H	zg30	64K	64	5.00, 10.52	0.1		32K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7		2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2ph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4ph	2K×256	32	5.00, 10.52 45.0, 92.0	3.1×54.2	$J_{\text{C,H}} = 145$ Hz	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4gplrndqf	4K×512	16	5.00, 10.52 105.0, 220.0	1.5×64.8	$J_{\text{C,H}} = 145$ Hz	2K×2K, \sin^2
ROESY	roesyph	2K×256	16	5.00, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 200$ ms	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyph	4K×512	16	5.00, 10.52	1.5×12.3	$\tau_m = (320 + 40i)$ ms, $i \in [0, 3]$	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
$c\text{-}(\nu^{\beta^{\text{h}}}\text{AFLI})$ 13							
^1H	zgpr	64K	128	5.23, 10.52	0.1		32K, exp, LB 0.30
DQF-COSY	cosydfphpr	4K×256	16	5.23, 10.52	1.5×24.7		2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
TOCSY	dipsi2phpr	4K×256	16	5.23, 10.52	1.5×24.7	$\tau_m = 60$ ms	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
HMQC	inv4phpr	4K×256	16	5.23, 10.52 50.0, 100.0	1.5×58.9	$J_{\text{C,H}} = 145$ Hz	1K×1K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
HMBC	inv4lrndprqf	4K×256	16	5.23, 10.52 100.0, 200.0	1.5×117.9	$J_{\text{C,H}} = 145$ Hz	1K×1K, \sin^2
ROESY	roesyetgppr	2K×256	16	5.23, 10.52	3.1×24.7	$\tau_m = 200$ ms	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$
NOESY	noesyphpr	4K×512	16	5.23, 10.52	1.5×12.3	$\tau_m = (320 + 40i)$ ms, $i \in [0, 3]$	2K×2K, \sin^2 , $+\frac{\pi}{2}$

Tabelle 5.33: ^1H -NMR-Daten von c-(SPLND) **8** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere		
Ser	7.65	4.62	$\beta^{2/3}$ 3.48/3.44	γ n. b.	7.5	-4.6
Pro		4.14	$\beta^{2/3}$ 2.17/1.72	γ^2 1.89; γ^3 1.89 $\delta^{2/3}$ 3.80/3.68		
Leu	7.43	4.38	$\beta^{2/3}$ 1.44/1.40	γ 1.43 $\delta^{1/2}$ 0.87/0.84	9.6	-2.0
Asn	7.86	4.35	β^2 2.43; β^3 2.54	$\delta^{21/22}$ 7.46/6.98	8.3	-2.0
Asp	8.44	4.31	$\beta^{2/3}$ 2.90/2.43		7.2	-1.8

Tabelle 5.34: ^{13}C -NMR-Daten von c-(SPLND) **8** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				
	C	C^{α}	C^{β}	C^{γ}	C^{δ}
Ser	169.8	53.0	62.3		
Pro	171.1	61.6	30.0	24.9	47.6
Leu	171.1	52.6	41.6	24.8	$\delta^{1/2}$ 23.2/22.3
Asn	170.9	50.9	36.9	172.2	
Asp	170.9	50.3	34.2	172.6	

Tabelle 5.35: ^1H -NMR-Daten von c-(SPL $^{\beta\text{h}}$ ND) **9** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere		
Ser	8.10	4.17	$\beta^{2/3}$ 3.63/3.45	γ n. b.	2.5	-5.5
Pro		4.65	$\beta^{2/3}$ 2.20/1.92	$\gamma^{2/3}$ 1.85/1.52 $\delta^{2/3}$ 3.46/3.32		
Leu	8.10	4.33	β^2 1.44; β^3 1.59	γ 1.45 $\delta^{1/2}$ 0.90/0.82	9.1	-3.9
β^{h} Asn	7.5	α^2 2.59 α^3 2.16	4.15	$\gamma^{2/3}$ 2.35/2.28 $\varepsilon^{21/22}$ 7.34/6.85	7.7	-1.6
Asp	7.99	4.55	β^2 2.45; β^3 2.45		8.7	-3.8

Tabelle 5.36: ^{13}C -NMR-Daten von c-(SPL $^{\beta\text{h}}$ ND) **9** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				
	C	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	C $^{\delta}$
Ser	171.9	54.5	61.7		
Pro	170.8	61.3	31.1	22.5	46.6
Leu	170.9	51.7	40.8	25.0	$\delta^{1/2}$ 23.6/22.1
β^{h} Asn	170.2	40.0	46.1	40.1	172.5
Asp	170.8	50.2	36.5	171.7	

Tabelle 5.37: ^1H -NMR-Daten von c-(SPLNVD) **10** in DMSO- D_6 , Signalsatz a.

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N $^{\text{H}}$	H $^{\alpha}$	H $^{\beta}$	andere		
Ser	7.62	4.69	β^2 3.86 β^3 3.66	γ n. b.	6.9	-0.4
Pro		4.18	$\beta^{2/3}$ 2.25/1.62	$\gamma^{2/3}$ 1.96/1.82 $\delta^{2/3}$ 3.80/3.55		
Leu	7.68	4.14	β^2 1.52 β^3 1.67	γ 1.47 $\delta^{1/2}$ 0.86/0.83	8.4	-2.2
Asn	7.55	4.37	$\beta^{2/3}$ 2.80/2.67	δ^{21} 7.78 δ^{22} 7.36	6.2	-0.4
Val	8.73	3.78	1.97	γ^1 0.89 γ^2 0.93	4.4	-4.9
Asp	8.33	4.55	$\beta^{2/3}$ 2.89/2.48		7.5	-2.7

Tabelle 5.38: ^{13}C -NMR-Daten von c-(SPLNVD) **10** in DMSO- D_6 , Signalsatz a.

AS	δ/ppm				
	C	C $^{\alpha}$	C $^{\beta}$	C $^{\gamma}$	C $^{\delta}$
Ser	169.2	54.9	61.3		
Pro	171.3	62.5	29.7	25.8	47.7
Leu	171.1	51.4	40.7	24.6	$\delta^{1/2}$ n. b.
Asn	170.9	49.9	37.6	175.1	
Val	170.5	61.8	29.6	γ^1 19.2 γ^2 19.1	
Asp	171.5	50.4	36.7	172.6	

Tabelle 5.39: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von c-(SPLNVD) **10** in DMSO- D_6 , Signalsatz b.

AS	δ/ppm					$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere			
Ser	8.54	4.33	$\beta^{2/3}$ 3.63/3.56	γ n. b.		n. b.	-4.1
Pro		4.66	$\beta^{2/3}$ 2.23/1.50	$\gamma^{2/3}$ 1.93/1.84 $\delta^{2/3}$ 3.41/3.34			
Leu	8.51	4.43	$\beta^{2/3}$ 1.82/1.68	γ 1.64 $\delta^{1/2}$ 0.94/0.86		9.1	-4.3
Asn	8.20	4.10	$\beta^{2/3}$ 2.63/2.46	$\delta^{21/22}$ 7.47/7.04		3.7	-3.9
Val	7.39	3.84	2.21	$\gamma^{1/2}$ 0.86/0.79		6.3	-0.9
Asp	7.10	4.48	$\beta^{2/3}$ 2.63/2.42			6.2	-0.6

Tabelle 5.40: $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten von c-(SPLNVD) **10** in DMSO- D_6 , Signalsatz b.

AS	δ/ppm				
	C	C^{α}	C^{β}	C^{γ}	C^{δ}
Ser	170.3	55.2	61.8		
Pro	172.6	61.0	31.3	22.6	46.9
Leu	n. b.	51.4	39.2	25.2	$\delta^{1/2}$ 24.1/24.0
Asn	173.5	53.6	35.9	171.8	
Val	170.9	60.0	29.7	$\gamma^{1/2}$ 19.5	
Asp	170.7	50.1	35.8	n. b.	

Tabelle 5.41: $^1\text{H-NMR}$ -Daten von c-(S $^{\beta\text{h}}$ PLNID) **11** in DMSO- D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^{α}	H^{β}	andere		
Ser	7.11	4.57	$\beta^{2/3}$ 3.52/3.44	γ n. b.	7.4	0.1
β^{h} Pro		$\alpha^{2/3}$ 2.52/2.17	4.12	$\gamma^{2/3}$ 2.07/1.60 $\delta^{2/3}$ 1.83/1.78 $\varepsilon^{2/3}$ 3.59/3.53		
Leu	7.82	4.25	β^2 1.45 β^3 1.73	γ 1.59 $\delta^{1/2}$ 0.87/0.81	8.8	-3.7
Asn	8.51	4.73	$\beta^{2/3}$ 2.84/2.70	$\delta^{21/22}$ 7.65/7.22	8.0	-3.2
Ile	8.19	3.70	1.74	$\gamma^{12/13}$ 1.44/1.20 γ^2 0.85 δ^1 0.82	3.6	-1.0
Asp	8.16	4.58	β^2 2.53 β^3 2.68		9.2	-2.9

Tabelle 5.42: ^{13}C -NMR-Daten von $c\text{-}(S^{\beta^h}\text{PLNID})$ **11** in DMSO-D_6 .

AS	δ/ppm					
	C	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ϵ
Ser	168.5	53.2	62.2			
$\beta^h\text{Pro}$	172.5	42.9	56.3	34.2	24.3	47.8
Leu	172.4	51.2	40.7	21.3	$\delta^{1/2}$ 24.7/23.8	
Asn	171.3	49.3	39.3	173.5		
Ile	170.7	60.7	35.7	γ^1 25.1 γ^2 15.8	δ^1 12.0	
Asp	170.9	50.6	37.6	172.4		

Tabelle 5.43: ^1H -NMR-Daten von $c\text{-}(\beta^h\text{SPL}^{\beta^h}\text{NID})$ **12** in DMSO-D_6 .

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{HNH}\alpha}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N^{H}	H^α	H^β	andere		
$\beta^h\text{Ser}$	7.46	α^2 2.87 α^3 2.38	4.07	$\gamma^{2/3}$ 3.69/3.39	7.9	-2.7
Pro		4.43	β^2 2.07 β^3 2.07	$\gamma^{2/3}$ 1.84/1.49 $\delta^{2/3}$ 3.44/3.30		
Leu	7.67	4.13	β^2 1.60 β^3 1.54	γ 1.47 $\delta^{1/2}$ 0.88/0.77	7.9	-1.3
$\beta^h\text{Asn}$	7.64	$\alpha^{2/3}$ 2.65/2.30	4.27	$\gamma^{2/3}$ 2.38/2.27 $\epsilon^{21/22}$ 7.65/7.16	8.5	-0.1
Ile	8.34	3.76	1.74	$\gamma^{12/13}$ 1.42/1.24 γ^2 0.88	3.7	-4.2
Asp	8.39	4.46	β^2 2.59 β^3 2.76		7.5	-4.2

Tabelle 5.44: ^{13}C -NMR-Daten von $c\text{-}(\beta^h\text{SPL}^{\beta^h}\text{NID})$ **12** in DMSO-D_6 .

AS	δ/ppm						
	C	C^α	C^β	C^γ	C^δ	C^ϵ	C^ζ
$\beta^h\text{Ser}$	170.2	34.6	48.1	62.2			
Pro	170.5	61.5	31.8	22.8	46.5		
Leu	172.1	52.9	39.6	n. b.	$\delta^{1/2}$ 21.0/15.7		
$\beta^h\text{Asn}$	170.5	37.2	44.3	40.4	173.5		
Ile	171.0	60.2	36.0	γ^1 24.9 γ^2 23.6	12.3		
Asp	171.1	50.9	35.6	173.9			

Tabelle 5.45: ^1H -NMR-Daten von c-(V $^{\beta\text{h}}$ AFLI) **13** in TFE-D₂.

AS	δ/ppm				$^3J_{\text{H}^{\text{NH}\alpha}}/\text{Hz}$	$\frac{\Delta\delta}{\Delta T}/\frac{\text{ppb}}{\text{K}}$
	N ^H	H ^{α}	H ^{β}	andere		
Val	7.85	4.20	2.48	$\gamma^{1/2}$ 1.08/1.00	8.9	-4.7
β^{h} Ala	7.38	α^2 2.32 α^3 2.89	3.87	γ 1.37	—	—
Phe	6.80	4.51	β^2 3.02 β^3 3.02	δ, ϵ, ζ n. b.	6.9	-5.5
Leu	7.46	3.82	β^2 1.41 β^3 1.83	γ 1.07 $\delta^{1/2}$ 0.86/0.81	7.1	-5.3
Ile	7.22	4.05	2.19	$\gamma^{12/13}$ 1.22/0.98 γ^2 1.03 δ 1.59	7.1	-0.2

Tabelle 5.46: ^{13}C -NMR-Daten von c-(V $^{\beta\text{h}}$ AFLI) **13** in TFE-D₂.

AS	δ/ppm						
	C	C ^{α}	C ^{β}	C ^{γ}	C ^{δ}	C ^{ϵ}	C ^{ζ}
Val	172.8	60.4	28.6	$\gamma^{1/2}$ 18.1/16.8			
β^{h} Ala	175.1	40.2	46.8	18.1			
Phe	173.5	55.1	36.4	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Leu	172.4	54.4	37.8	n. b.	$\delta^{1/2}$ 21.6/19.2		
Ile	175.2	61.0	35.5	γ^1 9.4 γ^2 14.5 δ 24.4			

6 Zusammenfassung

Die Kenntnis der Struktur als Basis molekularer Interaktion ist für ein Verständnis der Funktionsweise biologischer Systeme und ein gezieltes Eingreifen in die zugrundeliegenden Erkennungsprozesse unerlässlich. Experimentelle Strukturdaten mit atomarer Auflösung sind die Grundlage eines rationalen Wirkstoffdesigns, ergänzt durch computergestützte *modeling* Techniken. Die NMR-Spektroskopie vermag experimentelle Informationen über die Struktur und Dynamik von Molekülen in Lösung zu liefern. MD-Simulationen ermöglichen ergänzend hierzu ein detailliertes Studium des dem Molekül zugänglichen Konformationsraums, wobei die Berechnungen durch experimentelle Parameter gesteuert und validiert werden können. Durch die Verbindung beider Methoden kann ein Strukturmodell erhalten werden, das die jedem Molekül inhärente Dynamik berücksichtigt.

Die Konformationsanalyse von Peptiden mittels einer Kombination von NMR-Spektroskopie und MD ist die zentrale Thematik dieser Arbeit. Erster Schwerpunkt ist die Etablierung eines Torsionswinkelclusterings im Rahmen einer generellen Überarbeitung des Arbeitsablaufes der Konformationsanalyse. Das Clustering ist der zentrale Schritt der statistischen Analyse einer MD-Simulation oder allgemeiner eines Ensembles von Strukturen. Anhand bestimmter Ähnlichkeitskriterien werden die einzelnen Strukturen in Familien unterteilt. Die Kriterien sollten dabei auf die Fragestellung abgestimmt und zu einer entsprechenden Diskriminierung geeignet sein.

Bei der Betrachtung der Strukturen von Peptiden steht die Sekundärstruktur im Vordergrund, welche durch die Rückgrattorsionswinkel definiert wird. Zu Beginn dieser Arbeit stand für das Clustering lediglich ein Koordinaten-RMSD-Kriterium zur Verfügung. Jedoch besteht zwischen Unterschieden in den Torsionswinkeln und den Atomkoordinaten keine hinreichende Korrelation, um mit einem Clustering bezüglich des einen Kriteriums Aussagen über das andere zu ermöglichen.

Aus dieser Problematik resultierte unmittelbar die Notwendigkeit des Clusterings unter direkter Verwendung der interessierenden Torsionswinkel. Aufbauend auf dem Programmpaket GROMOS++ wurde das Paket TORCL entwickelt, eine Sammlung von PERL-Skripten und -Modulen, die eine automatisierte Analyse und ein Clustering auf Basis beliebig vieler, frei wählbarer Kriterien

ermöglichen. Neben Torsionswinkeln können auch Abstände und Winkel für das Clustering verwendet werden, was im Hinblick auf die Einbeziehung von Pharmakophormodellen besonders interessant ist. Zusätzlich zum Clustering selbst stellt das Programm weitere Funktionen zur Verfügung, wie z. B. Pro-Cluster-Statistik, Identifizierung von Sekundärstrukturen sowie die Analyse von Wasserstoffbrücken, berechneter $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstanten und NOE-Verletzungen je Cluster und im gewichteten Mittel. Neben der Einarbeitung des Torsionswinkelclusterings wurden weitere Verbesserungen am bestehenden Arbeitsablauf vorgenommen, insbesondere die Verwendung von DG/SA zur Generierung der Startstruktur für die MD aus den NOE-Distanzinformationen sowie deutlich längere Simulationszeiten. Alle Simulationen wurden mit GROMOS96 in explizitem Solvens durchgeführt.

Zur Validierung des neuen Konformationsanalyzeschemas wurden Daten von Schumann^[160] und Strijowski^[161] verwendet. Die Ergebnisse der Neuberechnungen wurden den zuvor erhaltenen Strukturvorschlägen gegenübergestellt.

Schumann verwendete ebenfalls ein eigenes Torsionswinkelclustering, dessen genauer Algorithmus nicht publiziert ist, und DG/SA zur Generierung der Startstruktur. Seine MD-Simulationszeiten waren jedoch sehr kurz; teilweise rechnete er im Kontinuum und nicht in explizitem Solvens. Die Strukturen der neu berechneten Peptide c-(RGDf^βL) **1** und c-(RGDfV^βA) **2** sind den von Schumann postulierten Modellen sehr ähnlich. Kleinere Unterschiede führen bei **1** zu einer besseren Übereinstimmung mit den experimentellen Distanzen; von Schumann beobachtete Nebenkongformationen von **2** können als Kontinuumsartefakte identifiziert werden. Die prinzipielle Ähnlichkeit der Ergebnisse gewährleistet eine Vergleichbarkeit der nach dem neuen Verfahren erhaltenen Strukturen mit älteren Modellen, während die Unterschiede eine Verbesserung durch das neue Verfahren belegen.

In besonderer Deutlichkeit zeigt die Anwendung des neuen Verfahrens auf die Peptide c-(rLSKDK) **3**, c-(RISKDK) **4** und c-(RLsKDK) **5**, dass die vorgenommenen methodischen Änderungen erhebliche Fortschritte darstellen. Strijowskis Strukturvorschläge für diese Peptide beruhen auf einem Arbeitsablauf, der ein Koordinaten-RMSD-Kriterium sowie eine subjektiv geprägte Wahl der Startstruktur aus den Ergebnissen einer systematischen Suche beinhaltet. Die Neuberechnung offenbart eine Unterbestimmung der Strukturen durch die NOE, welche zuvor unbemerkt geblieben war. Im Falle von **3** und **4** können zumindest mögliche Vorzugskonformationen identifiziert werden, die sich jedoch fundamental von den Strukturvorschlägen Strijowskis unterscheiden. Hauptgrund ist dessen ungeeignete, subjektive Startstrukturwahl, die im neuen Verfahren durch ein objektives Torsionswinkelclustering der Strukturen aus

der DG/SA-Rechnung ersetzt ist. Auch die Überlegenheit des Torsionswinkelkriteriums wird anhand der KDK-Peptide deutlich: Deren ausgeprägte Rückgratflexibilität ist bei Verwendung eines Koordinaten-RMSD-Kriteriums nicht detektierbar.

Die folgenden wesentlichen Verbesserungen durch das neue Konformationsanalyseschema können festgehalten werden: Implementierung und Verwendung eines geeigneten Clusterings anhand der Rückgrattorsionswinkel, objektive Auswahlkriterien anstelle subjektiver Entscheidungen und somit Gewährleistung der Reproduzierbarkeit, längere Simulation in explizitem Solvens und dadurch bessere Erfassung des Konformationsraumes und Vermeidung von Artefakten.

Zu einer ersten Anwendung gelangt das Verfahren bei der Strukturbestimmung der glykomimetischen Peptide *c*-(LSETT1) **6** und *c*-(RTLPS) **7**, zweier Mimetika des L2/HNK-1-Epitops, die von Bächle im Rahmen seiner Dissertation^[279] synthetisiert wurden. **6** weist zwei komplementäre β -Turns auf, wobei D-Leu und Pro die $i+1$ -Positionen eines β II'-Turns bzw. eines β I-artigen Turns einnehmen. **7** liegt in zwei Konformationen vor, die aus einer *cis/trans*-Isomerie der Leu-Pro-Peptidbindung resultieren. Bei *trans*-Konfiguration (Abbildung 6.1a) werden zwei gegenüberliegende β/γ -Hybridturns ausgebildet, mit Arg und Pro in den $i+1$ -Positionen. Im Falle von *cis*-Konfiguration (Abbildung 6.1b) nimmt Pro die $i+2$ -Position eines β VI-Turns ein; die komplementäre Turnstruktur mit Ser in $i+1$ ähnelt einem β I-Turn und wird von einem γ -Turn überlagert, ebenfalls mit Ser in $i+1$. Ähnlichkeiten bezüglich Rückgratkonformation und Seitenkettenorientierung zwischen **6** und **7a** deuten auf eine mögliche strukturelle Grundlage der Mimikry hin; zur sicheren Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Die räumlichen Strukturen von **6** und **7** können als Leitstrukturen für die weitere Optimierung der Wirksamkeit dienen.

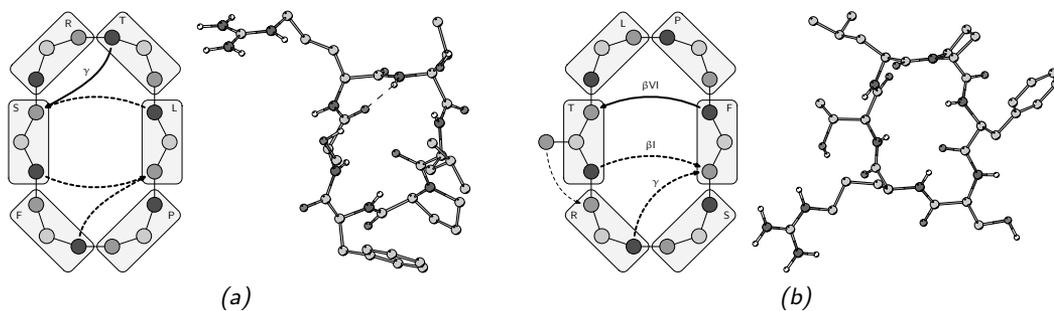


Abbildung 6.1: Lösungsstrukturen von *c*-(RTLPS) **7a** und **7b**.

Die Strukturanalyse der sechs Cyclopeptide c-(SPLND) **8**, c-(SPL^{β^h}ND) **9**, c-(SPLNVD) **10**, c-(S^{β^h}PLNID) **11**, c-(^{β^h}SPL^{β^h}NID) **12** und c-(V^{β^h}AFLI) **13** stellt den zweiten Hauptteil dieser Arbeit dar. Die Peptide wurden von Malešević im Rahmen seiner Dissertation^[299] synthetisiert, um, ausgehend von der Bindungssequenz des VCAM-1, affine Liganden des Integrins $\alpha_4\beta_1$ zu erhalten. Der Auswahl der Peptide liegt das *spatial screening* Konzept für ein indirektes Wirkstoffdesign zugrunde, bei dem die Erkennungssequenz durch den Einsatz von strukturinduzierenden Bausteinen in Cyclopeptiden in verschiedenen strukturellen Umgebungen präsentiert wird, so dass bioaktive Konformationen identifiziert werden können. Als Strukturbildner fanden β -Homoaminoacids Verwendung (β^3 -Aminosäuren mit proteinogenen Seitenketten). Die in dieser Arbeit durchgeführte Konformationsanalyse der Peptide verfolgt zwei Ziele. In erster Linie sollen neue Erkenntnisse über den strukturinduzierenden Einfluss von β^3 -Aminosäuren erhalten werden, der bisher nur in einer Arbeit untersucht wurde, wobei eine Bevorzugung der zentralen Position in $\Psi\gamma$ -Turns gefunden wurde.^[160] Falls möglich soll ferner anhand parallel erfolgender Zelladhäsionsexperimente eine Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen erfolgen.

Die Strukturen des Pentapeptids **13**, das β^h Ala als einzigen Strukturbildner enthält, bestätigt die Präferenz von β^3 -Aminosäuren für die $i+1$ -Position eines $\Psi\gamma$ -Turns. Anhand der beiden Pentapeptide **8** und **9** zeigt sich außerdem die Dominanz der β -Aminosäure gegenüber Pro als zweitem Strukturbildner. **8** nimmt eine Konformation an, bei der Pro die bevorzugte $i+1$ -Position eines β I-artigen Turns einnimmt; gegenüberliegend befindet sich Asp in der zentralen Position eines γ^i -Turns (Abbildung 6.2a). Der Ersatz von Asn durch β^h Asn führt zur Ausbildung einer gänzlich anderen Sekundärstruktur: β^h Asn nimmt die bevorzugte $i+1$ -Position in einem $\Psi\gamma$ -Turn ein, während Pro in $i+2$ eines β VIa-Turns zu finden ist und die Peptidbindung zwischen Ser und Pro *cis*-Konfiguration aufweist (Abbildung 6.2b). Ebenso wie von Schumann gegenüber D-Aminosäuren beobachtet, kann eine β^3 -Aminosäure also auch den Einfluss von Pro aufheben.

Weniger eindeutig ist der Einfluss der β -Homoaminoacids auf die Strukturen der untersuchten Hexapeptide. **10** liegt aufgrund einer Isomerie der Ser-Pro-Peptidbindung in zwei Konformationen vor, wobei jeweils bevorzugte Turns mit Pro in $i+1$ eines β I- (*trans*) bzw. $i+2$ eines β VI-Turns (*cis*) ausgebildet werden. Der Ersatz von Pro durch β^h Pro in **11** bewirkt einen Wechsel zu einer einzelnen Struktur, die β^h Pro in $i+1$ eines $\Psi\beta$ -Turns zeigt. In **12**, das mit β^h Ser und β^h Asn zwei β -Aminosäuren enthält, wird ein γ^i -Turn um Leu und ein β IV-Turn mit Ile und Asp in $i+1$ bzw. $i+2$ ausgebildet. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Einfluss von β -Aminosäuren im Allgemeinen nicht

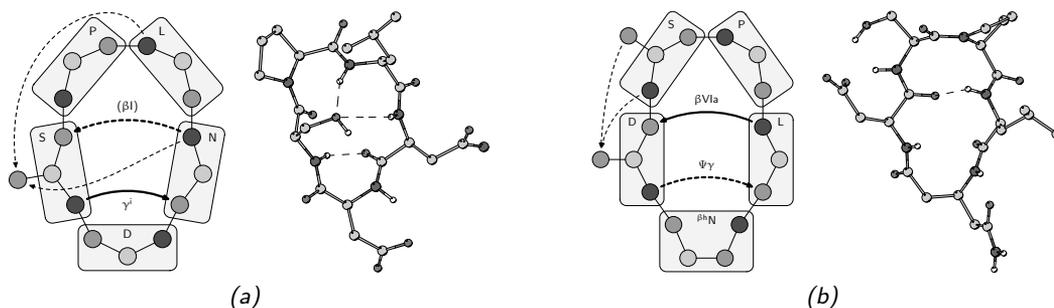


Abbildung 6.2: Lösungsstrukturen von c-(SPLND) **8** (a) und c-(SPL β^h ND) **9** (b).

ausreicht, um in gegenüber Pentapeptiden flexibleren Hexapeptiden gezielt Turnstrukturen zu induzieren. Möglicherweise kann β^h Pro als $\Psi\beta$ -Turnbildner wirken. Die Klärung dieser Frage bedarf der Untersuchung weiterer Modellpeptide.

Ein Vergleich der Strukturen der Peptide **8** bis **12** mit der Röntgenstruktur des VCAM-1 zeigt, dass diese durch die Cyclopeptide, insbesondere durch **8** und **10a** mit RMSD-Werten des Peptidrückgrats der Teilsequenz SPL von 81 pm bzw. 80 pm und ähnlicher Seitenkettenorientierung, teilweise durchaus gut nachgebildet wird. Dennoch zeigt keines der Peptide signifikante Aktivität in Bindungsstudien, ebenso wie eine Reihe weitere Peptide, die auf anderen Teilsequenzen des TQIDSPLN-Motivs von VCAM-1 basieren. Die Gründe sind unklar; wahrscheinlich existieren weitere Determinanten der Bindung außerhalb der den verwendeten Peptiden zugrundeliegenden Sequenz.

Abschließend steht am Ende dieser Arbeit eine wesentlich verbesserte Methodik der Konformationsanalyse, deren Überlegenheit gegenüber älteren Arbeitsabläufen durch einen Vergleich der Ergebnisse gezeigt werden konnte. In der Anwendung für die beschriebenen Strukturaufklärungen hat das Verfahren seine Leistungsfähigkeit unter Beweis gestellt. Dabei wurde die Fähigkeit von β^3 -Aminosäuren zur Induktion von $\Psi\gamma$ -Turnstrukturen in Pentapeptiden und somit die Eignung dieser Bausteine für den Einsatz im gezielten Wirkstoffdesign nachgewiesen. Insbesondere die Erweiterung des Clustering-Algorithmus auf Torsionswinkel und beliebige andere geometrische Parameter ermöglicht neue Einblicke in die strukturelle Dynamik der untersuchten Peptide, mit vielversprechenden Möglichkeiten auch für zukünftige Strukturuntersuchungen.

Literaturverzeichnis

- [1] I. Chambers, J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain, P. R. Harrison, The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA, *EMBO J.* **1986**, *5*(6), 1221–1227.
- [2] F. Zinoni, A. Birkmann, W. Leinfelder, A. Böck, Cotranslational insertion into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*(10), 3156–3160.
- [3] J. F. Atkins, R. Gesteland, Biochemistry. The 22nd amino acid, *Science* **2002**, *296*(5572), 1409–1410.
- [4] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA, *Science* **2002**, *296*(5572), 1459–1462.
- [5] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase, *Science* **2002**, *296*(5572), 1462–1466.
- [6] J. A. Soares, L. Zhang, R. L. Pitsch, N. M. Kleinholz, R. B. Jones, J. J. Wolff, J. Amster, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, The residue mass of L-pyrrolysine in three distinct methylamine methyltransferases, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*(44), 32962–32969.
- [7] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1982, *Biochem. J.* **1984**, *219*(2), 345–373.
- [8] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical conformations of the polypeptide chain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1951**, *37*(4), 205–211.
- [9] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [10] C. Ramakrishnan, G. N. Ramachandran, Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units, *Biophys. J.* **1965**, *5*(6), 909–933.
- [11] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, PROCHECK: 9 program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283–291.
- [12] A. L. Morris, M. W. MacArthur, E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, Stereochemical quality of protein structure coordinates, *Proteins: Struct., Funct., and Genetics* **1992**, *12*(4), 345–364.
- [13] A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia, SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*(4), 536–540.

- [14] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo **1992**.
- [15] K.-C. Chou, Prediction of tight turns and their types in proteins, *Anal. Biochem.* **2000**, *286*(1), 1–16.
- [16] J. S. Richardson, The anatomy and taxonomy of protein structure, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167–339.
- [17] V. Pavone, G. Gaeta, A. Lombardi, F. Natri, O. Maglio, C. Isernia, M. Saviano, Discovering protein secondary structures: Classification and description of isolated α -turns, *Biopolymers* **1996**, *38*(6), 705–721.
- [18] G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, β VI turns in peptides and proteins: A model peptide mimicry, *Proteins: Struct., Funct., and Genetics* **1993**, *15*, 235–251.
- [19] P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, Chain reversals in proteins, *Biochem. Biophys. Acta* **1973**, *303*(2), 211–229.
- [20] E. G. Hutchinson, J. M. Thornton, A revised set of potentials for β -turn formation in proteins, *Protein Sci.* **1994**, *3*(12), 2207–2216.
- [21] W. S. Gulewitsch, S. Amiradzibi, Über das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1902–1903.
- [22] D. W. Roberts, Toxins of entomopathogenic fungi, in H. D. Burges (Herausgeber), *Microbial control of pests and plant diseases 1970–1980*, S. 441–446, Academic Press, London **1981**.
- [23] S. Gupta, S. B. Krasnoff, D. W. Roberts, J. A. A. Renwick, L. S. Brinen, J. Clardy, Structures of the efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolyposcladium niveum*, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*(2), 707–709.
- [24] J. P. Abrahams, S. K. Buchanan, M. J. van Raaij, I. M. Fearnley, A. G. W. Leslie, J. E. Walker, The structure of bovine F_1 -ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*(18), 9420–9424.
- [25] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*(9), 2325–2327.
- [26] J.-N. Denis, A. E. Greene, D. Guénard, F. Guéritte-Voegelein, L. Mangatal, P. Potier, A highly efficient, practical approach to natural taxol, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*(17), 5917–5919.
- [27] R. E. Schwartz, C. F. Hirsch, D. F. Sesin, J. E. Flor, M. Chartrain, R. E. Fromtling, G. H. Harris, M. J. Salvatore, J. M. Liesch, K. Yudin, Pharmaceuticals from cultured algae, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *5*(2-3), 113–123.
- [28] G. Trimurtulu, I. Ohtani, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, L. Demchik, Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(11), 4729–4737.

- [29] T. Golakoti, J. Ogino, C. E. Heltzel, T. L. Husebo, C. M. Jensen, L. K. Larsen, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, S. L. Mooberry, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*(49), 12030–12049.
- [30] T. Golakoti, J. Ogino, C. E. Heltzel, T. L. Husebo, C. M. Jensen, L. K. Larsen, G. M. L. Patterson, R. E. Moore, S. L. Mooberry, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224 *J. Am. Chem. Soc.* 1995, *117*, 12030–12049, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(13), 3323–3324.
- [31] P. Spiteller, F. von Nussbaum, β -amino acids in natural products, in V. Soloshonok, E. Juaristi (Herausgeber), *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids*, S. 19–93, Wiley-VCH **2005**.
- [32] J. Frackenhohl, P. I. Arvidsson, J. V. Schreiber, D. Seebach, The outstanding biological stability of β - and γ -peptides toward proteolytic enzymes: an in vitro investigation with fifteen peptidases, *ChemBioChem* **2001**, *2*(6), 445–455.
- [33] J. V. Schreiber, J. Frackenhohl, F. Moser, T. Fleischmann, H. P. Kohler, D. Seebach, On the biodegradation of β -peptides, *ChemBioChem* **2002**, *3*(5), 424–432.
- [34] J. Kovacs, R. Ballina, R. L. Rodin, D. Balasubramanian, J. Applequist, Poly- β -L-aspartic acid. Synthesis through pentachlorophenyl active ester and conformational studies, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*(1), 119–120.
- [35] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, β -Peptides: From structure to function, *Chem. Rev.* **2001**, *101*(10), 3219–3232.
- [36] S. H. Gellman, Foldamers: A manifesto, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*(4), 171–180.
- [37] D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, β -peptide foldamers: Robust helix formation in a new family of β -amino acid oligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(51), 13071–13072.
- [38] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, G. Guichard, T. Hintermann, B. Jaun, J. L. Matthews, J. V. Schreiber, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, β^2 - and β^3 -peptides with proteinaceous side chains: Synthesis and solution structures of constitutional isomers, a novel helical secondary structure and the influence of solvation and hydrophobic interactions on folding, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*(5-8), 932–982.
- [39] D. Seebach, J. V. Schreiber, S. Abele, X. Daura, W. F. van Gunsteren, Structure and conformation of β -oligopeptide derivatives with simple proteinogenic side chains: Circular dichroism and molecular dynamics investigations, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*(1), 34–57.
- [40] D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, L. Oberer, U. Hommel, R. Amstutz, H. Widmer, Probing the helical secondary structure of short-chain β -peptides, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*(8), 2043–2066.

- [41] D. H. Appella, J. J. Barchi, Jr., S. R. Durell, S. H. Gellman, Formation of short, stable helices in aqueous solution by β -amino acid hexamers, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(10), 2309–2310.
- [42] L. A. Christianson, M. J. Lucero, D. H. Appella, D. A. Klein, S. H. Gellman, Improved treatment of cyclic β -amino acids and successful prediction of β -peptide secondary structure using a modified force field: AMBER*c, *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*(9), 763–773.
- [43] J. J. Barchi, Jr., X. Huang, D. H. Appella, L. A. Christianson, S. R. Durell, S. H. Gellman, Solution conformations of helix-forming β -amino acid homooligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(12), 2711–2718.
- [44] D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, M. R. Richards, D. R. Powell, S. H. Gellman, Synthesis and structural characterization of helix-forming β -peptides: *trans*-2-aminocyclopentanecarboxylic acid oligomers, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(33), 7574–7581.
- [45] D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, D. R. Powell, X. Huang, J. J. Barchi, Jr., S. H. Gellman, Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers, *Nature* **1997**, *387*(6631), 381–384.
- [46] D. Seebach, K. Gademann, J. V. Schreiber, J. L. Matthews, T. Hintermann, B. Jaun, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, ‘Mixed’ β -peptides: A unique helical secondary structure in solution. Preliminary communication, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*(7), 2033–2038.
- [47] T. D. W. Claridge, J. M. Goodman, A. Moreno, D. Angus, S. F. Barker, C. Taillefumier, M. P. Watterson, G. W. J. Fleet, 10-helical conformations in oxetane β -amino acid hexamers, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*(25), 4251–4255.
- [48] S. Abele, P. Seiler, D. Seebach, Synthesis, crystal structures, and modelling of β -oligopeptides consisting of 1-(aminomethyl)cyclopropanecarboxylic acid: Ribbon-type arrangement of eight-membered H-bonded rings, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*(10), 1559–1571.
- [49] S. Krauthäuser, L. A. Christianson, D. R. Powell, S. H. Gellman, Antiparallel sheet formation in β -peptide foldamers: Effects of β -amino acid substitution on conformational preference, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(48), 11719–11720.
- [50] J. Applequist, J. D. Glickson, Conformation of poly- β -alanine in aqueous solution from proton magnetic resonance and deuterium exchange studies, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*(13), 3276–3281.
- [51] H. Bestian, Poly- β -amides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1968**, *7*(4), 278–285.
- [52] J. Masamoto, K. Sasaguri, C. Ohizumi, H. Kobayashi, Polymorphic forms of nylon 3, *J. Polym. Sci. A-2* **1970**, *8*(10), 1703–1711.
- [53] F. Chen, G. Lepore, M. Goodman, Conformational studies of poly[(*S*)- β -aminobutyric acid], *Macromolecules* **1974**, *7*(6), 779–783.
- [54] Y. J. Chung, L. A. Christianson, H. E. Stanger, D. R. Powell, S. H. Gellman, A β -peptide reverse turn that promotes hairpin formation, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(40), 10555–10556.
- [55] D. Seebach, S. Abele, K. Gademann, B. Jaun, Pleated sheets and turns of β -peptides with proteinogenic side chains, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*(11), 1595–1597.

- [56] G. E. Moore, Cramming more components onto integrated circuits, *Electronics Magazine* **1965**, 38(8), 114–117.
- [57] M. J. Lohse, The future of pharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, 19(6), 198–200.
- [58] J. Augen, The evolving role of information technology in the drug discovery process, *Drug Discov. Today* **2002**, 7(5), 315–323.
- [59] M. Tintelnot, P. Andrews, Geometries of functional group interactions in enzyme-ligand complexes: Guides for receptor modelling, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1989**, 3(1), 67–84.
- [60] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, Conformation of cyclic peptides. Principle concepts and the design of selectivity and superactivity in bioactive sequences by ‘spatial screening’, *Pure & Appl. Chem.* **1996**, 68(6), 1201–1205.
- [61] H. Kessler, Konformation und biologische Wirkung von cyclischen Peptiden, *Angew. Chem.* **1982**, 94(7), 509–520.
- [62] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, Pharmacophore refinement of gpIIb/IIIa antagonists based on comparative studies of antiadhesive cyclic and acyclic RGD peptides, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8(6), 709–730.
- [63] F. Schumann, A. Müller, M. Kocsch, G. Müller, N. Sewald, Are β -amino acids γ -turn mimetics? Exploring a new design principle for bioactive cyclopeptides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122(48), 12009–12010.
- [64] J. Moult, A decade of CASP: Progress, bottlenecks and prognosis in protein structure prediction, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15(3), 285–289.
- [65] V. J. Merluzzi, K. D. Hargrave, M. Labadia, K. Grozinger, M. Skoog, J. C. Wu, C. K. Shih, K. Eckner, S. Hattox, J. Adams, A. S. Rosenthal, R. Faanes, F. J. Eckner, R. A. Koup, J. L. Sullivan, Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, *Science* **1990**, 250(4986), 1411–1413.
- [66] E. Fischer, Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- [67] H. J. Bohm, LUDI: Rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, 6(6), 593–606.
- [68] M. C. Lawrence, P. C. Davis, CLIX: A search algorithm for finding novel ligands capable of binding proteins of known three-dimensional structure, *Proteins: Struct., Funct., and Genetics* **1992**, 12(1), 31–41.
- [69] G. Lauri, P. A. Bartlett, CAVEAT: A program to facilitate the design of organic molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8(1), 51–66.
- [70] P. Y. Lam, P. K. Jadhav, C. J. Eyermann, C. N. Hodge, Y. Ru, L. T. Bachelier, J. L. Meek, M. J. Otto, M. M. Rayner, Y. N. Wong, Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors, *Science* **1994**, 263(5145), 380–384.
- [71] E. R. J. A. Schrödinger, An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules, *Phys. Rev.* **1926**, 28, 1049–1070.

- [72] P. A. M. Dirac, Quantum mechanics of many-electron systems, *Proc. R. Soc. London, Series A* **1929**, *123*, 714–733.
- [73] M. Born, J. R. Oppenheimer, Zur Quantentheorie der Molekeln, *Ann. Phys. (Leipzig)* **1927**, *84*, 457–484.
- [74] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman, A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*(16), 1999–2012.
- [75] J. R. Maple, M.-J. Hwang, K. J. Jalkanen, T. P. Stockfisch, A. T. Hagler, Derivation of class II force fields: V. Quantum force field for amides, peptides, and related compounds, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*(4), 430–458.
- [76] A. Vedani, YETI: An interactive molecular mechanics program for small-molecule protein complexes, *J. Comput. Chem.* **1988**, *9*(3), 269–280.
- [77] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi, *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich **1996**.
- [78] W. R. P. Scott, P. H. Hünenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark, S. Billeter, J. Fennen, A. E. Torda, T. Huber, P. Krüger, W. F. van Gunsteren, The GROMOS biomolecular simulation program package, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*(19), 3596–3607.
- [79] M. Christen, P. H. Hünenberger, D. Bakowies, R. Baron, R. Burgi, D. P. Geerke, T. N. Heinz, M. A. Kastenholtz, V. Kräutler, C. Oostenbrink, C. Peter, D. Trzesniak, W. F. van Gunsteren, The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05, *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*(16), 1719–1751.
- [80] M. J. Hwang, T. P. Stockfisch, A. T. Hagler, Derivation of class II force fields. 2. Derivation and characterization of a class II force field, CFF93, for the alkyl functional group and alkane molecules, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(6), 2515–2525.
- [81] N. L. Allinger, K. Chen, J. A. Katzenellenbogen, S. R. Wilson, G. M. Anstead, Hyperconjugative effects on carbon – carbon bond lengths in molecular mechanics (MM4), *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*(5–6), 747–755.
- [82] P. K. Weiner, P. A. Kollman, AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions, *J. Comput. Chem.* **1981**, *2*(3), 287–303.
- [83] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*(3), 765–784.
- [84] J. W. Ponder, D. A. Case, Force fields for protein simulations, *Adv. Protein Chem.* **2003**, *66*, 27–85.
- [85] T. E. Cheatham, III., M. A. Young, Molecular dynamics simulation of nucleic acids: Successes, limitations and promise, *Biopolymers* **2001**, *56*(4), 232–256.

- [86] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.* **1983**, 4(2), 187–217.
- [87] A. D. MacKerell, Jr., B. Brooks, C. L. Brooks, III., L. Nilsson, B. Roux, Y. Won, M. Karplus, CHARMM: The energy function and its parameterization with an overview of the program, in P. v. R. Schleyer (Herausgeber), *The Encyclopedia of Computational Chemistry*, Band 1, S. 271–277, John Wiley & Sons, Chichester **1998**.
- [88] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomos, Groningen **1987**.
- [89] N. L. Allinger, Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99(25), 8127–8134.
- [90] N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J.-H. Lii, Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(23), 8551–8566.
- [91] J. H. Lii, N. L. Allinger, Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 2. Vibrational frequencies and thermodynamics, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(23), 8566–8575.
- [92] J. H. Lii, N. L. Allinger, Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 3. The van der Waals' potentials and crystal data for aliphatic and aromatic hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(23), 8576–8582.
- [93] N. L. Allinger, K. Chen, J.-H. Lii, An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17(5–6), 642–668.
- [94] T. A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17(5–6), 490–519.
- [95] T. A. Halgren, Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17(5–6), 520–552.
- [96] T. A. Halgren, Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17(5–6), 553–586.
- [97] T. A. Halgren, R. B. Nachbar, Merck molecular force field. IV. Conformational energies and geometries for MMFF94, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17(5–6), 587–615.
- [98] T. A. Halgren, Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules, *J. Comput. Chem.* **1996**, 17(5–6), 616–641.
- [99] T. A. Halgren, MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies, *J. Comput. Chem.* **1999**, 20(7), 720–729.
- [100] T. A. Halgren, MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries, *J. Comput. Chem.* **1999**, 20(7), 730–748.

- [101] A. K. Rappé, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, W. M. Skiff, UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*(25), 10024–10035.
- [102] A. Vedani, D. W. Huhta, A new force field for modeling metalloproteins, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*(12), 4759–4767.
- [103] J. Gasteiger, M. Marsili, Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron* **1980**, *36*(22), 3219–3228.
- [104] J. E. Lennard-Jones, Cohesion, *Proc. Phys. Soc.* **1931**, *43*(5), 461–482.
- [105] B. J. Alder, T. E. Wainwright, Phase transition for a hard sphere system, *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*(5), 1208–1209.
- [106] J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus, Dynamics of folded proteins, *Nature* **1977**, *267*(5612), 585–590.
- [107] Y. Duan, P. A. Kollman, Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution, *Science* **1998**, *282*(5389), 740–744.
- [108] R. S. Germain, B. Fitch, A. Rayshubskiy, M. Eleftheriou, M. C. Pitman, F. Suits, M. Giampapa, T. J. C. Ward, Blue matter on blue gene/L: Massively parallel computation for biomolecular simulation, in *Proceedings of the 3rd IEEE/ACM/IFIP international conference on hardware/software codesign and system synthesis*, ACM Press, New York, USA **2005** S. 207–212.
- [109] L. Verlet, Computer “experiments” on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules, *Phys. Rev.* **1967**, *159*(1), 98–103.
- [110] R. W. Hockney, The potential calculation and some applications, in B. Alder, S. Fernbach, M. Rotenberg (Herausgeber), *Methods in Computational Physics, Vol. 9, Plasma Physics*, Academic Press, New York, London **1970**.
- [111] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*(8), 3684–3690.
- [112] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of *n*-alkanes, *J. Comp. Phys.* **1977**, *23*(3), 327–341.
- [113] F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, Nuclear induction, *Phys. Rev.* **1946**, *69*(3-4), 127.
- [114] E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid, *Phys. Rev.* **1946**, *69*(1-2), 37–38.
- [115] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, Weinheim, dritte Auflage **1999**.
- [116] R. R. Ernst, W. A. Anderson, Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*(1), 93–102.
- [117] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR techniques in Organic Chemistry*, Band 19 von *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Pergamon, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapur, Tokyo **1999**.

- [118] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford **1987**.
- [119] F. Bloch, Nuclear induction, *Phys. Rev.* **1946**, *70*(7-8), 460–474.
- [120] R. R. Ernst, Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie (Nobel-Vortrag), *Angew. Chem.* **1992**, *104*(7), 817–836.
- [121] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*(5), 2229–2246.
- [122] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1983**, *53*, 521–528.
- [123] A. Bax, D. G. Davis, Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1985**, *63*, 207–213.
- [124] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chem. Phys. Lett* **1980**, *69*(1), 185–189.
- [125] L. Müller, Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*(16), 4481–4484.
- [126] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum NMR, *J. Magn. Res.* **1983**, *55*, 301–315.
- [127] A. Bax, M. F. Summers, Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*(8), 2093–2094.
- [128] I. Solomon, Relaxation processes in a system of two spins, *Phys. Rev.* **1955**, *99*(2), 559–565.
- [129] S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, Two-dimensional chemical exchange and cross-relaxation spectroscopy of coupled nuclear spins, *J. Magn. Res.* **1981**, *43*, 259–281.
- [130] A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear overhauser effects in the rotating frame, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*(3), 811–813.
- [131] C. Griesinger, R. R. Ernst, Frequency offset effects and their elimination in NMR rotating-frame cross-relaxation spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1987**, *75*, 261–271.
- [132] S. Spera, A. Bax, Empirical correlation between protein backbone conformation and C $^{\alpha}$ and C $^{\beta}$ nuclear magnetic resonance chemical shifts, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*(14), 5490–5492.
- [133] J. Kuszewski, J. Qin, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, The impact of direct refinement against $^{13}\text{C}^{\alpha}$ and $^{13}\text{C}^{\beta}$ chemical shifts on protein structure determination by NMR, *J. Magn. Res.* **1995**, *B106*, 92–96.
- [134] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapur **1986**.
- [135] M. Schubert, D. Labudde, H. Oschkinat, P. Schmieder, A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ^{13}C chemical shift statistics, *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*(2), 149–154.

- [136] N. Sewald, J. Riede, P. Bissinger, K. Burger, A new convenient synthesis of 2-trifluoromethyl substituted aspartic acid and its isopeptides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1992**, S. 267–274.
- [137] V. J. Hruby, The conformations of peptides in solution as determined by NMR spectroscopy and other physical methods, in B. Weinstein (Herausgeber), *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Band 3, p. 53, Marcel Dekker, New York **1974**.
- [138] J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo **1995**.
- [139] D. F. Mierke, A. Geyer, H. Kessler, Coupling constants and hydrogen bonds as experimental restraints in a distance geometry refinement protocol, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*(4), 325–331.
- [140] M. Karplus, Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*(1), 11–15.
- [141] M. Karplus, Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*(18), 2870–2871.
- [142] A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, Calibration of the angular dependence of the amide proton–C $^{\alpha}$ proton coupling constants, $^3J_{\text{HN}\alpha}$, in a globular protein, *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*(3), 741–751.
- [143] D. S. Garrett, J. Kuszewski, T. J. Hancock, P. J. Lodi, G. W. Vuister, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, The impact of direct refinement against three-bond H $^{\text{N}}$ –C $^{\alpha}$ H coupling constants on protein structure determination by NMR, *J. Magn. Res.* **1994**, *B104*, 99–103.
- [144] K. G. R. Pachler, Nuclear magnetic resonance study of some α -amino acids. I. Coupling constants in alkaline and acidic medium, *Spectrochim. Acta* **1963**, *19*, 2085–2092.
- [145] K. G. R. Pachler, Nuclear magnetic resonance study of some α -amino acids. II. Rational isomerism, *Spectrochim. Acta* **1964**, *20*, 581–587.
- [146] A. Glättli, W. F. van Gunsteren, Are NMR-derived model structures for β -peptides representative for the ensemble of structures adopted in solution?, *Angew. Chem.* **2004**, *116*(46), 6472–6476.
- [147] J. L. Markley, A. Bax, Y. Arat, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wüthrich, IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the Standardization of Data Bases of Protein and Nucleic Acid Structures Determined by NMR Spectroscopy: Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 1–23.
- [148] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Abbreviations and symbols for the description of the conformation of polypeptide chains. Tentative rules (1969), *Biochemistry* **1970**, *9*(18), 3471–3479.
- [149] A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, Time-dependent distance restraints in molecular dynamics simulations, *Chem. Phys. Lett* **1989**, *157*(4), 289–294.
- [150] W. R. P. Scott, A. E. Mark, W. F. van Gunsteren, On using time-averaging restraints in molecular dynamics simulations, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*(4), 501–508.

- [151] G. M. Crippen, Distance geometry and conformational calculations, in *Chemometrics Research Studies Series 1*, John Wiley & Sons, New York **1981**.
- [152] G. M. Crippen, T. F. Havel, Distance geometry and molecular conformation, in *Chemometrics Research Studies Series 15*, John Wiley & Sons, New York **1988**.
- [153] S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt, M. P. Vecchi, Optimization by simulated annealing, *Science* **1983**, *220*(4598), 671–680.
- [154] M. Nilges, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms. Circumventing problems associated with folding, *FEBS Letters* **1988**, *239*(1), 129–136.
- [155] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore, The XPLOR-NIH NMR molecular structure determination package, *J. Magn. Res.* **2003**, *160*(1), 65–73.
- [156] A. T. Brünger, *XPLOR Manual Version 3.1*, Yale University Press, New Haven **1993**.
- [157] C. D. Schwieters, G. M. Clore, The VMD-XPLOR visualization package for NMR structure refinement, *J. Magn. Res.* **2001**, *149*(2), 239–244.
- [158] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graphics Modell.* **1996**, *14*(1), 33–38.
- [159] X. Daura, K. Gademann, B. Jaun, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, A. E. Mark, Peptidfaltung: Wenn die Simulation das Experiment erreicht, *Angew. Chem.* **1999**, *111*(1-2), 249–252.
- [160] F. Schumann, *Modifizierung cyclischer RGD-Peptide durch β -Aminosäuren: Konformationsanalyse mittels NMR-Spektroskopie und Molecular Modeling*, Dissertation, Universität Leipzig **1999**.
- [161] U. Strijowski, *Synthese und Konformationsanalyse cyclischer Peptide als potentielle Liganden von Integrinen*, Dissertation, Universität Bielefeld **2004**.
- [162] D. van der Spoel, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, B. Hess, K. A. Feenstra, E. Lindahl, R. van Drunen, H. J. C. Berendsen, *Gromacs User Manual version 3.1*, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands. Internet: <http://www.gromacs.org> **2001**.
- [163] L. D. Schuler, X. Daura, W. F. van Gunsteren, An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase, *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*(11), 1205–1218.
- [164] D. P. Geerke, C. Oostenbrink, N. F. A. van der Vegt, W. F. van Gunsteren, An effective force field for molecular dynamics simulations of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfoxide-water mixtures, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*(4), 1436–1445.
- [165] C. M. Fletcher, D. N. M. Jones, R. Diamond, D. Neuhaus, Treatment of NOE constraints involving equivalent or nonstereassigned protons in calculations of biomolecular structures, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*(3), 292–310.
- [166] W. Kabsch, A solution for the best rotation to relate two sets of vectors, *Acta Cryst.* **1972**, *A32*, 922–923.

- [167] Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: Programs for protein crystallography, *Acta Cryst.* **1994**, *D50*, 760–763.
- [168] P. J. Kraulis, MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **1991**, *24*, 946–950.
- [169] W. L. DeLano, *The PyMOL User's Manual*, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA **2002**.
- [170] L. Torvalds, D. Diamond, *Just for fun: the story of an accidental revolutionary*, Harper Business, New York **2001**.
- [171] L. Lamport, *L^AT_EX: A document preparation system*, Addison Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts **1986**.
- [172] D. E. Knuth, *The T_EXbook*, Addison Wesley Publishing Company, Reading, Menlo Park, Don Mills, Wokingham, Amsterdam, Mexico City, San Juan, Bogotá, Sydney, Santiago, Singapore, Tokyo, Milan, Paris **1986**.
- [173] J. D. Hobby, A user's manual for MetaPost, *Computing Science Technical Report no. 162*, AT&T Bell Laboratories, Murray Hill, New Jersey **1992**.
- [174] D. B. Roegel, METAOBJ: Very high-level objects in MP, *Tugboat* **2002**, *23*(1), 93–100.
- [175] T. Abo, C. M. Balch, A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1), *J. Immunol* **1981**, *127*(3), 1024–1029.
- [176] J. Kruse, R. Mailhammer, H. Wernecke, A. Faissner, I. Sommer, C. Gordinis, M. Schachner, Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1., *Nature* **1984**, *311*(5982), 153–155.
- [177] M. Lipinski, K. Braham, J. M. Caillaud, C. Carlu, T. Tursz, HNK-1 antibody detects an antigen expressed on neuroectodermal cells, *J. Exp. Med.* **1983**, *158*(5), 1775–1780.
- [178] S. Schuller-Petrovic, W. Gebhart, H. Lassmann, H. Rumpold, D. Kraft, A shared antigenic determinant between natural killer cells and nervous tissue, *Nature* **1983**, *306*(5939), 179–181.
- [179] Y. Shioda, H. Nagura, Y. Tsutsumi, K. Shimamura, N. Tamaoki, Distribution of leu-7 (HNK-1) antigen in human digestive organs: an immunohistochemical study with monoclonal antibody, *Histochem. J.* **1984**, *16*(8), 843–854.
- [180] I. Ando, K. Tamaki, HNK-1 antibody reacts with peripheral nerves and sweat glands in the skin, *Br. J. Dermatol.* **1985**, *113*(2), 175–178.
- [181] P. A. Bunn, Jr., I. Linnoila, J. D. Minna, D. Carney, A. F. Gazdar, Small cell lung cancer, endocrine cells of the fetal bronchus, and other neuroendocrine cells express the leu-7 antigenic determinant present on natural killer cells, *Blood* **1985**, *65*(3), 764–768.
- [182] J. M. Lauweryns, L. van Ranst, Leu-7 immunoreactivity in human, monkey, and pig bronchopulmonary neuroepithelial bodies and neuroendocrine cells, *J. Histochem. Cytochem.* **1987**, *35*(6), 687–691.

- [183] M. Uusitalo, T. Kivelä, The HNK-1 carbohydrate epitope in the eye: basic science and functional implications, *Prog. Retin. Eye Res.* **2001**, *20*(1), 1–28.
- [184] M. Grumet, S. Hoffman, C. M. Chuong, G. M. Edelman, Polypeptide components and binding functions of neuron-glia cell adhesion molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81*(24), 7989–7993.
- [185] E. Bock, C. Richter-Landsberg, A. Faissner, M. Schachner, Demonstration of immunochemical identity between the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein and the cell adhesion molecule L1, *EMBO J.* **1985**, *4*(11), 2766–2768.
- [186] A. Faissner, Monoclonal antibody detects carbohydrate microheterogeneity on the murine cell adhesion molecule L1, *Neurosci. Lett.* **1987**, *83*(3), 327–332.
- [187] M. Grumet, V. Mauro, M. P. Burgoon, G. M. Edelman, B. A. Cunningham, Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*(6), 1399–1412.
- [188] R. C. McGarry, S. L. Helfand, R. H. Quarles, J. C. Roder, Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1, *Nature* **1983**, *306*(5941), 376–378.
- [189] S. Sato, H. Baba, M. Tanaka, K. Yanagisawa, T. Miyatake, Antigenic determinant shared between myelin-associated glycoprotein from human brain and natural killer cells, *Biomed. Res.* **1983**, *4*, 489–494.
- [190] E. Bollensen, M. Schachner, The peripheral myelin glycoprotein P₀ expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by neural adhesion molecules, *Neurosci. Lett.* **1987**, *82*(1), 77–82.
- [191] J. Dodd, S. B. Morton, D. Karagogeos, M. Yamamoto, T. M. Jessell, Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons, *Neuron* **1988**, *1*(2), 105–116.
- [192] F. G. Rathjen, J. M. Wolff, R. Frank, F. Bonhoeffer, U. Rutishauser, Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation, *J. Cell Biol.* **1987**, *104*(2), 343–353.
- [193] G. Gennarini, G. Rougon, F. Vitiello, P. Corsi, C. di Benedetta, C. Goridis, Identification and cDNA cloning of a new member of the L2/HNK-1 family of neural surface glycoproteins, *J. Neurosci. Res.* **1989**, *22*(1), 1–12.
- [194] G. J. Snipes, U. Suter, E. M. Shooter, Human peripheral myelin protein-22 carries the L2/HNK-1 carbohydrate adhesion epitope, *J. Neurochem.* **1993**, *61*(5), 1961–1964.
- [195] D. Burger, A. J. Steck, C. C. Bernard, N. Kerlero de Rosbo, Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNK-1 family, *J. Neurochem.* **1993**, *61*(5), 1822–1827.
- [196] M. E. Dieperink, A. O’Neill, C. Magnoni, R. L. Wollmann, R. L. Henrikson, H. A. Zucher-Neely, K. Stefansson, SAG: a Schwann cell membrane glycoprotein, *J. Neurosci.* **1992**, *12*(6), 2177–2185.
- [197] D. D. Mikol, J. R. Gulcher, K. Stefansson, The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate, *J. Cell Biol.* **1990**, *110*(2), 471–479.

- [198] P. Pesheva, A. F. Horwitz, M. Schachner, Integrin, the cell surface receptor for fibronectin and laminin, expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by adhesion molecules, *Neurosci. Lett.* **1987**, *83*(3), 303–306.
- [199] T. Lallier, G. Leblanc, K. B. Artinger, M. Bonner-Fraser, Cranial and trunk neural crest cells use different mechanisms for attachment to extracellular matrices, *Development* **1992**, *116*(3), 531–541.
- [200] M. Grumet, S. Hoffman, K. L. Crossin, G. M. Edelman, Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*(23), 8075–8079.
- [201] A. Faissner, J. Kruse, R. Chiquet-Ehrismann, E. Mackie, The high-molecular-weight J1 glycoproteins are immunochemically related to tenascin, *Differentiation* **1988**, *37*(2), 104–114.
- [202] A. Faissner, A. Scholze, B. Götz, Tenascin glycoproteins in developing neural tissues: only decoration?, *Perspect. Dev. Neurobiol.* **1994**, *2*(1), 53–66.
- [203] V. E. Shashoua, P. F. Daniel, M. E. Moore, F. B. Jungalwala, Demonstration of glucuronic acid on brain glycoproteins which react with HNK-1 antibody, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *138*(2), 902–909.
- [204] S. Bon, K. Méflah, F. Musset, F. Grassi, J. Massoulié, An immunoglobulin M monoclonal antibody, recognizing a subset of acetylcholinesterase molecules from electric organs of *Electrophorus* and *Torpedo*, belongs to the HNK-1 anti-carbohydrate family, *J. Neurochem.* **1987**, *49*(6), 1720–1731.
- [205] P. G. Layer, T. Weikert, R. Alber, Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism, *Cell Tissue Res.* **1993**, *273*(2), 219–226.
- [206] M. Vogel, H. J. Kowalewski, H. Zimmermann, A. Janetzko, R. U. Margolis, H. E. Wollny, Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata* (electric ray) electric organ, *Biochem. J.* **1991**, *278*, 199–202.
- [207] S. Hoffman, G. M. Edelman, A proteoglycan with HNK-1 antigenic determinants is a neuron-associated ligand for cytotactin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*(8), 2523–2527.
- [208] R. K. Margolis, J. A. Ripellino, B. Goosen, R. Steinbrich, R. U. Margolis, Occurrence of the HNK-1 epitope (3-sulfoglucuronic acid) in PC12 pheochromocytoma cells, chromaffin granule membranes, and chondroitin sulfate proteoglycans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *145*(3), 1142–1148.
- [209] A. J. Aletras, N. K. Karamanos, A. Hjerpe, Presence of the HNK-1 epitope (3-sulfoglucuronic acid) on oligosaccharides from squid skin chondroitin proteoglycans and degradation of proteoglycans by proteolytic enzymes, *Biochem. Int.* **1991**, *25*(2), 331–338.
- [210] R. C. Krueger, Jr., A. K. Hennig, N. B. Schwartz, Two immunologically and developmentally distinct chondroitin sulfate proteoglycans in embryonic chick brain, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*(17), 12149–12161.
- [211] N. Maeda, F. Matsui, A. Oohira, A chondroitin sulfate proteoglycan that is developmentally regulated in the cerebellar mossy fiber system, *Dev. Biol.* **1992**, *151*(2), 564–574.

- [212] D. K. Chou, A. A. Ilyas, J. E. Evans, C. Costello, R. H. Quarles, F. B. Jungalwala, Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*(25), 11717–11725.
- [213] D. K. Chou, G. A. Schwarting, J. E. Evans, F. B. Jungalwala, Sulfoglucuronyl-neolacto series of glycolipids in peripheral nerves reacting with HNK-1 antibody, *J. Neurochem.* **1987**, *49*(3), 865–873.
- [214] T. Ariga, T. Kohriyama, L. Freddo, N. Latov, M. Saito, K. Kon, S. Ando, M. Suzuki, M. E. Hemling, K. L. Rinehart, Jr., S. Kusunoki, Characterization of sulfated glucuronic acid containing glycolipids reacting with IgM M-proteins in patients with neuropathy, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*(2), 848–853.
- [215] H. Voshol, C. W. van Zuylen, G. Orberger, J. F. Vliegthart, M. Schachner, Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P₀, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*(38), 22957–22960.
- [216] R. D. Dennis, H. Antonicek, H. Wiegandt, M. Schachner, Detection of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope on glycoproteins and acidic glycolipids of the insect *Calliphora vicina*, *J. Neurochem.* **1988**, *51*(5), 1490–1496.
- [217] M. L. Bajt, B. Schmitz, M. Schachner, B. Zipser, Carbohydrate epitopes involved in neural cell recognition are conserved between vertebrates and leech, *J. Neurosci. Res* **1990**, *27*(3), 276–285.
- [218] G. C. Tucker, H. Aoyama, M. Lipinski, T. Tursz, J. P. Thiery, Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes, *Cell Differ.* **1984**, *14*(3), 223–230.
- [219] R. Martini, Y. Xin, B. Schmitz, M. Schachner, The L2/HNK-1 carbohydrate epitope is involved in the preferential outgrowth of motor neurons on ventral roots and motor nerves, *Eur. J. Neurosci.* **1992**, *4*(7), 628–639.
- [220] R. Martini, M. Schachner, T. M. Brushart, The L2/HNK-1 carbohydrate is preferentially expressed by previously motor axon-associated Schwann cells in reinnervated peripheral nerves, *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7180–7191.
- [221] K. Low, G. Orberger, B. Schmitz, R. Martini, M. Schachner, The L2/HNK-1 carbohydrate is carried by the myelin associated glycoprotein and sulphated glucuronyl glycolipids in muscle but not cutaneous nerves of adult mice, *Eur. J. Neurosci.* **1994**, *6*(12), 1773–1781.
- [222] R. Martini, Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves, *J. Neurocytol.* **1994**, *23*(1), 1–28.
- [223] N. Prasadarao, O. Koul, S. A. Tobet, D. K. Chou, F. B. Jungalwala, Developmental expression of HNK-1-reactive antigens in the rat cerebellum and localization of sulfoglucuronyl glycolipids in molecular layer and deep cerebellar nuclei, *J. Neurochem.* **1990**, *55*(6), 2024–2030.
- [224] D. K. Chou, N. Prasadarao, O. Koul, F. B. Jungalwala, Developmental expression of HNK-1-reactive antigens in rat cerebral cortex and molecular heterogeneity of sulfoglucuronylneolactotetraosylceramide in CNS versus PNS, *J. Neurochem.* **1991**, *57*(3), 852–859.

- [225] M. Vogel, H. Zimmermann, W. Singer, Transient association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase during development of the cat visual cortex, *Eur. J. Neurosci.* **1993**, *5*(11), 1423–1425.
- [226] C. Andressen, S. Arnhold, K. Ashwell, J. K. Mai, K. Addicks, Stage specific glycosylation pattern for lactoseries carbohydrates in the developing chick retina, *Histochem. J.* **1999**, *31*(5), 331–338.
- [227] T. Strelakova, C. T. Wotjak, M. Schachner, Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice, *Mol. Cell Neurosci.* **2001**, *17*(6), 1102–1113.
- [228] G. Pradel, M. Schachner, R. Schmidt, Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish, *J. Neurobiol.* **1999**, *39*(2), 197–206.
- [229] M. Bronner-Fraser, Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1, *Dev. Biol.* **1986**, *115*(1), 44–55.
- [230] M. Vincent, J. P. Thiery, A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system, *Dev. Biol.* **1983**, *103*(2), 468–481.
- [231] M. Bronner-Fraser, Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody, *Dev. Biol.* **1987**, *123*(2), 321–331.
- [232] L. Gorza, S. Schiaffino, M. Vitadello, Heart conduction system: a neural crest derivative?, *Brain Res.* **1988**, *457*(2), 360–366.
- [233] T. Ikeda, K. Iwasaki, I. Shimokawa, H. Sakai, H. Ito, T. Matsuo, Leu-7 immunoreactivity in human and rat embryonic hearts, with special reference to the development of the conduction tissue, *Anat. Embryol.* **1990**, *182*(6), 553–562.
- [234] K. Asakura, D. J. Miller, L. R. Pease, M. Rodriguez, Targeting of IgM_κ antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination, *J. Neurosci.* **1998**, *18*(19), 7700–7708.
- [235] Y. Maeda, J. W. Bigbee, R. Maeda, N. Miyatani, R. G. Kalb, R. K. Yu, Induction of demyelination by intraneural injection of antibodies against sulfoglucuronyl paragloboside, *Exp. Neurol.* **1991**, *113*(2), 221–225.
- [236] A. H. Tatum, Experimental paraprotein neuropathy, demyelination by passive transfer of human IgM anti-myelin-associated glycoprotein, *Ann. Neurol.* **1993**, *33*(5), 502–506.
- [237] K. Ogawa-Goto, Y. Arao, Y. Ito, T. Ogawa, T. Abe, T. Kurata, S. Irie, H. Akauma, Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection, *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 2533–2541.
- [238] S. P. Cole, S. Mirski, R. C. McGarry, R. Cheng, B. G. Campling, J. C. Roder, Differential expression of the leu-7 antigen on human lung tumor cells, *Cancer Res.* **1985**, *45*(9), 4285–4290.

- [239] E. Perentes, L. J. Rubinstein, Immunohistochemical recognition of human nerve sheath tumors by anti-leu 7 (HNK-1) monoclonal antibody, *Acta Neuropathol. (Berl.)* **1985**, 68(4), 319–324.
- [240] E. Perentes, L. J. Rubinstein, Immunohistochemical recognition of human neuroepithelial tumors by anti-leu 7 (HNK-1) monoclonal antibody, *Acta Neuropathol. (Berl.)* **1986**, 69(3–4), 227–233.
- [241] J. J. Rusthoven, J. B. Robinson, A. Kolin, P. H. Pinkerton, The natural-killer-cell-associated HNK-1 (leu-7) antibody reacts with hypertrophic and malignant prostatic epithelium, *Cancer* **1985**, 56(2), 289–293.
- [242] Y. Sato, S. Watanabe, T. Kodama, M. Goto, Y. Shimosato, Stainability of lung cancer cells with leu-7 and okt-9 monoclonal antibodies, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **1985**, 15(3), 537–544.
- [243] Z. A. Wahab, G. L. Wright, Jr., Monoclonal antibody (anti-leu-7) directed against natural killer cells reacts with normal, benign and malignant prostate tissues, *Int. J. Cancer* **1985**, 36(6), 677–683.
- [244] J. M. Caillaud, S. Benjelloun, J. Bosq, K. Braham, M. Lipinski, HNK-1-defined antigen detected in paraffin-embedded neuroectoderm tumors and those derived from cells of the amine precursor uptake and decarboxylation system, *Cancer Res.* **1984**, 44(10), 4432–4439.
- [245] Y. Tsutsumi, Leu-7 immunoreactivity as histochemical marker for paraffin-embedded neuroendocrine tumors, *Acta Histochem. Cytochem.* **1984**, 17, 15–21.
- [246] G. Reifenberger, J. Szymas, W. Wechsler, Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system, *Acta Neuropathol. (Berl.)* **1987**, 74(2), 105–123.
- [247] H. Hall, L. Liu, M. Schachner, B. Schmitz, The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin, *Eur. J. Neurosci.* **1993**, 5(1), 34–42.
- [248] K. E. Dow, S. E. Mirski, J. C. Roder, R. J. Riopelle, Neuronal proteoglycans: biosynthesis and functional interaction with neurons *in vitro*, *J. Neurosci.* **1988**, 8(9), 3278–32889.
- [249] B. Schmitz, M. Schachner, Y. Ito, T. Nakano, T. Ogawa, Determination of structural elements of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope required for its function, *Glycoconj. J.* **1994**, 11(4), 345–352.
- [250] H. Hall, R. Deutzmann, R. Timpl, L. Vaughan, B. Schmitz, M. Schachner, HNK-1 carbohydrate-mediated cell adhesion to laminin-1 is different from heparin-mediated and sulfatide-mediated cell adhesion, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 246(1), 233–242.
- [251] H. Hall, T. Vorherr, M. Schachner, Characterization of a 21 amino acid peptide sequence of the laminin G2 domain that is involved in HNK-1 carbohydrate binding and cell adhesion, *Glycobiol.* **1995**, 5(4), 435–441.
- [252] A. P. Skubitz, P. C. Letourneau, W. Wayner, L. T. Furcht, Synthetic peptides from the carboxy-terminal globular domain of the A chain of laminin: their ability to promote cell adhesion and neurite outgrowth, and interact with heparin and the β_1 integrin subunit, *J. Cell Biol.* **1991**, 115(4), 1137–1148.

- [253] D. Asa, T. Gant, Y. Oda, B. K. Brandley, Evidence for two classes of carbohydrate binding sites on selectins, *Glycobiol.* **1992**, *2*(5), 395–399.
- [254] T. Kanda, M. Yamawaki, T. Ariga, R. K. Yu, Interleukin 1 β up-regulates the expression of sulfoglucuronosyl paragloboside, a ligand for L-selectin, in brain microvascular endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*(17), 7897–7901.
- [255] M. Schachner, R. Martini, H. Hall, G. Orberger, Functions of the L2/HNK-1 carbohydrate in the nervous system, *Prog. Brain. Res.* **1995**, *105*, 183–188.
- [256] L. S. Griffith, B. Schmitz, M. Schachner, L2/HNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P₀, *J. Neurosci. Res* **1992**, *33*(4), 639–648.
- [257] T. Nakano, Y. Ito, T. Ogawa, Total synthesis of a sulfated glucuronic acid containing glycoheptaosyl ceramide, a minor glycolipid isolated from human *cauda equina* tissue, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*(12), 1569–1572.
- [258] A. V. Kornilov, A. A. Sherman, L. O. Kononov, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, Synthesis of 3-*O*-sulfoglucuronyl lacto-*N*-neotetraose 2-aminoethyl glycoside and biotinylated neoglycoconjugates thereof, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*(4), 717–730.
- [259] K. R. Oldenburg, D. Loganathan, I. J. Goldstein, P. G. Schultz, M. A. Gallop, Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*(12), 5393–5397.
- [260] J. K. Scott, D. Loganathan, R. B. Easley, X. Gong, I. J. Goldstein, A family of concanavalin A-binding peptides from a hexapeptide epitope library, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*(12), 5398–5402.
- [261] R. Hoess, U. Brinkmann, T. Handel, I. Pastan, Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3, *Gene* **1993**, *128*(1), 43–49.
- [262] J. Eichler, A. W. Lucka, R. A. Houghten, Cyclic peptide template combinatorial libraries: synthesis and identification of chymotrypsin inhibitors, *Pept. Res.* **1994**, *7*(6), 300–307.
- [263] C. L. Martens, S. E. Cwirla, R. Y.-W. Lee, E. Whitehorn, E. Y.-F. Chen, A. Bakker, E. L. Martin, C. Wagstrom, P. Gopalan, C. W. Smith, E. Tate, K. J. Koller, P. J. Schatz, W. J. Dower, R. W. Barrett, Peptides which bind to E-selectin and block neutrophil adhesion, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*(36), 21129–21136.
- [264] M. A. Johnson, B. M. Pinto, Molecular mimicry of carbohydrates by peptides, *Aust. J. Chem* **2002**, *55*(1-2), 13–25.
- [265] M. A. Westerink, P. C. Giardina, M. A. Apicella, T. Kieber-Emmons, Peptide mimicry of the meningococcal group C capsular polysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*(9), 4021–4025.
- [266] P. Luo, M. Agadjanyan, J. Qiu, M. A. Westerink, Z. Steplewski, T. Kieber-Emmons, Antigenic and immunological mimicry of peptide mimotopes of lewis carbohydrate antigens, *Mol. Immunol.* **1998**, *35*(13), 865–879.

- [267] J. Qiu, P. Luo, K. Wasmund, Z. Steplewski, T. Kieber-Emmons, Towards the development of peptide mimotopes of carbohydrate antigens as cancer vaccines, *Hybridoma* **1999**, *18*(1), 103–112.
- [268] A. Phalipon, A. Folgori, J. Arondel, G. Sgaramella, P. Fortugno, R. Cortese, P. J. Sansonetti, F. Felici, Induction of anti-carbohydrate antibodies by phage library-selected peptide mimics, *Eur. J. Immunol.* **1997**, *27*(10), 2620–2625.
- [269] T. Kieber-Emmons, Peptide mimotopes of carbohydrate antigens, *Immunol. Res.* **1998**, *17*(1-2), 95–108.
- [270] M. Agadjanyan, P. Luo, M. A. Westerink, L. A. Carey, W. Hutchins, Z. Steplewski, D. B. Weiner, T. Kieber-Emmons, Peptide mimicry of carbohydrate epitopes on human immunodeficiency virus, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*(6), 547–551.
- [271] T. Kieber-Emmons, P. Luo, J. Qiu, M. Agadjanyan, L. Carey, W. Hutchins, M. A. Westerink, Z. Steplewski, Peptide mimicry of adenocarcinoma-associated carbohydrate antigens, *Hybridoma* **1997**, *16*(1), 3–10.
- [272] C. Bompard-Gilles, P. Rousseau, P. Rouge, F. Payan, Substrate mimicry in the active center of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex, *Structure* **1996**, *4*(12), 1441–1452.
- [273] D. N. Moothoo, J. H. Naismith, Concanavalin A distorts the β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)-Man linkage of β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 3)-[β -GlcNAc-(1 \rightarrow 2)- α -Man-(1 \rightarrow 6)]-Man upon binding, *Glycobiol.* **1998**, *8*(2), 173–181.
- [274] D. Jain, K. J. Kaur, D. M. Salunke, Plasticity in protein-peptide recognition: crystal structures of two different peptides bound to concanavalin a, *Biophys. J* **2001**, *80*(6), 2912–2921.
- [275] D. Jain, K. J. Kaur, D. M. Salunke, Enhanced binding of a rationally designed peptide ligand of concanavalin A arises from improved geometrical complementarity, *Biochemistry* **2001**, *40*(40), 12059–12066.
- [276] D. Jain, K. J. Kaur, M. Goel, D. M. Salunke, Structural basis of functional mimicry between carbohydrate and peptide ligands of con A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*(3), 843–849.
- [277] N. K. Vyas, M. N. Vyas, M. C. Chervenak, D. R. Bundle, B. M. Pinto, F. A. Quiocho, Structural basis of peptide-carbohydrate mimicry in an antibody-combining site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*(25), 15023–15028.
- [278] M. Simon-Haldi, N. Mantei, J. Franke, H. Voshol, M. Schachner, Identification of a peptide mimic of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope, *J. Neurochem.* **2002**, *83*(6), 1380–1388.
- [279] D. Bächle, *Cyclische Peptide als Glykomimetika für die L2/HNK-1-Erkennungssequenz: Synthese und Oberflächenplasmonresonanzstudien*, Dissertation, Universität Bielefeld **2004**.
- [280] D. Bächle, G. Loers, E. W. Guthöhrlein, M. Schachner, N. Sewald, Glycomimetic cyclopeptides stimulate neurite outgrowth by imitating the HNK-1 trisaccharide epitope **2006**, eingereicht zur Publikation.

- [281] M. Rance, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, Improved spectral resolution in COSY ^1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117*(2), 479–485.
- [282] A. Bax, D. G. Davis, MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. Magn. Res.* **1985**, *65*, 355–360.
- [283] A. J. Shaka, C. J. Lee, A. Pines, Iterative schemes for bilinear operators: Application to spin decoupling, *J. Magn. Res.* **1988**, *77*, 274–293.
- [284] T. D. Goddard, D. G. Kneller, *SPARKY3*, University of California, San Francisco.
- [285] K. Hamano, M. Kinoshita, K. Furuya, M. Miyamoto, Y. Takamatsu, A. Hemmi, K. Tanzawa, Leualacin, a novel calcium blocker from *Hapsidospora irregularis*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, *J. Antibiot.* **1992**, *45*(6), 899–905.
- [286] K. Yoda, H. Haruyama, H. Kuwano, K. Hamano, K. Tanzawa, Conformational analysis of a new cyclic depsipeptide calcium blocker, leualacin, by NMR spectroscopy, *Tetrahedron* **1994**, *50*(22), 6537–6548.
- [287] H. Morita, S. Nagashima, Y. Uchiyumi, O. Kuroki, K. Takeya, H. Itokawa, Cyclic peptides from higher plants. XXVIII. Antitumor activity and hepatic microsomal biotransformation of cyclic pentapeptides, astins, from *Aster tataricus*, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*(5), 1026–1032.
- [288] H. Morita, S. Nagashima, K. Takeya, H. Itokawa, Conformational analysis of an antitumour cyclic pentapeptide, astin B, from *Aster tataricus*, *Tetrahedron* **1994**, *50*(40), 11613–11622.
- [289] H. Yoshioka, K. Nakatsu, M. Sato, T. Tatsuno, The molecular structure of cyclochlorotine, a toxic chlorine-containing cyclic pentapeptide, *Chem. Lett.* **1973**, *2*, 1319–1322.
- [290] V. Pavone, A. Lombardi, X. Yang, C. Redone, B. Di Blasio, Cyclic β -alanyl- β -alanine containing peptides: A new molecular tool for β -turned peptides, *Biopolymers* **1990**, *30*(1-2), 189–196.
- [291] B. Di Blasio, A. Lombardi, X. Yang, C. Pedone, V. Pavone, β -Alanyl- β -alanine in cyclic β -turned peptides, *Biopolymers* **1991**, *31*(10), 1181–1188.
- [292] V. Pavone, A. Lombardi, G. D’auria, M. Saviano, F. Natri, L. Paolillo, B. Di Blasio, C. Redone, β -Alanine containing peptides: A novel molecular tool for the design of γ -turns, *Biopolymers* **1992**, *32*(2), 173–183.
- [293] B. Di Blasio, A. Lombardi, G. D’Auria, M. Saviano, C. Isernia, O. Maglio, L. Paolillo, C. Pedone, V. Pavone, β -Alanine containing peptides: γ -turns in cyclotetrapeptides, *Biopolymers* **1993**, *33*(4), 621–631.
- [294] V. Pavone, A. Lombardi, M. Saviano, B. Di Blasio, F. Natri, R. Fattorusso, O. Maglio, C. Isernia, β -Alanine containing cyclic peptides with predetermined turned structure. V, *Biopolymers* **1994**, *34*(11), 1505–1515.
- [295] V. Pavone, A. Lombardi, M. Saviano, F. Natri, R. Fattorusso, O. Maglio, C. Isernia, L. Paolillo, C. Pedone, β -Alanine containing cyclic peptides with turned structure: The “pseudo type II β -turn.” VI, *Biopolymers* **1994**, *34*(11), 1517–1526.

- [296] A. Lombardi, M. Saviano, F. Nastri, O. Maglio, M. Mazzeo, C. Pedone, C. Isernia, V. Pavone, Unusual conformational preferences of β -alanine containing cyclic peptides. VII, *Biopolymers* **1996**, 38(6), 683–691.
- [297] A. Lombardi, M. Saviano, F. Nastri, O. Maglio, M. Mazzeo, C. Isernia, L. Paolillo, V. Pavone, Solvent-mediated conformational transition in β -alanine containing cyclic peptides. VIII, *Biopolymers* **1996**, 38(6), 693–703.
- [298] M. Malešević, Z. Majer, E. Vass, T. Huber, U. Strijowski, M. Hollósi, N. Sewald, Spectroscopic detection of pseudo-turns in homodetic cyclic penta- and hexapeptides comprising β -homoproline **2006**, angenommen zur Publikation (Int. J. Pept. Res. Ther.).
- [299] M. Malešević, *β -Amino Acids as Secondary Structure Inducers in Peptides*, Dissertation, Universität Bielefeld **2002**.
- [300] U. Strijowski, N. Sewald, Structural properties of cyclic peptides containing *cis*- or *trans*-2-aminocyclohexane carboxylic acid, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2(8), 1105–1109.
- [301] H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, fünfte Auflage **2003**.
- [302] R. O. Hynes, Integrins: a family of cell surface receptors, *Cell* **1987**, 48(4), 549–554.
- [303] R. O. Hynes, Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell* **2002**, 110(6), 673–687.
- [304] M. A. Arnaout, Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response, *Immunol. Rev.* **1990**, 114, 145–180.
- [305] R. O. Hynes, Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* **1992**, 69(1), 11–25.
- [306] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidmimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins für eine neuartige Krebstherapie, *Angew. Chem.* **1997**, 109(13-14), 1440–1456.
- [307] J. M. de Pereda, G. Wiche, R. C. Liddington, Crystal structure of a tandem pair of fibronectin type III domains from the cytoplasmic tail of integrin $\alpha_6\beta_4$, *EMBO J.* **1999**, 18(15), 4087–4095.
- [308] L. T. Duong, G. A. Rodan, Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation, *Front. Biosci.* **1998**, 3, 757–768.
- [309] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$, *Science* **2001**, 294(5541), 339–345.
- [310] T. A. Springer, Folding of the N-terminal ligand-binding region of integrin α -subunits into a β -propeller domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94(1), 65–72.
- [311] C. Lu, C. Oxvig, T. A. Springer, The structure of the β -propeller domain and C-terminal region of the integrin α_M subunit, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273(24), 15138–15147.

- [312] T. A. Springer, H. Jing, J. Takagi, A novel Ca^{2+} -binding β -hairpin loop better resembles integrin sequence motifs than the EF-hand, *Cell* **2000**, *102*(3), 275–277.
- [313] T. Kamata, K. K. Tieu, T. A. Springer, Y. Takada, Amino acid residues in the α_{IIb} subunit that are critical for ligand binding to integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ are clustered in the β -propeller model, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(47), 44275–44283.
- [314] P. Bork, T. Doerks, T. A. Springer, B. Snel, Domains in plexins: links to integrins and transcription factors, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*(7), 261–263.
- [315] J. Takagi, T. A. Springer, Integrin activation and structural rearrangement, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 141–163.
- [316] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science* **2002**, *296*(5565), 151–155.
- [317] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, Integrin signaling, *Science* **1999**, *285*(5430), 1028–1032.
- [318] K. M. Yamada, B. Geiger, Molecular interactions in cell adhesion complexes, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*(1), 76–85.
- [319] F. G. Giancotti, F. Mainiero, Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis, *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, *1198*(1), 47–64.
- [320] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel, Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin conformation and oligomerization, *Biochemistry* **1999**, *38*(44), 14461–14474.
- [321] J. Takagi, H. P. Erickson, T. A. Springer, C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin $\alpha_5\beta_1$, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*(5), 412–416.
- [322] M. H. Ginsberg, A. Partridge, S. J. Shattil, Integrin regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*(5), 509–516.
- [323] D. Boettiger, F. Huber, L. Lynch, S. Blystone, Activation of $\alpha_v\beta_3$ -vitronectin binding is a multistage process in which increases in bond strength are dependent on Y747 and Y759 in the cytoplasmic domain of β_3 , *Mol. Biol. Cell.* **2001**, *12*(5), 1227–1237.
- [324] D. Boettiger, L. Lynch, S. Blystone, F. Huber, Distinct ligand-binding modes for integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediated adhesion to fibronectin versus vitronectin, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(34), 31684–31690.
- [325] K. E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin $\alpha_v\beta_3$, *ChemBioChem* **2002**, *3*(5), 470–473.
- [326] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brünger, H. Kessler, Transmembrane signal transduction of the $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin, *Protein Sci.* **2002**, *11*(7), 1800–1812.
- [327] T. A. Springer, Predicted and experimental structures of integrins and β -propellers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*(6), 802–813.

- [328] A. P. Mould, M. J. Humphries, Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction?, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*(5), 544–551.
- [329] M. J. Humphries, P. A. McEwan, S. J. Barton, P. A. Buckley, J. Bella, A. P. Mould, Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*(6), 313–320.
- [330] E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [331] S. Huang, R. I. Endo, G. R. Nemerow, Upregulation of integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery, *J. Virol.* **1995**, *69*(4), 2257–2263.
- [332] S. Lea, R. Abu-Ghazaleh, W. Blakemore, S. Curry, E. Fry, T. Jackson, A. King, D. Logan, J. Newman, D. Stuart, Structural comparison of two strains of foot-and-mouth disease virus subtype O1 and a laboratory antigenic variant, G67, *Structure* **1995**, *3*(6), 571–580.
- [333] E. Leininger, M. Roberts, J. G. Kenimer, I. G. Charles, N. Fairweather, P. Novotny, M. J. Brennan, Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*(2), 345–349.
- [334] G. Barillari, R. Gendelman, R. C. Gallo, B. Ensoli, The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*(17), 7941–7945.
- [335] B. E. Vogel, S. J. Lee, A. Hildebrand, W. Craig, M. D. Pierschbacher, F. Wong-Staal, E. Ruoslahti, A novel integrin specificity exemplified by binding of the $\alpha_v\beta_5$ integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*(2), 461–468.
- [336] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science* **1987**, *238*(4826), 491–497.
- [337] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1, *FEBS Letters* **1991**, *291*(1), 50–54.
- [338] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*(16), 3033–3040.
- [339] M. J. Briskin, L. M. McEvoy, E. C. Butcher, MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1, *Nature* **1993**, *363*(6428), 461–464.
- [340] M. E. Hemler, C. Huang, Y. Takada, L. Schwarz, J. L. Strominger, M. L. Clabby, Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*(24), 11478–11485.

- [341] E. A. Wayner, A. Garcia-Pardo, M. J. Humphries, J. A. McDonald, W. G. Carter, Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*(3), 1321–1330.
- [342] A. Sharma, J. A. Askari, M. J. Humphries, E. Y. Jones, D. I. Stuart, Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin, *EMBO J.* **1999**, *18*(6), 1468–1479.
- [343] M. J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler, R. R. Robb, VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site, *Cell* **1990**, *60*(4), 577–584.
- [344] T. A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* **1994**, *76*(2), 301–314.
- [345] R. R. Lobb, M. E. Hemler, The pathophysiologic role of α_4 integrins *in vivo*, *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*(5), 1722–1728.
- [346] H. Yusuf-Makagiansar, M. E. Anderson, T. V. Yakovleva, J. S. Murray, T. J. Siahaan, Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*(2), 146–167.
- [347] P. J. Simmons, B. Masinovsky, B. M. Longenecker, R. Berenson, B. Torok-Storb, W. M. Gallatin, Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells, *Blood* **1992**, *80*(2), 388–395.
- [348] G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, Integrin antagonists, *Cell Mol. Life Sci.* **1999**, *56*(5-6), 427–441.
- [349] T. T. Hansel, P. J. Barnes, Novel drugs for treating asthma, *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2001**, *1*(2), 164–173.
- [350] E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1.8 Å resolution, *Nature* **1995**, *373*(6514), 539–544.
- [351] J. H. Wang, R. B. Pepinsky, T. Stehle, J. H. Liu, M. Karpusas, B. Browning, L. Osborn, The crystal structure of an N-terminal two-domain fragment of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1): a cyclic peptide based on the domain 1 C-D loop can inhibit VCAM-1- α_4 integrin interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*(12), 5714–5718.
- [352] J. M. Clements, P. Newham, M. Shepherd, R. Gilbert, T. J. Dudgeon, L. A. Needham, R. M. Edwards, L. Berry, A. Brass, M. J. Humphries, Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin, *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 2127–2135.
- [353] C. Quan, N. J. Skelton, K. Clark, D. Y. Jackson, M. E. Renz, H. H. Chiu, S. M. Keating, M. H. Beresini, S. Fong, D. R. Artis, Transfer of a protein binding epitope to a minimal designed peptide, *Biopolymers* **1998**, *47*(4), 265–275.

- [354] H. H. Chiu, D. T. Crowe, M. E. Renz, L. G. Presta, S. Jones, I. L. Weissman, S. Fong, Similar but nonidentical amino acid residues on vascular cell adhesion molecule-1 are involved in the interaction with $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_4\beta_7$ under different activity states, *J. Immunol* **1995**, 155(11), 5257–5267.
- [355] M. Fioroni, K. Burger, A. E. Mark, D. Roccatano, A new 2,2,2-trifluoroethanol model for molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104(51), 12347–12354.

Sind so kleine Biere, sind so schnell dahin.
Daily Terror, Schmutzige Zeiten (1982)