

Filaggrin-Peptide mit β -Haarnadel-Struktur binden Rheuma-Antikörper**

Sabrina Fischer und Armin Geyer*

Abstract: In ELISA-Tests zur Früherkennung von rheumatoider Arthritis (RA) dienen synthetische Filaggrin-Peptide als Antigene für rheumaspezifische Autoantikörper („anti-citrullinated peptide antibody“, ACPA). Hier wird ein Peptid vorgestellt, welches das Bindungsepitop von ACPA in Form einer stabil faltenden β -Haarnadel-Struktur präsentiert. NMR-Spektroskopie belegt die Homogenität der Faltung des Peptids, und so kann erstmals ein Strukturvorschlag für die antikörpergebundene Konformation des Epitops erstellt werden.

Bei der Diagnose von rheumatoider Arthritis (RA) kommen citrullinierte Peptide zum Einsatz, da diese in der Lage sind, selektiv an eine Gruppe von Autoantikörpern („anti-citrullinated peptide antibody“, ACPA) zu binden, die bereits im frühen Stadium der RA im Körper gebildet werden. Van Venrooij et al. haben gezeigt, dass sich der Abschnitt 303–324 der humanen Filaggrin-Sequenz für die Antikörper-Erkennung eignet, wobei das Vorhandensein der nichtkanonischen Aminosäure Citrullin im Peptid essentiell ist.^[1,2] Ein Ergebnis dieser Arbeiten war ein als Disulfidcyclisiertes Derivat dieser Peptidsequenz, welches eine bessere Bindung an ACPA zeigte und in dem kommerziell erhältlichen CCP-ELISA-Test zu Früherkennung von RA verwendet wird.^[3] Die Sequenz dieses als cfc1-cyc (1) bezeichneten Peptids ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Spezifität dieser Tests liegt bei 89–98%, während die Empfindlichkeit für eine etablierte RA in verschiedenen Studien Werte zwischen 41 und 87% angegeben werden.^[3–6] Inzwischen wurden zwei weitere Generationen der CCP-ELISA-Tests mit verschiedenen citrullinierten Peptiden als Targets entwickelt, welche die Empfindlichkeit der Tests erhöhen.^[7–9] Es gilt als gesichert, dass Citrullin durch die Harnstofffunktion das für die Antikörperbindung essenzielle Hapten trägt, weil Mutationen mit der isosteren Aminosäure Arginin nicht erkannt werden.^[1,2,10] Über die Geometrie der Bindung konnte bisher nur spekuliert werden, da das Cyclopeptid 1 keine erkennbare Vorzugskonformation aufweist. Wenn bereits die Makrocyclisierung durch ein Disulfid zur Erhöhung der Antikörperbindung führt, dann gilt es zu untersuchen, ob die weitere strukturelle Restriktion des Epitops zu einem weiteren Gewinn an Selektivität und Affinität führt.

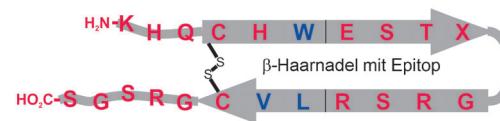
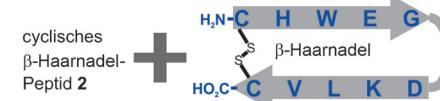
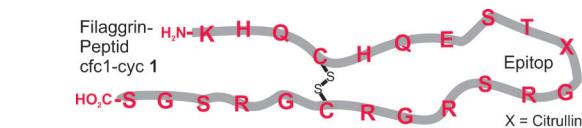


Abbildung 1. Konzept zur Bildung chimärer Filaggrin-Peptide durch Kombination des Antikörper-Bindungsepitops von cfc1-cyc (1) mit den stabilisierenden Eigenschaften der cyclischen β -Haarnadel-Struktur 2. Durch die Mutation von nur drei Aminosäuren der Filaggrin-Sequenz 1 erhält man chimäre Filaggrin-Peptide 3.

Peptidliganden werden von Proteinen oft in einer β -Schleifen-Konformation („ β -turn“) gebunden, was für antikörperbindende Peptide ebenfalls zu erwarten ist.^[11–13] So liegt es nahe, das Epitop eines antikörperbindenden Peptids in einer β -Schleife innerhalb einer konformativ stabilen β -Haarnadel-Struktur („ β -hairpin“) zu präsentieren. Es gibt unterschiedliche Strategien, um Peptide in konformativ homogene Strukturen zu lenken. Die Verwendung einer D-Aminosäure stabilisiert eine β -Schleife.^[14] Das Konzept, Struktur und biologische Aktivität in einem Peptid zu vereinen, wurde bereits von Kessler et al. anhand von Integrin-bindenden RGD-Pentapeptiden vorgestellt.^[15,16] Ein D-Pro-L-Pro-Strukturmotiv wurde als Schleifen-Mimetikum verwendet, um biologisch aktiven Peptiden eine definierte Konformation zu geben.^[17] Vor allem für β -Haarnadel-Strukturen gibt es eine Reihe von Dipeptid-Mimetika, die eine β -Schleife bilden und die Faltung zur Haarnadelstruktur induzieren oder stabilisieren, wie etwa Hot=Tap, welches eine Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelt.^[18]

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die stabilisierenden Wechselwirkungen eines Haarnadel-Motivpeptids als Strukturmotiv auf eine biologisch aktive Sequenz, hier Filaggrin, übertragbar sind. Als Modellpeptid dient die konformativ einheitlich faltende, disulfidverbrückte

[*] S. Fischer, Prof. A. Geyer

Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: geyer@staff.uni-marburg.de

[**] Wir danken Dr. Y. Röttger und Dr. M. Gold (Arbeitsgruppe Prof. R. Dodel, Neurologische Klinik, Philipps-Universität Marburg) für die Unterstützung bei der Durchführung der Dot-Blot- und ELISA-Experimente sowie D. Brödje (Universitätsklinikum Marburg) für humanes ACPA.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309873> zu finden.

β -Haarnadel-Struktur von Cochran et al. Große Dispersion der chemischen Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum, Wasserstoffbrücken und eindeutige Seitenkettenrotamere kennzeichnen dieses cyclische 10er-Haarnadelpeptid Bhp HV (**2**).^[19] Dagegen zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des Filaggrin-Peptids **1** alle Anzeichen schneller konformativer Mittelung: geringe Dispersion der chemischen Verschiebung und gemittelte Kopplungskonstanten. Dabei ist die Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Peptiden auffällig. Durch nur drei Mutationen lässt sich das sechs Aminosäuren umfassende und stabilisierende Strukturmotiv von Modellpeptid **2** in das Filaggrin-Peptid **1** integrieren. Über die Bestimmung der Bindungsaffinität dieser konformativ einheitlichen Peptide könnte das bevorzugte Bindungsmotiv von ACPA aufgeklärt werden. Die zur Untersuchung der Antikörper-Peptid-Wechselwirkung geeigneten, modifizierten Filaggrin-Peptide sind Gegenstand dieser Arbeit.

In dem β -Haarnadel-Peptid **2** (Sequenz in Abbildung 1) bilden die Seitenketten von His² und Trp³ hydrophobe Wechselwirkungen zu den gegenüberliegenden Seitenketten von Leu⁸ und Val⁹. Die stabilisierende Wirkung des Trp³-Leu⁸-Paars in **2** auf eine β -Haarnadel-Struktur wurde bereits in Substitutionsstudien gezeigt.^[20] Zusätzlich bewirkt eine Wechselwirkung zwischen Val⁹ und der Disulfidbrücke eine lokale Stabilisierung der Verdrillung des Peptidrückgrats.^[19] An diese jeweils drei hydrophoben oder aromatischen Aminosäuren des N- und C-Terminus schließen sich Glu⁴ und das gegenüberliegende Lys⁷ an. In vergleichbarer relativer Anordnung (Abbildung 1) befinden sich Glu⁷ und Arg¹⁴ von **1**. Vervollständigt man nun den hydrophoben Cluster durch die drei Mutationen Gln⁶→Trp, Gly¹⁵→Leu und Arg¹⁶→Val, so können die stabilisierenden Effekte der Haarnadelstruktur **2** auf die Filaggrin-Sequenz übertragen werden und sich eine stabile β -Haarnadel bilden.

Die strukturelle Charakterisierung der chimären Filaggrin-Peptide erfolgte an Cyclopeptiden, welche um die unstrukturierten Aminosäuren außerhalb des makrocyclischen Rings verkürzt wurden. Das cyclische 14er-Peptid CHWESTXGRSRLVC (**4**, X = Citrullin) wurde in wässrigem Phosphatpuffer (50 mmolar, pH 7.0) gelöst, um eine native Faltung zu ermöglichen. Der auffälligste Unterschied zwischen dem gefalteten Peptid **4** und dem nichtstrukturierten **1** ist die große Signaldispersion im ^1H -NMR-Spektrum. Dies gilt für die Methylgruppen bei ca. 1 ppm, welche durch die aromatischen Aminosäuren stark abgeschirmt und bis zu ca. –0.3 ppm hochfeldverschoben werden. Auch die Amid-NH-Signale verdoppeln den Bereich der chemischen Verschiebungen, den sie überdecken, auf ca. 1.5 ppm. (Abbildung 2). Dieser Effekt ist erst nach der Oxidation zum Disulfid zu beobachten, da die Disulfidbrücke für die Faltung des Peptids essenziell ist.

Um festzustellen, ob die Faltung durch nur eine dieser drei Mutationen oder durch die Kombination der drei Aminosäuren Trp, Leu und Val stabilisiert wird, wurden die Peptide **5**, **6** und **7** (Tabelle 1) mit jeweils einer Rückmutation synthetisiert. Sowohl die Dispersion der Amidprotonen als auch die Abschirmung der Leu ^{δMe} zeigen, dass jede einzelne der drei einen wesentlichen Anteil an der Faltung hat. Den geringsten Einfluss auf die Konformation des Peptids hat die

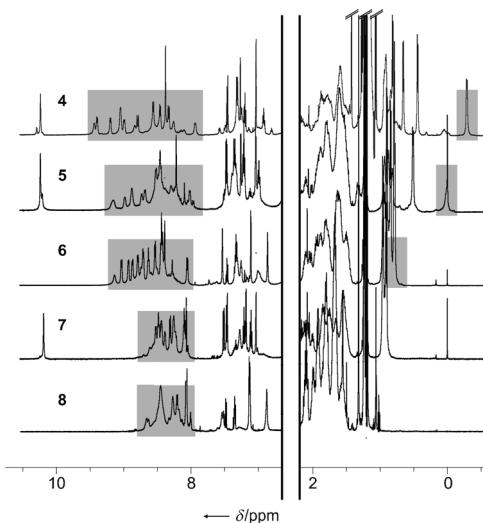


Abbildung 2. ^1H -NMR-Spektren der Peptide **4–8** (600 MHz, 280 K, Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1). Gezeigt sind Hochfeld- und Tieffeld-Bereiche der Spektren, um die Abnahme der Signaldispersion von **4** zu **8** darzustellen. Die Stabilität der gebildeten Haarnadelstruktur wurde über die Signaldispersion im Amidbereich, sowie die Hochfeldverschiebung der Leucin-Methylgruppe (jeweils in grau markiert) definiert. **4** zeigt die größte Dispersion, während bei **7** und **8** keine Vorzugskonformation mehr erkennbar ist. Die Gesamtspektren sind in den Hintergrundinformationen abgebildet.

Tabelle 1: Charakterisierung der Peptidfaltung durch Signaldispersion im ^1H -NMR-Spektrum.

Peptid ^[a]	$\delta(\text{Leu}^{\delta\text{Me}})$ [ppm] ^[b]	$\Delta\delta(\text{NH})$ [ppm] ^[c]
CHWESTXGRSRLVC (4)	–0.28	1.60
CHWESTXGRSRLC (5)	0.02	1.24
CHQESTXGRSRLVC (6)	0.79	1.15
CHWESTXGRSRLGVC (7)	–[e]	0.67
CHQESTXGRSRLGRC (8) ^[d]	–[e]	0.70

[a] Sequenzen der über Disulfide cyclisierten Peptide. Fettdruck markiert Mutationen gegenüber **4**. X = Citrullin [b] Chemische Verschiebung δ der Hochfeld-Leucin-Methylgruppe. [c] Dispersion der chemischen Verschiebung δ im Amidbereich. [d] Native Filaggrin-Sequenz. [e] Kein Leu in der Sequenz.

Rückmutation von Val¹⁶ zu Arg in Peptid **5**, während das Fehlen von Leu¹⁵ in Peptid **7** dazu führt, dass im ^1H -NMR-Spektrum nur noch eine geringe Dispersion erkennbar ist (Tabelle 1, Abbildung 2). Die Rückmutation von Trp⁶ zu Gln in Peptid **6** lässt hingegen noch eine Faltung zu. Die Konformation des Peptids beruht demnach vor allem auf der Disulfidbrücke und der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Trp⁶ und Leu¹⁵.

Der verlangsamte $\beta\text{I}'/\beta\text{II}'$ -Wechsel der Schleife in der starren Haarnadel-Struktur von **4** führt zur Austauschverbreiterung der Amidprotonen von Cit¹⁰ und Gly¹¹. Mit den Aminosäuren Ala (Peptid **9**) und D-Ala (Peptid **10**) an der Position von Gly¹¹ wird jeweils eine β -Schleifen-Struktur energetisch begünstigt, wobei D-Ala, wie eingangs erwähnt, eine $\beta\text{II}'$ -Schleife bildet.^[18] Während das D-Ala-Peptid die gleiche Dispersion im ^1H -NMR-Spektrum zeigt wie **4**, führt die Mutation zu Ala an dieser Position zu einer deutlich ge-

ringeren Dispersion. Da bei **4** im Unterschied zur α -Ala-Mutante das Amidprotonensignal des Gly in $i+2$ -Position stark verbreitert ist, kann man davon ausgehen, dass bei **4** keine einheitliche Schleifenstruktur ausgebildet wird, sondern vielmehr ein schneller Konformationswechsel zwischen β I'- und β II'-Schleife stattfindet.

Aus der Signaldispersion allein lässt sich jedoch noch keine Konformation bestimmen. Kennzeichnend für eine β -Haarnadel ist die Abfolge von Wasserstoffbrücken (WB), die zwischen gegenüberliegenden Paaren von Aminosäuren gebildet oder nicht gebildet werden, was eine alternierende Abfolge von extern und intern orientierten NH-Protonen innerhalb der Peptidsequenz bedingt. Diese führt zu unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten der chemischen Verschiebung der Amidprotonen im ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 3). Während die Amidprotonensignale der WB-bildenden Aminosäuren einen kleinen Temperaturgradienten

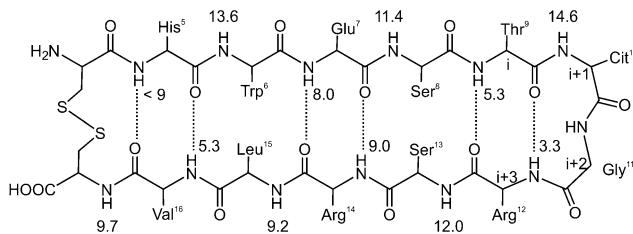


Abbildung 3. Darstellung des β -Haarnadel-Peptids **4**, wobei die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Amidprotonen im ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 280–310 K, Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)/ D_2O 9:1) angegeben ist (in ppb K^{-1}). Die Amidprotonen der WB-bildenden Aminosäuren weisen im ^1H -NMR-Spektrum eine geringere Temperaturabhängigkeit auf.^[21] Der höchste (14.6 ppb K^{-1}) und der niedrigste Wert (3.3 ppb K^{-1}) werden für die Aminosäuren in der Schleife beobachtet. Weitere Details im Text.

zeigen (3.3 bis 9.0 ppb K^{-1}), weisen die Signale der nicht-WB-bildenden Aminosäuren einen großen Temperaturgradienten auf (9.2 bis 14.6 ppb K^{-1} , Abbildung 3). Diese alternierende Abfolge von Amidprotonen mit kleiner und großer Temperaturabhängigkeit im ^1H -NMR-Spektrum wird in dieser Form nur in β -Faltblatt-artigen Strukturen gefunden und ist daher typisch für eine β -Haarnadel-Struktur.

Detaillierte geometrische Parameter der β -Haarnadel-Struktur von **4** wurden aus den NOE-Kontakten im NOESY-NMR-Spektrum (600 MHz, 280 K, Mischzeit: 100 ms) ermittelt. Hierbei konnten NOE-Kontakte zwischen den Seitenkettenprotonen über die beiden Stränge der β -Haarnadel hinweg beobachtet werden. Es sind nur Kontakte innerhalb der WB-bildenden oder nicht-WB-bildenden Aminosäuren sichtbar, welche in einer β -Faltblattstruktur jeweils auf der gleichen Seite des Peptidrückgrats zu finden sind. Dies lässt sich schematisch in einer Zickzack-Struktur darstellen, wobei die Aminosäuren oberhalb des Rückgrats die WB-bildenden darstellen, während diejenigen unter dem Rückgrat die nicht-WB-bildenden sind (Abbildung 4).

Auffällig ist die große Zahl an charakteristischen NOE-Kontakten zwischen den N-terminalen Aminosäuren Cys, His und Trp sowie den C-terminalen Aminosäuren Cys, Val und

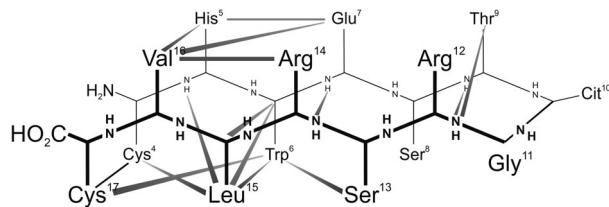


Abbildung 4. Strukturelle NOE-Kontakte in **4** (aus NOESY-Spektrum, 600 MHz, 280 K, Phosphatpuffer (50 mM, pH 7)/ D_2O 9:1). Die Zickzack-Darstellung der β -Haarnadel-Struktur veranschaulicht, welche Aminosäurereste sich innerhalb der Struktur gegenüberstehen und zeigt alle WB-bildenden Aminosäuren oberhalb des Peptidrückgrats. NOE-Kontakte zwischen den Haarnadelsträngen sind nur sichtbar, wenn beide Aminosäuren oberhalb oder unterhalb des Peptidrückgrats liegen. In dieser Darstellung sind beispielsweise von Leu¹⁵ NOE-Kontakte zu fast allen räumlichen Nachbarn unterhalb der Haarnadel vorhanden. Die meisten NOE-Kontakte werden innerhalb des Cochran-Strukturmotivs beobachtet.

Leu. Die Stabilisierung einer cyclischen β -Haarnadel-Struktur durch ein Val-His-Paar in Nachbarschaft zu einem Disulfid wurde bereits für CX₈C-Peptide beschrieben.^[19] Zusätzlich können zwischen Val und His ebenso wie zwischen Leu und Trp hydrophobe Wechselwirkungen stattfinden, die eine weitere Stabilisierung der Struktur bewirken. Diese sechs Aminosäuren wirken in der Struktur wie eine Klammer, welche die übrige Peptidkette unabhängig davon, dass es sich um eine längere Kette handelt als bei **2**, in eine β -Schleifen-Geometrie lenken.

Zusätzlich zu den NOE-Kontakten ist die Bestimmung des hauptsächlich vorliegenden Seitenkettenrotamers ein unabhängiger geometrisch aussagekräftiger Parameter. Dazu erfolgt die prochirale Zuordnung der β -Methylengruppen. Zur weiteren Charakterisierung der Konformation wurden, soweit möglich, die Seitenkettenrotamere der einzelnen Aminosäurereste ermittelt (Tabelle 2). Hierzu wurden die 3J -Kopplungen zwischen α - und β -Protonen aus den ^1H - oder 2D-NMR-Spektren bestimmt und der Abstand zwischen α -bzw. Amidproton und den β -Protonen aus dem NOESY-

Tabelle 2: Diastereotope Zuordnung der β -Protonen sowie Bestimmung des hauptsächlich vorliegenden Rotamers um den Winkel χ_1 der einzelnen Aminosäuren in der β -Haarnadel-Struktur **4**.

Aminosäure ^[a]	$\beta\text{H}^{\text{b}[b]}$	$\beta\text{H}^{\text{t}[c]}$	χ_1
Cys ⁴	proS	proR	-60°
His ⁵	proR	proS	+60°
Trp ⁶	proR	proS	-60°
Glu ⁷	proR	proS	-60°
Thr ⁹			-60°
Cit ¹⁰	proS	proR	180°
Arg ¹²	proR	proS	-60°
Leu ¹⁵	proS	proR	-60°
Val ¹⁶			180°
Cys ¹⁷	proR	proS	-60°

[a] Reihenfolge der Aminosäuren entsprechend der Sequenz in **4**. Für Ser⁸, Ser¹³ und Arg¹⁴ konnte keine Bestimmung durchgeführt werden, da Spinsysteme höherer Ordnung vorliegen. [b] Chemische Verschiebung δ des Hochfeld- β -Protons der jeweiligen Aminosäure. [c] Chemische Verschiebung δ des Tieffeld- β -Protons der jeweiligen Aminosäure.

Spektrum ermittelt. Unter der Annahme, dass nur drei energetisch günstige Rotamere auftreten ($\chi_1 = -60^\circ, 180^\circ, 60^\circ$), lassen sich die Seitenkettenkonformationen eindeutig zuordnen. Auffällig, aber charakteristisch für das Cochran-Motiv, ist vor allem die Konformation des His⁵, welches den sterisch ungünstigsten χ_1 -Winkel von $+60^\circ$ einnimmt. Der Imidazolrest ist zur Isopropylgruppe des Val¹⁶ hin orientiert, was für eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen diesen beiden Seitenketten spricht. Sogar die Konformation um den χ_2 -Winkel des His⁵ ist eindeutig bestimmbar, da vom $\delta 2$ -Protons des Imidazolrings nur NOE-Kontakte zur Seitenkette von Glu⁷ und vom $\epsilon 1$ -Proton nur zu Val¹⁶ sichtbar sind. Ebenfalls sind der Indolring des Trp⁶ und die Leu¹⁵-Seitenkette zueinander ausgerichtet.

Auf der Basis NMR-spektroskopischer Daten wurde ein Strukturmodell erstellt und eine Moleküldynamiksimulation mit HyperChem durchgeführt.^[22] Die energieminiimierte Struktur ist in Abbildung 5 gezeigt.

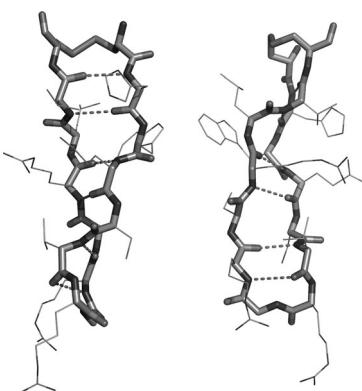


Abbildung 5. Zwei Ansichten des Strukturmodells der verdrillten β -Haarnadel-Struktur von **4** basierend auf NOE-Kontakten zwischen Peptidrückgrat und Seitenkettenprotonen. Die Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptidrückgrat sind gestrichelt dargestellt. Val¹⁶-/His⁵- sowie Leu¹⁵-/Trp⁶-Seitenketten sind jeweils zueinander hin orientiert. Die Citrullin-Seitenkette in der Schleife ist vom Peptidrückgrat weg gedreht und steht aus der gesamten Peptidstruktur heraus.

Die erhaltenen spektroskopischen Daten des verkürzten Filaggrin-Peptids **4** stimmen mit denen von **3** im Bereich des Cyclus überein, während für die N- und C-terminalen Aminosäuren eine geringe Dispersion sichtbar ist. Dies lässt darauf schließen, dass der über ein Disulfid cyclisierte Abschnitt 4–17 von **3** ebenfalls einen definierten β -Haarnadel bildet, während die N-terminalen Aminosäuren 1–3 und die C-terminalen 15–22 keine Vorzugskonformation zeigen. Die chemische Verschiebung der mit **2** identischen Aminosäuren Cys⁴, His⁵, Trp⁶ und Leu¹⁵, Val¹⁶, Cys¹⁷ sowie die Seitenkettenrotamere entsprechen den von Cochran publizierten Daten für **2**. Die Konformation der CX₈C-Haarnadel-Struktur **2** ist demnach auch in der CX₁₂C-Haarnadelstruktur **3** existent und die Faltung des Modellpeptids somit auf größere Makrocyclen übertragbar.

Nun galt es zu klären, ob das Filaggrin-Peptid **3** trotz der für die stabile Faltung notwendigen Mutationen noch eine biologische Aktivität zeigt. Um dies zu untersuchen, wurden **1** und das chimäre Filaggrin-Peptid **3** in einer Dot-Blot-

Analyse auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und mit Biotin-konjugiertem ACPA (α -CCP, polyklonal, Kaninchen) inkubiert; anschließend wurde die Antikörperbindung mit HRP-konjugiertem Streptavidin detektiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Bindung der Filaggrin-Peptide an ACPA im Dot-Blot Assay. Als Negativkontrolle wurde das Ornithin-Peptid **13** verwendet.

Peptid ^[a]	Bindung an ACPA ^[b]
KHQCHQUESTXGRSRGRGSGS (1)	+++
KHQCHWESTXGRSRLVCGRSGS (3)	+++
KHQCHWESTXaRSRLVCGRSGS (11)	–
KHQCHQUESTXaRSRGRCGRSGS (12)	+
KHQCHWESTOGRSRLVCGRSGS (13)	–
KHQCHWESTXGRSRLICGRSGS (14)	++
KHQCHQUESTXGKSKGKGRSGS (15)	+
KHQAHCESTXGRSRRCAGRSGS (16)	++

[a] Sequenzen der über Disulfide cyclisierten Peptide. X=Citrullin.

[b] Die Anzahl der + beschreibt die Intensität des Dot-Blot-Signals.

Es zeigte sich, dass das mutierte Peptid **3** eine zu **1** vergleichbare Affinität aufweist. Die β -Haarnadel-Konformation von **3** hat demnach keinen negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität, was die Hypothese stützt, dass citrullinierte Peptide bei der Bindung an ACPA eine β -Schleifenartige Struktur ausbilden.

Die Dot-Blots der Peptide sind in den Hintergrundinformationen abgebildet. Erwähnenswert sind die Ergebnisse der D-Ala¹¹-Mutante von **3** (**11**) sowie der D-Ala¹¹-Mutante von **1** (**12**). Wie bereits beschrieben, zeigte **11** eine Faltung zur β -Haarnadel, während bei **12** keine Vorzugskonformation gebildet wird. Beide Peptide zeigten jedoch unabhängig von ihrer Struktur eine geringere Bindung an ACPA als **1** und **3**. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die Harnstoffgruppe des Citrullins essenziell für die Antikörpererkennung ist, sondern dass die beiden Aminosäuren Cit-Gly als terminale Schleife einer β -Haarnadel von dem Antikörper gebunden werden. Offenbar führt die lokale Stabilisierung der Schleifenstruktur durch eine D-Aminosäure zur Verringerung der Bindungsaffinität. Die hierdurch induzierte β II'-Schleife weist eine für die Antikörperbindung ungünstige starre Geometrie auf, während die Cit-Gly-Schleife durch schnellen Wechsel zwischen β I' und β II' die optimale Konformation für die Bindung einnehmen kann.

Aus den Dot-Blots wurde eine Vorauswahl der Peptide getroffen, welche zur Quantifizierung der Antikörperbindung gegen humanes ACPA in einem ELISA getestet wurden. Dazu wurden diese Peptide kovalent auf 96er-Titerplatten gebunden, mit ACPA inkubiert (α -CCP, polyklonal, human) und mit HRP-konjugiertem Anti-Human-IgG-Antikörper detektiert (Abbildung 6). Die Peptide **1** und **3** zeigen eine vergleichbare Bindung an den humanen Antikörper, wohingegen die D-Ala¹¹-Mutante von **1** (**12**) und die Orn¹⁰-Mutante von **3** (**13**) fast nicht von ACPA detektiert werden. Ob die unterschiedliche Erkennung der D-Ala¹¹-Mutante von **3** (**11**) durch die verschiedenen Antikörper mit der lokalen Stabilisierung der β -Schleife erklärbar ist, werden Experimente mit weiteren Peptiden zeigen.

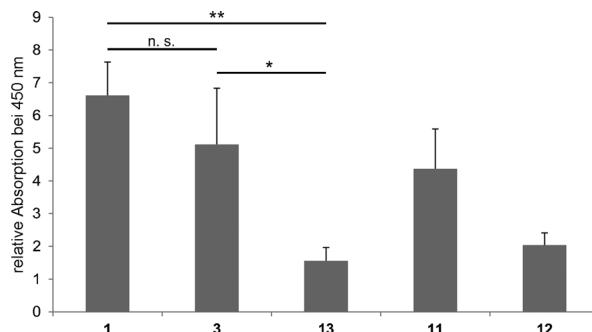


Abbildung 6. ELISA mit ACPA (human). Angegeben ist die relative Absorption bei 450 nm aus drei unabhängigen Experimenten normiert auf die Hintergrundabsorption. Zwischen den Absorptionen der Peptide **1** und **3** konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, während beide signifikant größer sind als die Negativkontrolle **13** (Studentischer *t*-Test: $P > 0.05$ (nicht signifikant; n.s.), $P < 0.05$ (*) oder $P < 0.01$ (**)).

Die Konformationsanalyse mit NMR-Spektroskopie sowie die Untersuchung der biologischen Aktivität haben gezeigt, dass es möglich ist, chimäre Peptide aufzubauen, die die Eigenschaften zweier sehr unterschiedlicher Peptide kombinieren. Das Strukturmotiv eines cyclischen β -Haarnadel-Peptids wurde durch die Mutation von nur drei Aminosäuren in die Filaggrin-Sequenz **1** integriert, ohne dessen Antikörperbindungsaffinität negativ zu beeinflussen. Die Übertragung von stabilisierenden Wechselwirkungen von einem Peptid auf ein anderes mit unterschiedlicher Sequenz und Länge liefert wichtige Informationen über die Faltungseigenschaften von Disulfid-verbrückten cyclischen Peptiden. Offensichtlich führt das Motiv CHWX_nLVC ($n = 4, 6, 8$) zur Bildung einer Haarnadelkonformation, wobei gezeigt werden konnte, dass Val weniger Einfluss auf die Faltung hat, während Leu an dieser Position essenziell für die Bildung der β -Haarnadel-Struktur ist. Die von Cochran am Peptid **2** identifizierten stabilisierenden Effekte gelten demnach nicht nur für die CX₈C-Peptide, sondern sind auch auf größere Peptide übertragbar, wie es im Rahmen dieser Arbeit für das CX₁₂C-Motiv gezeigt wurde. Das an dem Modellpeptid **2** identifizierte Faltungsmotiv lässt sich in einer biologisch aktiven Sequenz anwenden. Dabei lassen die erhaltenen Daten die Hypothese zu, dass das Filaggrin-Peptid **1** in der Antikörperbindungstasche von ACPA eine β -Haarnadel-artige Struktur einnimmt, da die vorgegebene Struktur von **3** zu keiner sichtbaren Verringerung der Bindungsaffinität geführt hat. Durch strukturelle Vereinfachungen in zukünftigen Peptidgenerationen könnten weitere Informationen über die Konformation sowohl in Lösung als auch im gebundenen Zustand erhalten werden. Die bisher untersuchten Peptide ohne Disulfidbrücke zeigten jedoch im ¹H-NMR-Spektrum nur eine geringe Dispersion und damit keine erkennbare Vorzugskonformation.

Untersuchungen an gefalteten chimären Filaggrin-Peptiden können nicht nur wichtige Hinweise auf die Natur der Peptid-Antikörperbindung liefern, sondern sollten auch in der Lage sein, aus dem Gemisch polyklonaler Autoantikörper Fraktionen unterschiedlicher Bindungsselektivität herauszufiltern. Dies soll die Entwicklung neuer, spezifischerer

ELISA-Testsysteme unterstützen, womit eine sicherere Frühdiagnose von RA ermöglicht wird.

Experimentelles

Die Peptide wurden durch automatisierte Festphasensynthese nach Fmoc-Strategie unter Standardbedingungen (3 Äquiv. Fmoc-Aminosäure, HBTU, HOEt, 8 Äquiv. DIPEA, 2 × 1 h) hergestellt. Die Oxidation zum Disulfid erfolgte mit Luftsauerstoff durch Röhren in NH₄HCO₃-Puffer (10 mM, pH 7.4). Dot-Blots wurden auf einer Nitrocellulosemembran durchgeführt. Nach Auftragen der Peptidlösung in verschiedenen Konzentrationen wurden freie Bindungsstellen mit Roti-Block blockiert, die Membran zuerst 1 h mit biotinkonjugiertem ACPA (α -CCP, 2 μ g mL⁻¹ in Roti-Block) und anschließend 1 h mit HRP-konjugiertem Streptavidin (1 μ g mL⁻¹ in Roti-Block) inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mit ECL-Substrat auf einem Photofilm detektiert. Für ELISA-Tests wurden Peptide in NaHCO₃-Puffer (50 mM, pH 9.6) gelöst und 0.5 μ g pro Loch kovalent auf 96er-Titerplatten (DNA-Bind Surface, Corning) gebunden, mit 2% BSA in NaHCO₃-Puffer über Nacht blockiert und 1 h mit ACPA (α -CCP, human, in PBS-T) inkubiert. Anschließend wurde 30 min mit HRP-konjugiertem Anti-Human-IgG (0.3 μ g mL⁻¹ in PBS-T) inkubiert und TMB-Lösung zugegeben. Nach Zugabe von 5% H₂SO₄ erfolgte die Detektion bei 450 nm.

Eingegangen am 13. November 2013,
veränderte Fassung am 15. Januar 2014
Online veröffentlicht am 5. März 2014

Stichwörter: Disulfide · Filaggrin · NMR-Spektroskopie · Peptide · β -Haarnadel

- [1] G. A. Schellekens, B. A. de Jong, F. H. J. van den Hoogen, L. B. van de Putte, W. J. van Venrooij, *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 273–281.
- [2] E. Girbal-Neuhauser, J.-J. Durieux, M. Arnaud, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessiere, C. Jolivet-Reynaud, et al., *J. Immunol.* **1999**, *162*, 585–594.
- [3] G. A. Schellekens, H. Visser, B. A. de Jong, F. H. J. van den Hoogen, J. M. Hazes, F. C. Breedveld, W. J. van Venrooij, *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 155–163.
- [4] M. A. M. van Boekel, E. R. Vossenaar, F. H. J. van den Hoogen, W. J. van Venrooij, *Arthritis Res.* **2002**, *4*, 87–93.
- [5] N. Bizzaro, G. Mazzanti, E. Tonutti, D. Villalta, R. Tozzoli, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 1089–1093.
- [6] K. Suzuki, T. Sawada, A. Murakami, T. Matsui, S. Tohma, K. Nakazono, M. Takemura, Y. Takasaki, T. Mimori, K. Yamamoto, *Scand. J. Rheumatol.* **2003**, *32*, 197–204.
- [7] W. J. van Venrooij, J. M. Hazes, H. Visser, *Neth. J. Med.* **2002**, *60*, 383–388.
- [8] W. J. van Venrooij, J. J. B. C. van Beers, G. J. M. Pruijn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1143*, 268–285.
- [9] A. S. Wiik, W. J. van Venrooij, G. J. M. Pruijn, *Autoimmun. Rev.* **2010**, *10*, 90–93.
- [10] T. Pérez, A. Gómez, R. Sanmartí, O. Viñas, G. Ercilla, I. Haro, *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *9*, 291–300.
- [11] H. Jane, P. E. Wright, *FASEB J.* **1995**, *9*, 37–42.
- [12] S. Pandey, M. C. Alcaro, M. Scrima, E. Peroni, I. Paolini, S. Di Marino, F. Barbetti, A. Carotenuto, E. Novellino, A. M. Papini, et al., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10437–10447.
- [13] F. Lolli, B. Mulinacci, A. Carotenuto, B. Bonetti, G. Sabatino, B. Mazzanti, A. M. D'Ursi, E. Novellino, M. Pazzagli, L. Lovato, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10273–10278.
- [14] J. Brown, R. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7565–7569.

- [15] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [16] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389.
- [17] K. Moehle, Z. Athanassiou, K. Patora, A. Davidson, G. Varani, J. A. Robinson, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9260–9264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9101–9104.
- [18] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18336–18341.
- [19] S. J. Russell, T. Blandl, N. J. Skelton, A. G. Cochran, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 388–395.
- [20] A. G. Cochran, R. T. Tong, M. A. Starovasnik, E. J. Park, R. S. McDowell, J. E. Theaker, N. J. Skelton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 625–632.
- [21] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523.
- [22] *HyperChem*, Hypercube, Inc., Gainesville, FL, **2000**.