

# **Molekulare Modellierung von antigenen Peptiden und ihren Komplexen mit polyspezifischen Antikörpern**

Im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin eingereichte

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium

Von

Diplom-Chemiker Tobias Knaute

Geb. am 26. 05. 1969 in Berlin-Buch

Eingereicht am 21. 02. 2002

Gutachter/Gutachterinnen: 1. Prof. H. Oschkinat, FU Berlin

2. Prof. J. Schneider-Mergener, Charité Berlin

Datum der mündlichen Prüfung: 16. 12. 2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
1. 1 BIOLOGISCHER HINTERGRUND .....	8
1. 1. 1 <i>Antikörper und ihre Rolle im Immunsystem</i> .....	8
1. 1. 2 <i>Polyspezifität und Kreuzreaktivität von Antikörpern</i> .....	10
1. 1. 3 <i>Molekulare Bibliotheken als Mittel zur Aufklärung von Protein-Peptid-Wechselwirkungen</i> .....	11
1. 2 STRUKTURELLER HINTERGRUND .....	12
1. 2. 1 <i>Peptide als Bindungspartner von Proteinen</i> .....	12
1. 2. 2 <i>Faltungszustand von Peptiden</i> .....	14
1. 2. 3 <i>Peptid-Design und Konformationsstabilisierung</i> .....	16
1. 3 METHODISCHER HINTERGRUND.....	18
1. 3. 1 <i>Bedeutung und Methoden der Strukturvorhersage bei Peptiden und Proteinen</i> .....	18
1. 3. 2 <i>Kraftfelder</i> .....	20
1. 3. 3 <i>Konformationserzeugung und –sampling</i> .....	21
1. 3. 3 <i>Stochastische globale Optimierung</i> .....	24
1. 3. 4 <i>Docking-Methoden</i> .....	26
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>29</b>
2. 1 STOCHASTISCHE GLOBALE OPTIMIERUNG UND MODELLIERUNG IM INTERNEN KOORDINATENRAUM .....	29
2. 1. 1 <i>Interne Koordinaten</i> .....	29
2. 1. 2 <i>Optimal-Bias Monte-Carlo Minimierung</i> .....	30
2. 1. 3 <i>Klassifizierung der Zufallsschritte und Aufzeichnung der Simulation</i> .....	31
2. 1. 4 <i>Energiepotentiale und Helicitätsunterdrückung</i> .....	33
2. 1. 5 <i>Parametersätze</i> .....	35
2. 1. 6 <i>Allgemeiner Ablauf einer Simulation</i> .....	36
2. 1. 6. 1 <i>Faltungsexperimente</i> .....	38
2. 1. 6. 2 <i>Dockingexperimente</i> .....	38
2. 1. 7 <i>Konformationsanalyse</i> .....	40
2. 2 DESIGN CYCLISCHER PEPTIDE.....	42
2. 3 COMPUTERRESSOURCEN .....	43
2. 4 BINDUNGSSTUDIEN .....	43
2. 4. 1 <i>Kompetitions-ELISA</i> .....	43
2. 4. 2 <i>Substitutionsanalysen</i> .....	44
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>45</b>
3. 1 UMWANDLUNG ANTIGENER CB4-1 PEPTIDEPITOPE DURCH SCHRITTWEISEN AUSTAUSCH.....	45
3. 2 KONFORMATIONSRAUM.....	48
3. 3 KONFORMATIONSANALYSE DER PEPTIDE AUS DEN TRANSFORMATIONSWEGEN H-PEP↔U1-PEP UND H-PEP↔U2-PEP .....	49
3. 3. 1 <i>Transformationsweg h-pep↔u1-pep</i> .....	50
3. 3. 1. 1 <i>Zusammenfassender Vergleich der Konformationsanalysen für die Transformationspeptide zwischen h-pep↔u1-pep</i> .....	62
3. 3. 1. 2 <i>α-Helixbildung im Vergleich der Simulationen mit Vorhersageprogrammen</i> .....	65
3. 3. 2 <i>Transformationsweg h-pep↔u2-pep</i> .....	66
3. 3. 2. 1 <i>Zusammenfassender Vergleich der Konformationsanalysen für die Transformationspeptide zwischen h-pep↔u2-pep</i> .....	75
3. 3. 2. 2 <i>α-Helixbildung im Vergleich der Simulationen mit Vorhersageprogrammen</i> .....	77
3. 4 KONFORMATIONEN EINIGER ANTIGENER PEPTIDE IN CB4-1 KOMPLEXSTRUKTUREN .....	78
3. 4. 1 <i>Komplex von CB4-1 mit GATPEDLNQKL (h-pep)</i> .....	79

3. 4. 2 Komplex von CB4-1 mit DATPEDLNAKL (pepI.2) .....	81
3. 4. 3 Komplex von CB4-1 mit DATPEDLGARL (pepI.4) .....	82
3. 4. 4 Komplex von CB4-1 mit DATPEWLGARL (pepI.5) .....	83
3. 4. 5 Komplex von CB4-1 mit GLYEWGGARIT (u1-pep) .....	84
3. 5 DOCKING-SIMULATIONEN LINEARER PEPTIDE MIT STOCHASTISCHER GLOBALER OPTIMIERUNG .....	85
3. 5. 1 Docking linearer Peptide aus dem Transformationsweg $h-pep \leftrightarrow u1-pep$ .....	85
3. 5. 1. 1 Docking-Simulationen von h-pep an CB4-1 .....	86
3. 5. 1. 2 Docking-Simulationen von pepI.4/pepI.5 an CB4-1 .....	87
3. 5. 1. 3 Docking-Simulationen von u1-pep an CB4-1 .....	88
3. 5. 2 Docking linearer Peptide aus dem Transformationsweg $h-pep \leftrightarrow u2-pep$ .....	90
3. 5. 2. 1 Docking-Simulationen von u2-pep an CB4-1 .....	90
3. 5. 3 Zusammenfassung: Konvergenzschwierigkeiten beim Docking linearer Peptide .....	93
3. 6 DOCKING-SIMULATIONEN KONFORMATIONELL EINGESCHRÄNKTER PEPTIDE .....	94
3. 6. 1 Docking-Simulationen tAb2-bindender, cyclischer Peptide .....	95
3. 6. 1. 1 Docking von SHFNEYE und cyclo(N $\alpha$ -C $\delta_7$ )-SHFNEYE an tAb2 .....	96
3. 6. 1. 2 Docking von SHFNDEYE, cyclo(N $\alpha$ -C $\delta_7$ )-SHFNDEYE und cyclo(S $\gamma_2$ -S $\gamma_8$ )-GCSEFNDC an tAb2 .....	97
3. 6. 2 Design und Docking von homo- und heterodetischen cyclischen CB4-1 bindenden Peptiden .....	98
3. 6. 2. 1 Design der cyclischen u1-pep Analoga .....	99
3. 6. 2. 2 Docking-Simulationen der homodetischen cyclischen Analoga an CB4-1 .....	100
3. 6. 2. 3 Docking-Simulationen der heterodetischen cyclischen Analoga an CB4-1 .....	104
3. 6. 2. 4 Variation der Ringplanarität durch den Einfluß von Abstandsresiduen .....	105
3. 6. 2. 5 Bindungsstudien der cyclischen u1-pep Analoga .....	108
3. 7 SIMULATIONEN AN CYCLISCHEN UND LINEAREN TE33-BINDENDEN PEPTIDEN .....	110
3. 7. 1 Bindungsmodus des Wildtyp-Epitops im Komplex mit TE33 .....	110
3. 7. 2 Vorzugskonformation des lineares Phagenpeptids .....	112
3. 7. 3 Vorhersage des Komplexes von TE33 mit dem cyclischen Phagenpeptid cyclo(S $\gamma_7$ -S $\gamma_{11}$ )-CNQLFNTPPSC (cycI-pep) .....	114
3. 7. 4 Kritischer Vergleich mit abgeleiteten TE33-bindenden linearen und cyclischen Peptiden .....	117
3. 7. 4. 1 Längenanalysen von cycI-pep, dessen linearisierter Variante und einem Hybridpeptid aus cycI-pep und dem Wildtyp-Peptid .....	117
3. 7. 4. 2 Substitutionsanalysen von linearisierten und cyclischen cycI-pep und Wildtyp-Varianten .....	119
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>123</b>
4. 1 CB4-1 BINDENDE TRANSFORMATIONSPEPTIDE: SCHLÜSSELAMINOSÄUREN, VORZUGSKONFORMATION UND ENTROPIE .....	123
4. 2 SUBSTITUTIONSANALYSEN, SEQUENZLANDSCHAFTEN UND BINDUNGSKONTINUUM .....	128
4. 3 MODELLIERUNG VON ANTIKÖRPER-KOMPLEXEN MIT LINEAREN PEPTIDEN: KONFORMATIONÄNDERUNGEN UND MULTIPLE BINDUNGSMODI .....	130
4. 3. 1 Das Modell des CB4-1 Komplexes mit u2-pep FDKEWNLIEQN .....	134
4. 4 MODELLIERUNG VON ANTIKÖRPERKOMPLEXEN MIT KONFORMATIONELL EINGESCHRÄNKTEN PEPTIDEN .....	136
4. 4. 1 Das Modell des Komplexes von TE33 mit dem cycI-pep cyclo(S $\gamma_7$ -S $\gamma_{11}$ )-CNQLFNTPPSC .....	138
4. 5 POLYSPEZIFITÄT UND KREUZREAKTIVITÄT .....	140
4. 6 GRENZEN DER MOLEKULARMODELLIERUNG FÜR DIE KOMPLEX-STRUKTURVORHERSAGE .....	142
4. 7 EINSCHRÄNKUNG DES KONFORMATIONSRUAUMES DURCH CYCLISIERUNG .....	145
4. 8 WIRKSTOFFENTWICKLUNG: RATIONELLES DESIGN VS. EMPIRISCHE ENTDECKUNG .....	147
4. 9 SCHLUBFOLGERUNGEN .....	148
<b>5. LITERATUR .....</b>	<b>151</b>

## Abkürzungen

ACS	antibody combining site
BPTI	Boviner Pankreas Trypsin-Inhibitor
CD	Circular dichroismus
CDR	complementarity determining region
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECEPP	Empirical conformational energy program for peptides
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F <sub>ab</sub>	Fragment der Antigenbindung
F <sub>v</sub>	Variables Fragment
F <sub>c</sub>	Constantes Fragment
HATU	o-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HIV-1	human immunodeficiency virus type I
ICM	Internal Coordinate Mechanics
MC	Monte Carlo
MD	Moleküldynamik
MHC	major histocompatibility complex
MHz	Megahertz
NMR	Nukleare Magnetresonanz
OppA	Oligopeptid-bindendes Protein A
p24	Capsidprotein des HI-Virus
PBS	Phosphate buffer saline
PDB	Protein Data Base
PDZ-Domäne	post synaptic density, disc large, zonula occludens-Domäne
PPII-Helix	Polyprolin-Helix Typ II
RMSD	Root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
SAS	Solvent accessible surface
SH2/SH3-Domäne	Src Homology-Domäne
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

## Zusammenfassung

Polyspezifität von Antikörpern, also die hochspezifische differentielle Erkennung verschiedener Epitope, wird als auslösender Faktor bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie Rheuma und Asthma diskutiert. Über die strukturellen Voraussetzungen dieses biologischen Phänomens ist bislang wenig bekannt; einzig für den Antikörper CB4-1 gibt es hochaufgelöste Röntgenkristallstrukturen von Komplexen mit nicht verwandten Peptidepitopen. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, in wieweit Strukturvorhersagen von Antikörper-Peptid-Komplexen mittels Molekularmodellierung geeignet sind, polyspezifisches Bindeverhalten zu charakterisieren.

Als Modellsysteme für die Komplex-Strukturvorhersage durch globale stochastische Optimierung wurden drei monoklonale Antikörper gewählt: der anti-p24 (HIV-1) Antikörper CB4-1, der eine Reihe sequentiell ähnlicher sowie unähnlicher Peptide bindet; der anti-TGF $\alpha$  Antikörper tAb2, der neben dem linearen Wildtyp-Epitop verwandte cyclische Peptide erkennt; und der anti-Choleratoxinpeptid 3 Antikörper TE33, dessen Polyspezifität erst kürzlich mit Bindern einer Phagenbibliothek bewiesen wurde. Er bindet sowohl nicht verwandte lineare als auch cyclische Epitopeptide.

In einem ersten Schritt wurden die Konformationslandschaften der linearen, von CB4-1 erkannten Epitope durch Modellierung der ungebundenen 11-meren Peptide analysiert, wobei ein Zusammenhang zwischen diesen und den Konformationen der gebundenen Peptide in bekannten Komplexstrukturen gefunden wurde, der einen Einfluß auf die Affinität vermuten läßt. Auf diese Ergebnisse aufbauend wurden dann Antikörperkomplexe mit linearen Peptiden modelliert und mit bekannten Röntgenkristallstrukturen verglichen. Dabei zeigte sich, daß die globalen Konformationssuche-Simulationen in Gegenwart des Antikörpers Ergebnisse lieferten, die nur in Ausnahmefällen mit der gesuchten Struktur übereinstimmten. Darüber hinaus war die Konvergenz mehrerer unabhängiger, von verschiedenen Zufallskonformationen des gleichen Peptids ausgehender Simulationen in struktureller Hinsicht generell sehr schlecht. Nur für ein lineares Peptid, dessen Komplexstruktur bislang nicht bekannt ist, konvergierten wiederholte Monte-Carlo-Rechnungen in einer ähnlichen Konformationsfamilie.

Die Simulationskonvergenz wird mutmaßlich durch die sehr große Anzahl von Freiheitsgraden linearer Peptide erschwert. Durch Cyclisierung kann aber der Konformationsraum von Peptiden erheblich verkleinert werden. Ist daher die Vorhersage von Komplexstrukturen konformationell eingeschränkter Peptide mit größerer Verifizierbarkeit zu erreichen?

Diese Frage wurde an der publizierten dreidimensionalen Struktur des Antikörpers tAb2 im Komplex mit einem 7-meren, lactamcyclisierten Peptid überprüft. Wiederum ausgehend von

zufällig erzeugten Konformationen, lieferten die stochastischen Simulationen dieses Peptids und homo- bzw. heterodetisch verknüpfter Homologa mit sehr guter Konvergenz Peptidstrukturen, die der bekannten in hervorragender Näherung entsprachen.

In Erweiterung dieses Resultates sollten cyclische Peptide mit einer größeren Anzahl von Residuen innerhalb des Ringes getestet werden. Da es keine Kristallstrukturen von Antikörperkomplexen mit größeren, aus natürlichen Aminosäuren bestehenden Peptidcyclen gibt, wurde am Computer eine Reihe von cyclischen Analoga eines 11-meren linearen Templatpeptid konstruiert, dessen quasi-cyclische Konformation in der Bindungstasche des Antikörpers CB4-1 hochaufgelöst beschrieben ist. Bei der Vorhersage der Komplexstrukturen dieser sechs Disulfid- und Lactamcyclen konnte mit befriedigender Wiederholbarkeit die antizipierte Gesamtkonformation der linearen Vorlage ermittelt werden. Zusätzlich wurde mit biochemischen Bindungsstudien nachgewiesen, daß die konstruierten Analoga mit vergleichbarer Affinität und unter Beteiligung identischer funktioneller Gruppen an CB4-1 binden.

Die gegenüber linearen Peptiden erhöhte Wahrscheinlichkeit, auch bei größeren Peptidcyclen die gebundene Konformation korrekt zu identifizieren, wurde schließlich genutzt, um die Komplexstruktur eines cyclischen, aus einer Phagenbibliothek ermittelten Peptids mit 11 Aminosäuren vorzuschlagen, das an den Antikörper TE33 bindet und keine Sequenzverwandtschaft mit dessen Wildtyp-Epitop aufweist. Die in unabhängigen Simulationen ohne Vorbeeinflussung wiederholt aufgefundene Struktur des Peptids im Komplex zeigt eine hervorragende Übereinstimmung mit dem Substituierbarkeitsmuster des Peptids. Im Vergleich mit der bekannten Komplexstruktur des linearen Wildtyp-Peptids ist bei sehr unterschiedlichen individuellen Kontakten eine überraschend ähnliche Gesamtkonformation des cyclischen Binders erkennbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine relativ verlässliche Strukturvorhersage von Antikörper-Komplexen durch globale stochastische Optimierung nur mit konformationell eingeschränkten Peptiden möglich ist unter der Maßgabe, daß sich keine gravierenden Konformationsänderungen beim Bindungspartner ergeben. Aus den gewonnenen Daten wird deutlich, daß polyspezifisches Bindeverhalten von Antikörpern letztlich nur auf atomarer Ebene begriffen werden kann. Eine Abhängigkeit von der Sequenz des Binders ist nur insofern erkennbar, als diese ein räumlich-sterisches Arrangement von Atomgruppen ermöglicht, das unter Berücksichtigung dynamischen Verhaltens zur Bindung führen kann. Unterschiedliche Peptidsequenzen können ähnliche Kontaktflächen hervorbringen und somit ähnliche Paratopresiduen erkennen; gleiche Gesamtkonformationen gebundener Peptide müssen andererseits auch bei Sequenzähnlichkeit nicht zu ähnlichen Wechselwirkungen führen.

## Abstract

Antibody polyspecificity, i. e. the highly specific differential recognition of various epitopes, has been implicated in the onset of autoimmune diseases such as asthma and rheumatism. Little is established about the structural prerequisites that drive this biological phenomenon; only for the monoclonal antibody CB4-1 high resolution X-ray structures of complexes with non-related peptide epitopes are known. The aim of this work is to investigate the applicability of antibody-peptide complex structure prediction by means of molecular modeling for the characterization of polyspecific binding behaviour.

Three monoclonal antibodies were chosen as model systems for complex structure prediction by global stochastic optimization: the anti-p24 (HIV-1) antibody CB4-1 that binds to a number of sequentially related as well as unrelated peptides; the anti-TGF $\alpha$  antibody tAb2 which besides its linear wild type epitope also recognises similar cyclic peptides; and the anti-cholera toxin peptide 3 antibody TE33 whose polyspecificity was only recently demonstrated with ligands derived from a phage display library. The latter one binds not only to non-related linear but also to cyclic peptid epitopes.

In a first step, the conformational landscapes of the linear epitopes recognised by CB4-1 were analysed by modeling the unbound 11-meric peptides. Here, a correlation to the conformations of the antibody-bound species in known complex structures can be identified which leads to assumptions about its influence on the binding affinity. Extending these findings, antibody complexes with linear peptides were modelled and compared with published X-ray crystal structures. The results show that global conformational search simulations in the presence of the antibody yield solutions that only in exceptional cases superimpose tolerably with the target structure. Moreover, convergence of several independent simulations of the same peptide, each starting from a different random conformation, was generally very poor in structural terms. Only for one linear peptide, whose complex structure is yet unknown, repeated Monte Carlo calculations converged in a similar conformational cluster.

Simulation convergence is supposedly hampered by the vast number of degrees of freedom associated with linear peptides. The conformational space of peptides can be substantially reduced by means of cyclization. Therefore, can complex structure prediction of conformationally constrained peptides be achieved with greater verifiability?

The published three-dimensional structure of the antibody tAb2 in complex with a 7-meric lactam-circularized peptid was used to address this question. Again starting from randomly

generated conformations, stochastic simulations of this peptide as well as homodetic and heterodetic cyclic homologues yielded structures that were in excellent agreement with the expected one while exhibiting very good convergence.

To validate this result, cyclic peptides with a larger number of residues within the ring structure had to be tested. Since no X-ray structures of antibody complexes with bigger peptide cycles containing all-natural residues are known, a number of cyclic analogues of an 11-meric linear peptide were constructed on-screen. The template peptide has been described in high resolution as exhibiting a quasi-cyclic conformation in the binding pocket of the antibody CB4-1. Complex structure predictions of the six disulfide and lactam-bridged analogues were able to identify the anticipated overall conformation with satisfying reproducibility. In addition, biochemical binding studies provided evidence that the constructed analogs bind to CB4-1 with comparable affinity while using identical functional groups.

The bound conformation of a cyclic peptide can be predicted with higher probability compared to linear entities even when modeling bigger ring sizes. This potential was used to suggest the complex structure of a cyclic 11-meric peptide binding to the antibody TE33 that was identified from a phage display library and shares no sequence similarity with the wild type epitope. The peptide complex structure found repeatedly in unbiased independent simulations displays an excellent consistency with the amino acid substitution pattern. Compared to the published complex structure of the linear wild type peptide, a surprisingly similar overall conformation of the cyclic binder is discernible in spite of very different individual contacts.

In conclusion it can be stated that a reliable structure prediction of antibody complexes by global stochastic optimization is feasible only for conformationally constrained peptides under the condition that no substantial antibody conformation change occurs upon binding. The data provided emphasize that polyspecific binding behaviour of antibodies is comprehensible only on the atomic level. The sequence of the binder merely provides a spatially and sterically restrictive framework of atom groups that can lead to a binding event if the dynamic behaviour is considered. Different peptide sequences can produce similar contact areas thus recognizing similar paratop regions; identical overall conformations of bound peptides do not indicate identical interactions even when the binders are closely related in sequence.

## Lebenslauf

Name	Tobias Knaute
Geburtsdatum	26. Mai 1969
Geburtsort	Berlin-Buch
Adresse	Simplonstr. 59, 10245 Berlin
Juni 1987	Abitur
Sept. 1987 – Mai 1989	Grundwehrdienst
Sept. 1989 – Sept. 1994	Studium der Chemie an der Technischen Universität Dresden und der Humboldt- Universität zu Berlin
Jan. - Sept. 1994	Anfertigung der Diplomarbeit bei der Fa. Hoffmann-La Roche (Basel) Titel der Diplomarbeit: „NMR-spektroskopische Strukturuntersuchungen an zellulärem Retinsäure bindendem Protein Typ II (CRABP II)“
Sept. 1994	Abschluß als Diplom-Chemiker, Gesamtnote „sehr gut“
Aug. – Dez. 1993 & Sept. – Dez. 1994	Praktikum bei der Fa. Hoffmann-La Roche zu biostrukturellen Anwendungen der NMR- Spektroskopie
Jan. – Juni 1995	Sprachschule in Galway (Irland)
Juni – Nov. 1995	Mitarbeit bei Hedge School International in Calcutta (Indien)
Nov. 1996 – Nov. 1997	Freier künstlerischer und pädagogischer Mitarbeiter beim Veranstaltungshaus „Würfel“ in Berlin
Seit Nov. 1997	Anfertigung der Dissertation am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der FU Berlin und im Institut für Medizinische Immunologie der Charité (HU Berlin)

## **Danksagung**

Für die Übernahme der Betreuung dieser Dissertation möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Hartmut Oschkinat bedanken.

Für die Überlassung des Promotionsthemas danke ich Herrn Prof. Jens Schneider-Mergener sehr.

Des weiteren bin ich vielen weiteren Kollegen zu Dank verpflichtet. Da eine Rangfolge der Hilfeleistungen, Unterstützungen und Ratschläge unmöglich von mir zu rechtfertigen ist, gebe ich ihre Namen in alphabetischer Reihenfolge an, ohne indessen mir der Vollständigkeit dieser Liste sicher zu sein:

Prof. Ruben Abagyan, Sarah Bhargava, Prisca Boisguerin, Dr. Liying Dong, Annette Hayungs, Berit Hoffmann, Dr. Ulrich Hoffmüller, Dr. Michael Hahn, Prof. Wolfgang Höhne, Dr. Achim Kramer, Ines Kretschmar, Christiane Landgraf, Dr. Brian Marsden, Livia Otte, Michael Portwich, Dr. Ulrich Reineke, Dr. Rolf-Dietrich Stigler, Florian Töpert, Dr. Maxim Totrov, Dr. Rudolf Volkmer-Engert

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 21. 02. 2002

Tobias Knaute

### Teile der Ergebnisse dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Hoffmüller, U., Knaute, T., Hahn, M., Höhne, W., Schneider-Mergener, J. und Kramer, A. (2000). "Evolutionary transition pathways for changing peptide ligand specificity and structure." *Embo J.* **19**: 4866-4874.

### Weitere Veröffentlichungen zum Zeitpunkt der Disputation:

Otte, L., Knaute, T., Schneider-Mergener, J. und Kramer, A. (2002). „Molecular basis for the binding polyspecificity of an anti-cholera toxin peptide 3 monoclonal antibody.“ *zur Veröffentlichung eingereicht bei: Journal of Immunology.*

Töpert, F., Knaute, T., Guffler, S., Pires, J. R., Matzdorf, T., Oschkinat, H. und Schneider-Mergener, J. (2002). "A large array of synthetic WW domain variants reveals new ligand binding specificities." *zur Veröffentlichung angenommen in: Angewandte Chemie.*

Bhargava, S., Licha, K., Knaute, T., Ebert, B., Becker, A., Grötzinger, C., Hassenius, C., Wiedenmann, B., Schneider-Mergener, J. und Volkmer-Engert, R. (2002). "A complete substitutional analysis of VIP for better tumor imaging properties." *J. Mol. Recognit.* **15**: 145-153.

Görisch, H., Keitel, T., Diehl, A., Knaute, T., Dauter, Z. und Höhne, W. (2000). "Structural properties of homodimeric quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*". in: *Biochemistry and Molecular Biology of Vitamin B6 and PQQ-dependent Proteins*. Ed.: A. Iriarte, H. M. Kagan und M. Martinez-Carrion. Basel, Birkhäuser Verlag.

Keitel, T., Diehl, A., Knaute, T., Stezowski, J. J., Höhne, W. und Görisch, H. (2000). "X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity." *J. Mol. Biol.* **297**: 961-974.

Kramer, A., Stigler, R. D., Knaute, T., Hoffmann, B. und Schneider-Mergener, J. (1998). "Stepwise transformation of a cholera toxin and a p24 (HIV-1) epitope into D-peptide analogs." *Protein Eng.* **11**: 941-948.