

**Mikrokalorimetrische Studien zum Verständnis der
thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften
von Inhibitoren der Blutgerinnungskaskade**



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jasmine Fokkens

aus Dortmund

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 24. Mai 2005

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe
Zweitgutachter: Prof. Dr. Th. Schrader

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2005

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe in der Zeit von November 2001 bis März 2005 am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

J. Simunec, A. Heine, F. Dullweber, G. Klebe, ITC Measurements and Crystal Structure Analysis to Correlate Thermodynamic and Structural Properties in a Congeneric Series of Trypsin and Thrombin Inhibitors, Current Trends in Microcalorimetry, Boston, August **2003** und Frontiers in Medicinal Chemistry, Fulda, September **2003**.

J. Simunec, A. Heine, F. Dullweber, G. Klebe, Crystal Structure Analysis and ITC Measurements to Correlate Structural and Thermodynamic Properties in a Congeneric Series of Trypsin and Thrombin Inhibitors, 22nd European Crystallographic Meeting, Budapest, August **2004**.

Jasmine Simunec, Andreas Heine, Frank Dullweber, Gerhard Klebe, Affinity data of a congeneric series of low molecular-weight ligands towards trypsin and thrombin studied by ITC and crystallography, Applications of Biocalorimetry IV, Budapest, August/September **2004**.

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein

für Micha

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.2	Literatur	5
2	Serinproteasen	7
2.1	Familie der Serinproteasen	7
2.2	Biologische Rolle von Trypsin	8
2.3	Die biologische Funktion von Thrombin	9
2.4	Räumliche Struktur Trypsin-ähnlicher Serinproteasen	11
2.5	Struktur der aktiven Zentren von Trypsin und Thrombin	13
2.6	Katalysemechanismus der Serinproteasen	16
2.7	Thrombin-Inhibitoren	17
2.8	Entwicklung und Synthese der Thrombin-Inhibitoren	20
2.9	Literatur	25
3	Grundlagen und Ergebnisse	29
3.1	Kristallstrukturanalyse	29
3.1.1	Proteinkristallisation und Bewertung der Kristallqualität	29
3.1.2	Interpretation der Trypsin-Kristallstrukturen	31
3.1.3	Interpretation der Thrombin-Kristallstrukturen	38
3.1.4	Weitere Thrombin-Kristallstrukturen	42
3.2	Isothermale Titrationskalorimetrie	50
3.2.1	Einleitung	50
3.2.2	Theoretische Grundlagen	52

3.2.3	Bestimmbare Größen	56
3.2.4	Bestimmung der Bindungskonstante K_A	61
3.2.5	Racemische Mischungen	67
3.2.6	Änderung der Protonierungszustände bei der Bindung	73
3.2.7	Bestimmung der Wärmekapazität	79
3.3	Selektivitätsunterschiede	81
3.3.1	Hintergrund	81
3.3.2	Methode des Crossdocking	82
3.3.3	Analyse der Ergebnisse	83
3.4	Ergebnisse der Synthese	86
3.4.1	Synthese der Liganden	86
3.4.2	Trennung der Enantiomere	86
3.5	Literatur	88
4	Diskussion	91
4.1	Zusammenhang zwischen Kristallstruktur und Selektivität	91
4.2	Bindungskonstante, Vergleich mit K_i -Werten	94
4.3	Racemische Mischungen	95
4.4	Änderung der Protonierungszustände bei der Bindung	97
4.5	Enthalpische und Entropische Beiträge	98
4.6	Bestimmung der Wärmekapazität	101
4.7	Vergleich verschiedener Thrombin-Inhibitoren	105
4.8	Cross-Docking	107
4.9	Literatur	109

5	Zusammenfassung und Ausblick	111
5.1	Zusammenfassung	111
5.2	Ausblick	115
5.3	Literatur	116
6	Material und Methoden	117
6.1	Allgemeine Arbeitsmethoden und Materialien	117
6.2	Analytik	118
6.3	Synthesvorschriften	119
6.4	Arbeiten mit Proteinen	129
6.4.1	Aufreinigung von Trypsin	129
6.4.2	Herstellung der Affinitätssäule zur Aufreinigung von Thrombin	129
6.4.3	Aufreinigung von Thrombin	130
6.4.4	Aktivitätsbestimmung der Proteine	131
6.4.5	Proteinbestimmung	132
6.5	Mikrokalorimetrische Messungen	133
6.5.1	Standardpuffer	133
6.5.2	Messgerät	133
6.5.3	Reinigung	134
6.5.4	Kalibrierung des Messgerätes	135
6.5.5	Durchführung der Messungen	135
6.5.6	Messung der Wärmekapazitätsänderungen	137
6.5.7	Messungen zur Pufferabhängigkeit	138
6.5.8	Bestimmung von Ionisierungsenthalpien	139
6.6	Kristallographische Methoden	140
6.6.1	Kristallisation von Trypsinkomplexen durch „Soaking“	140
6.6.2	Kokristallisation von Trypsinkomplexen	141
6.6.3	Kristallisation von Thrombinkomplexen durch „Soaking“	142

6.6.4	Kristallmontage	143
6.6.5	Datensammlung	144
6.6.6	Datenauswertung	144
6.6.7	Modellbau und Verfeinerung	145
6.6.8	Analyse des Modells	145
6.6.9	Graphische Darstellung	146
6.7	Berechnung der Oberflächen	146
6.8	Crossdocking	146
6.9	Literatur	148
7	Anhang	150
7.1	Abkürzungsverzeichnis	150
7.2	Verwendete Nomenklatur der Aminosäuren	152
7.3	Kristallographische Begriffe	153
7.4	Kristallographiedaten	155

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Ein Wirkstoff muss im Körper an ein ganz bestimmtes Zielmolekül binden, um seine Wirkung zu entfalten. In vielen Fällen handelt es sich bei dem Zielmolekül um ein Enzym. Ist erst einmal ein Zielmolekül identifiziert und das therapeutische Konzept überprüft, so beginnt die Suche nach einem Liganden, der die Funktion des Zielmoleküls modulieren kann. Die wichtigste Eigenschaft ist zunächst, dass der Wirkstoff die richtige Größe und Gestalt aufweist, um optimal in die Protein-Bindetasche des Zielmoleküls hineinzupassen. Darüber hinaus spielt auch die Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand eine sehr wichtige Rolle.¹

Bisher sind unsere Kenntnisse über die Faktoren, welche die Affinität und die Spezifität von Protein-Ligand-Wechselwirkungen bestimmen, trotz der mittlerweile technisch weit fortgeschrittenen Strukturaufklärungsmethoden noch immer zu gering für ein zuverlässiges Liganden-Design. So wird zum Beispiel oft übersehen, dass die Affinität nicht allein durch die Struktur bestimmt wird, sondern vielmehr ein komplexes Zusammenspiel von Struktur und Dynamik unter Einbeziehen der Umgebung ist. Somit ist die Bestimmung der thermodynamischen Aspekte der Liganden-Bindung ein wichtiger Teil des modernen Liganden-Designs.²

In Hinblick auf die Optimierung von Liganden sind dementsprechend sowohl Informationen über die strukturellen Aspekte (die vornehmlich durch die Enthalpie charakterisiert werden) als auch über die Dynamik von Wechselwirkungen (welche stark zur Entropie beitragen) von großem Interesse.² Mit den strukturellen Aspekten hängen alle direkten energetischen Wechselwirkungen zusammen. Diese sind vorwiegend sterischer (Van-der-Waals-Potential) bzw. elektrostatischer Natur (Coulomb-Potential). Die Dynamik konzentriert sich auf den Ordnungsgrad und die Verteilung der Energiebeiträge über die verschiedenen Freiheitsgrade des betrachteten Systems. Im unkomplexierten Zustand sind sowohl die Liganden als auch die Bindetasche des Proteins durch Wassermoleküle solvatisiert. Außerdem besitzt der Ligand eine gewisse Translations- und Rotationsentropie und ist meist so flexibel, dass er verschiedene Konformationen einnehmen kann. Bei der Komplexbildung gehen die enthalpischen Wechselwirkungen zu diesen Wassermolekülen verloren. Sie werden durch direkte Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein ersetzt. Dies und der Anstieg der

Entropie durch die vergrößerte Unordnung im umgebenden Lösungsmittel führt zu einer Begünstigung der Bindung. Die Translations- und Rotationsfreiheitsgrade, die bei der Bindung eingefroren werden, gehen verloren und führen somit zu ungünstigen entropischen Beiträgen zur Bindung (vergleiche Abbildung 1.1).¹

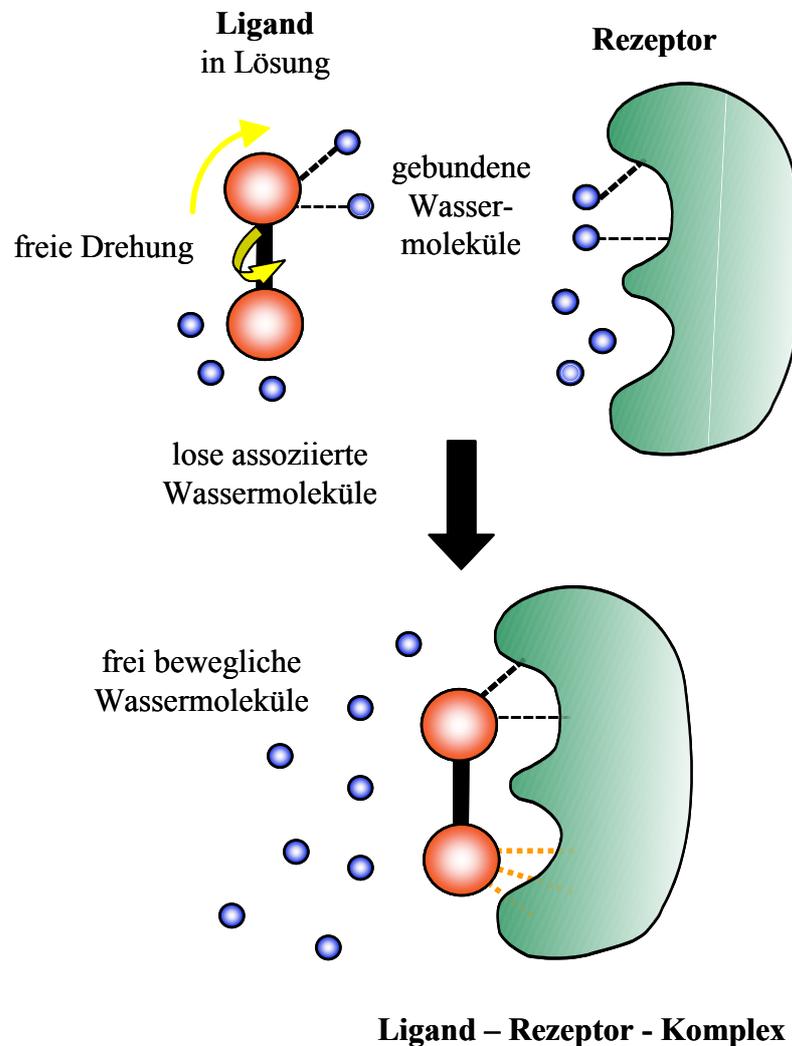


Abbildung 1.1 Illustration thermodynamischer Beiträge zur freien Bindungsenthalpie ΔG° . Die Wasserstoffbrücken sind als schwarz, gestrichelte Linien dargestellt, hydrophobe Kontakte als orange, gepunktete Linien.¹

Als Methode zur Studie der globalen thermodynamischen Parameter bietet sich die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) an, die einen umfassenden Einblick in die Thermodynamik der Liganden-Bindung mit nur einem einzigen Experiment gewährt.³

Diese Arbeit befasst sich mit den Struktur-Wirkungsbeziehungen von einigen Liganden und Proteinen, um neue Einblicke in das komplexe Gebiet des Zusammenspiels von Struktur und Dynamik zu bekommen. Dabei soll sowohl die Thermodynamik mit Hilfe von

ITC-Messungen untersucht werden als auch die daraus resultierenden Ergebnisse mit den jeweiligen Kristallstrukturen verglichen werden.

Als System zur Studie von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eignen sich vor allem Proteine, die bereits gut charakterisiert sind. Hier wurden die beiden Serinproteasen Thrombin und Trypsin ausgewählt. Diese sind von medizinisch-chemischem Interesse und waren dementsprechend schon Gegenstand zahlreicher Studien, die eine Untersuchung ihrer Eigenschaften in Hinblick auf ihrer Wirkungsweise und Ansätzen zu einer selektiven Inhibition zum Ziele hatten. Thrombin besitzt eine dem Trypsin ähnliche Spezifität, ist jedoch wesentlich selektiver und spielt eine wichtige Rolle bei der Thrombose, der Hämostase und der Fibrinolyse durch die Regulierung der Blutgerinnung.⁴ Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die häufig mit einer Störung der Blutgerinnung zusammenhängen, sind in den Industrieländern für einen von drei Todesfällen verantwortlich.⁵ Die bisher etablierten Antithrombotika, einschließlich Warfarin, Heparin und Acetylsalicylsäure weisen immer noch eine limitierte Effizienz und verschiedene Nebenwirkungen auf, die zum Beispiel ein erhöhtes Blutungs-Risikos bedingen und sich in einer schwierigen Dosierbarkeit niederschlagen.⁶ Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse daran, neue und hochselektive Inhibitoren für Thrombin oder andere Serinproteasen, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, zu entwickeln. Abgesehen davon spielt Thrombin durch die Aktivierung von Progelatinase A in Endothelzellen der Gefäße über aktives Protein C auch eine Rolle bei der Angiogenese.^{7; 8} Trypsin dagegen ist neben Chymotrypsin und Elastase ein wichtiges Verdauungsenzym, das im Bereich des Dünndarms Proteine hydrolytisch spaltet.

Ein weiterer Grund, Trypsin und Thrombin als Untersuchungssystem auszuwählen, liegt in der enormen Fülle an bereits bekannten strukturell unterschiedlichen Liganden. Es sind Liganden mit unterschiedlichsten Bindungsaffinitäten bekannt, die sich über mehrere Größenordnungen erstrecken. Außerdem sind sowohl Liganden beschrieben, die kaum Selektivitätsunterschiede für die genannten Proteine aufweisen, allerdings auch andere, die dagegen bei kleinen Strukturänderungen deutlich unterschiedliche Affinitäten besitzen. Für viele dieser Liganden sind die Kristallstrukturen bereits aufgeklärt.

Von Vorteil ist es außerdem, dass beide Enzyme Kristalle liefern, die bis zu hoher Auflösung streuen und neue Komplexstrukturen schnell durch Molekularen Ersatz bestimmt und anschließend verfeinert werden können. Beide Enzyme sind nicht sehr groß, Trypsin besitzt 223 Reste bei einer Molmasse von 23.8 kDa und Thrombin 295 Reste bei 33.8 kDa. Die relativ rigiden Bindetaschen beider Enzyme erleichtern zusätzlich die Interpretation der erhaltenen Daten.⁹

Bei der Auswahl der Liganden für tieferegehende Studien der Struktur-Wirkungsbeziehungen bieten sich Serien von Liganden an, die untereinander nur kleine strukturelle Unterschiede aufweisen, da sich so leichter die Ursachen für abweichendes oder analoges Verhalten festmachen lassen. Sind die untersuchten Liganden zu verschieden in ihrer Flexibilität und chemischen Funktionalisierung, dann wird eine genaue Auswertung extrem komplex, so dass es nahezu unmöglich wird, die Auswirkung einer konkreten Veränderung zuzuordnen.

Um einige Fragen in Bezug auf Struktur-Wirkungsbeziehungen zu beantworten wurden einige der Liganden ausgewählt, die von Ulrike Obst in der Gruppe von Prof. François Diederich entwickelt wurden.⁹ Es handelt sich dabei um nichtpeptidische, selektive Thrombin-Inhibitoren, die mit Hilfe des *De novo*-Designs entwickelt wurden. Dabei wurde auf der Grundlage der Kristallstruktur von Thrombin ein cyclisches Grundgerüst entworfen, das mit in geeigneter räumlicher Anordnung angebrachten Seitenketten zur Bindung ins aktive Zentrum des Enzyms befähigt ist. Das konformativ starre Grundgerüst soll ein Zusammenfallen der hydrophoben Seitenarme verhindern und außerdem das Molekül für eine Bindung an Thrombin präorganisieren.

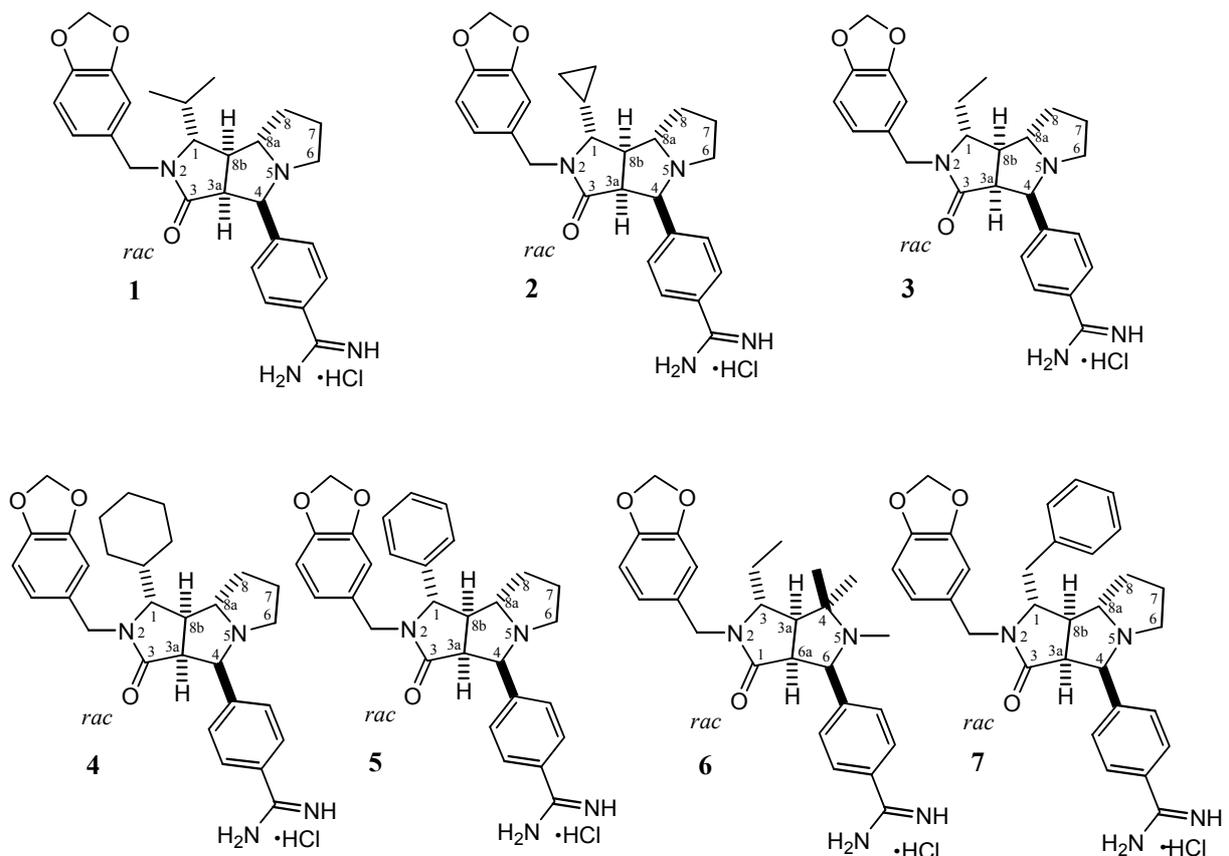


Abbildung 1.2 Die für diese Studie ausgewählten Thrombin-Inhibitoren.

Anhand dieser Serie von Liganden sollten einige Fragen mit Hilfe von ITC-Messungen aufgeklärt werden, wie zum Beispiel:

- Wie verhalten sich die Dissoziationskonstanten einer Serie von Liganden im Vergleich zu deren K_i -Werten?
- Welche Änderungen in der Enthalpie und Entropie ergeben sich innerhalb dieser Liganden-Reihe?
- Wie setzen sich deren enthalpische und entropische Bindungsbeiträge zusammen bzw. wie fallen die Wärmekapazitätsänderungen aus, vor allem im Vergleich mit anderen bereits vermessenen Thrombin-Inhibitoren, die ein flexibleres Grundgerüst besitzen?
- Wie verhält sich ein racemischer Ligand in kalorimetrischen Messungen und welche Möglichkeiten gibt es, Racemate gleichzeitig auszuwerten? Ist es möglich, die Bindungskonstanten beider Enantiomere einer racemischen Mischung mit einer einzigen Messung zu bestimmen?
- Ist bei der Bindung der Liganden ein Einfluss des Puffers zu beobachten, was für eine Änderung von Protonierungszuständen spricht?
- Wie können diese Erkenntnisse für das Wirkstoffdesign verwendet werden? Welche Erkenntnisse ergeben sich aus dem Vergleich mit den Kristallstrukturdaten?

Da die Selektivitätsunterschiede zwischen Thrombin und Trypsin sehr interessant für das Wirkstoffdesign sind und viele experimentelle Daten zu den verwendeten Liganden vorliegen, sollte des weiteren ein neues Dockingverfahren¹⁰ mit AutoDock getestet werden, das durch das gleichzeitige Docking in beide Enzyme eine Aussage über die Selektivität der Liganden erleichtern soll. Aufgrund der vielen bereits vorliegenden Daten eignet sich dieses System besonders gut, um das neue Verfahren zu testen und gegebenenfalls zu verbessern.

1.2 Literatur

1. Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H. (1996). *Wirkstoffdesign*, Spektrum-Verlag, Heidelberg.
2. Homans, S. W. (2004). NMR spectroscopy tools for structure-aided drug design. *Angew. Chem.* 116, 292-303.
3. Holdgate, G. A. (2001). Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques* 31, 164-6, 168.

4. Butenas, S. & Mann, K. G. (2002). Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 67, 3-12.
5. WHO. (2004). *CVD-risk management package for low - and medium-resource settings*, WHO.
6. Nutescu, E. A. & Wittkowsky, A. K. (2004). Direct thrombin inhibitors for anticoagulation. *Ann. Pharmacother.* 38, 99-109.
7. Zucker, S., Conner, C., DiMassmo, B. I., Ende, H., Drews, M., Seiki, M. & Bahou, W. F. (1995). Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 270, 23730-8.
8. Minami, T., Horiuchi, K., Miura, M., Abid, R., Takabe, W., Kohro, T., Ge, X., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T. & Aird, W. C. (2004). VEGF- and thrombin-induced termination factor, down syndrome critical region-1, attenuates endothelial cell proliferation, and angiogenesis. *J. Biol. Chem.*
9. Obst, U., Betschmann, P., Lerner, C., Seiler, P., Diederich, F., Gramlich, V., Weber, L., Banner, D. W. & Schönholzer, P. (2000). Synthesis of Novel Nonpeptidic Thrombin Inhibitors. *Helv. Chim. Acta* 83, 855-909.
10. Sotriffer, C. A. & Dramburg, I. (2005). "In-situ Cross-Docking" to Simultaneously Address Multiple Targets. *Med. Chem.*, in press.

2 Serinproteasen

2.1 Familie der Serinproteasen

Proteasen, auch Proteinasen, Peptidasen oder proteolytische Enzyme genannt, haben die Fähigkeit, mit unterschiedlicher Selektivität die Spaltung von Peptidbindungen zu katalysieren. Sie gehören damit zu einer sehr großen Gruppe von Proteinen, denen im Stoffwechselgeschehen von Organismen eine sehr kritische und essentielle Rolle zuteil wird. Sie werden in der EC-Liste (Enzyme Commission) in der Unterklasse 3.4 zusammengefasst. Diese enthält 13 Unter-Unterklassen von Proteasen, wobei jedoch molekulare Strukturen und evolutionäre Beziehungen untereinander nicht berücksichtigt werden.

Eine dieser Klassen, ist die der Serinproteasen, die sechs *clans*¹ umfasst. Der Chymotrypsin-*clan* (*clan* A) enthält eukaryontische Enzyme wie Chymotrypsin, Trypsin, Thrombin, Elastase oder Kallikrein, der Subtilisin-*clan* (B) die Furine, viele prokaryontische Proteasen (z.B. Subtilisin) und die α/β -Hydrolasen. Neben der Verdauung sind diese Enzyme auch an Entwicklungsprozessen, der Blutgerinnung, bei Entzündungsprozessen und zahlreichen anderen Vorgängen beteiligt. Die beiden *clans* unterscheiden sich in der Sequenz und Faltung, nicht jedoch in der Geometrie des aktiven Zentrums und im Katalysemechanismus. Sie haben sich folglich konvergent aus verschiedenen Ursprüngen entwickelt. Drei Reste sind für die Katalyse essentiell: His57, Asp102 und Ser195 (Chymotrypsinogen-Nummerierung). Sie bilden die sogenannte „katalytische Triade“.² Trotz hoher Homologie in ihrer Primärstruktur besitzen die Serinproteasen äußerst verschiedene Substratspezifitäten, die auf Aminosäuresubstitutionen in den Bindungstaschen beruhen. Das geringste Ausmaß an Spezifität ist auf die P₁-Position beschränkt, die meisten Enzyme weisen jedoch eine erweiterte Wechselwirkungsfläche mit dem Substrat auf.

Die erste Kristallstruktur einer chymotrypsinartigen Serinprotease wurde 1967 von α -Chymotrypsin bestimmt.³ Aus diesem Grunde dient die Struktur und die Sequenz dieses Enzyms auch als Referenz, um topologisch äquivalente Aminosäuren in anderen Proteinen der Familie zu bezeichnen (Chymotrypsinogen-Nummerierung). Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt bei α -Chymotrypsin bei 16 und im Vergleich zu Chymotrypsinogen insertierte Reste erhalten ein Buchstabensuffix (A, B, C...).

Eine Serinprotease oder eine Serinproteasedomäne besteht aus zwei sechssträngigen antiparallelen β -Faltblättern (*β -barrel*), die in einem *greek-key*-Motiv angeordnet sind (β 1-4),

gefolgt von einer antiparallelen Haarnadelschleife (β 5/6) (siehe Abbildung 2.1). An der Grenze zwischen den beiden *barrels* im Schleifenbereich liegen die Reste der katalytischen Triade.

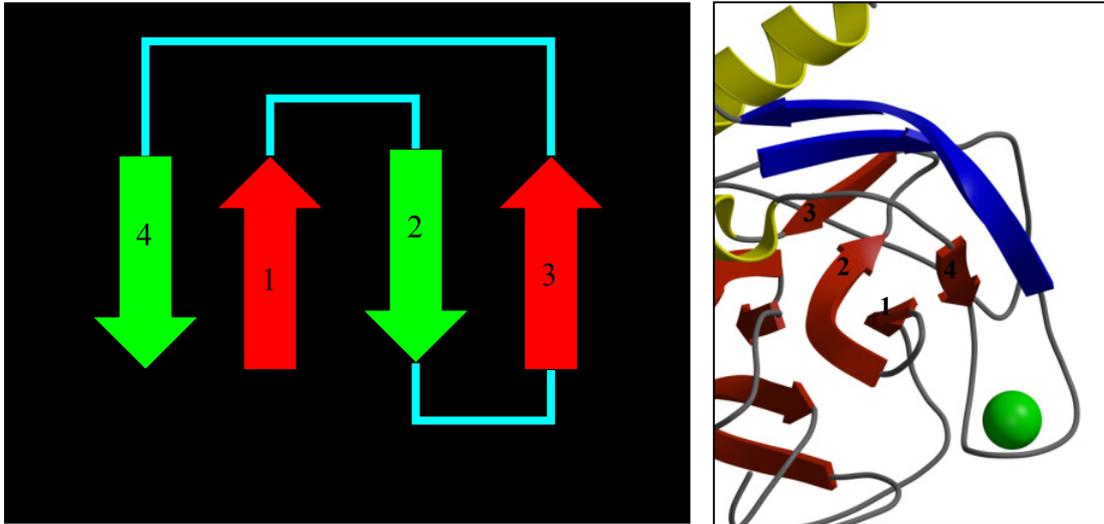


Abbildung 2.1 Allgemeine Skizze eines *greek-key*-Motivs und ein Ausschnitt aus der Struktur von Trypsin. Das *greek-key*-Motiv (rechts) ist in rot und die antiparallele Haarnadelschleife in blau dargestellt.

Im Allgemeinen erfolgt die Aktivierung aller Serinproteinasen, die eine Argininspezifität in der S_1 -Bindetasche besitzen, nach demselben Muster.⁴ Die inaktiven Vorstufen der Serinproteasen, sogenannte Zymogene, werden durch aktivierende Proteasen freigesetzt, in dem die Arg15–X16-Bindung gespalten wird. Danach faltet sich der neugebildete H_3N^+ –X16-Aminoterminus ins Innere des Proteins und bildet dort eine starke, vom Solvens abgeschirmte Salzbrücke zu Asp194. Durch diese relativ (auf die so bezeichnete „Aktivierungsdomäne“) begrenzte Umlagerung wird die aktive Konformation stabilisiert.^{5; 6; 7}

2.2 Biologische Rolle von Trypsin

Trypsin gehört, wie Chymotrypsin und Elastase, zu den am gründlichsten charakterisierten Serinproteasen. Alle drei sind wichtige Verdauungsenzyme des Dünndarmbereichs. Die inaktiven Vorstufen dieser drei Verdauungsenzyme werden im Pankreas synthetisiert. Die Aktivierung von Trypsinogen, dem Zymogen von Trypsin, erfolgt proteolytisch durch Enteropeptidase oder bereits aktiviertes Trypsin. Das Trypsinogen wird von speziellen Zellen (Acinuszellen) des Pankreas synthetisiert und im oberen Bereich des Dünndarms abgesondert.

Trypsin katalysiert wie Chymotrypsin und Elastase die Hydrolyse von Peptidbindungen. Trypsin weist dabei eine Substratspezifität gegenüber Peptidbindungen auf, die in der Sequenz einem Arginin- oder Lysinrest folgen, und hydrolysiert die nachfolgende Amidbindung. Das Enzym besitzt drei ausgeprägte Bindetaschen: die S_1 -Spezifitätstasche dient zur Bindung der kationischen Seitenketten über eine Salzbrücke zum Asp189. An der Position 190 befindet sich ein Serinrest, der eine weitere Wasserstoffbrücke zu den basischen Resten des Substrats bilden kann. Die S_2 - und S_3 -Taschen sind nur geringfügig ausgeprägt, wobei die S_2 -Tasche vor allem hydrophobe Reste erkennt und die S_3 -Tasche hydrophobe und aromatische Reste bindet. Lediglich die S_3 -Tasche wird von den Resten Ser96 bis Leu99 scharf abgegrenzt.

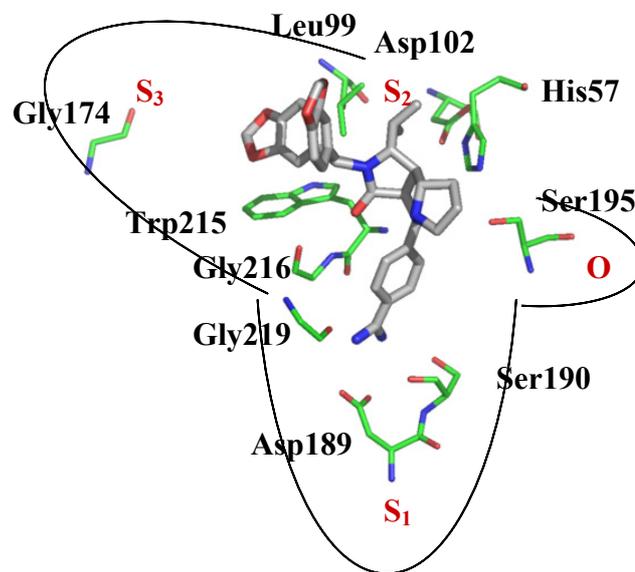


Abbildung 2.2 Die Umgebung des aktiven Zentrums von Trypsin mit einem darin gebundenen Liganden.

2.3 Die biologische Funktion von Thrombin

Thrombin spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutgerinnung oder Koagulation (siehe Abbildung 2.3). Die allgemeine Gegenregulation des Organismus bei Blutungen durch hämodynamische Mechanismen (Gefäßverengung) und durch biochemische Vorgänge (Blutgerinnung) wird Hämostase genannt. Die wichtigste Funktion von Thrombin ist hierbei die Freisetzung der Fibrinopeptide A und B aus Fibrinogen. Die dabei erzeugten Fibrinmonomere aggregieren spontan und bilden das sogenannte „weiche Fibrin“. Der

ebenfalls durch Thrombin aktivierte Faktor XIIIa (FXIIIa) katalysiert im nächsten Schritt die kovalente Vernetzung der Fibrinmonomere zu einem sehr stabilen Fibringerinsel („hartes Fibrin“). Dieses unlösliche, quervernetzte Fasergeflecht sorgt letztendlich für den nötigen Wundverschluss. Über diese beiden Funktionen hinaus hat Thrombin auch eine wichtige regulatorische Aufgabe bei der Gerinnung. Die genaue Steuerung der Reaktionskaskade ist wichtig, da ein Blutgerinnsel am falsche Ort fatale Folgen wie einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall nach sich ziehen kann. Eine Thrombose ist als krankhafte Blutgerinnung innerhalb von Gefäßen definiert, die zur Bildung eines Blutpfropfens (Thrombus) führt.

Thrombin wird aus der inaktiven Vorstufe Prothrombin (582 Aminosäuren) durch zwei proteolytische Spaltungen aktiviert. Dadurch entstehen zwei Polypeptidketten (A-Kette mit 36 Aminosäuren, B-Kette mit 259 Aminosäuren), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

Prothrombin (EC 3.4.21.5, auch Profibrinogenase, Prothrombase, Faktor II) wird in der Leber synthetisiert und von dort ins Blut abgegeben. Die Prothrombin-Konzentration im Blut beträgt etwa 10 µg/mL.⁸ Die Aktivierung von Prothrombin erfolgt durch den membrangebundenen Prothrombinase-Komplex⁹, der durch das Zusammentreten von FVa, FXa und Ca²⁺ auf der Phospholipidoberfläche aktivierter Thrombozyten entsteht.¹⁰ Die Aktivierung von Prothrombin durch FXa alleine ist 300000 mal langsamer als im Prothrombinase-Komplex.

Für die genaue Steuerung der Gerinnungskaskade ist es wichtig, dass die Aktivierung von Prothrombin über Rückkopplungsmechanismen (Feedback-Mechanismen) streng kontrolliert wird. Darüber hinaus wird auch die Thrombin-Aktivität limitiert. Dies erfolgt durch drei Thrombininhibitoren, Antithrombin III (AT)¹¹, α2-Makroglobulin¹² und Heparin-Kofaktor II.¹³ Die Affinität von AT für Thrombin bzw. seine anderen Substrate wird durch die Bindung von Heparin stark erhöht.

Zusätzlich existieren eine Reihe von Rückkopplungsmechanismen, durch die aktivierte Faktoren in der Kaskade weiter oben stehende Faktoren beeinflussen können. Thrombin beispielsweise aktiviert im intrinsischen Reaktionsweg die Faktoren V und VIII zu den Faktoren Va und VIIIa, die wiederum die Bildung von Thrombin bzw. Faktor Xa katalysieren, d.h. es entsteht eine positive Rückkopplung. Die Aktivierung von Protein C durch Thrombin bewirkt dagegen eine negative Rückkopplung: aPC (aktiviertes Protein C) inaktiviert die Faktoren Va und VIIIa, die für die Freisetzung von Thrombin entscheidend sind.

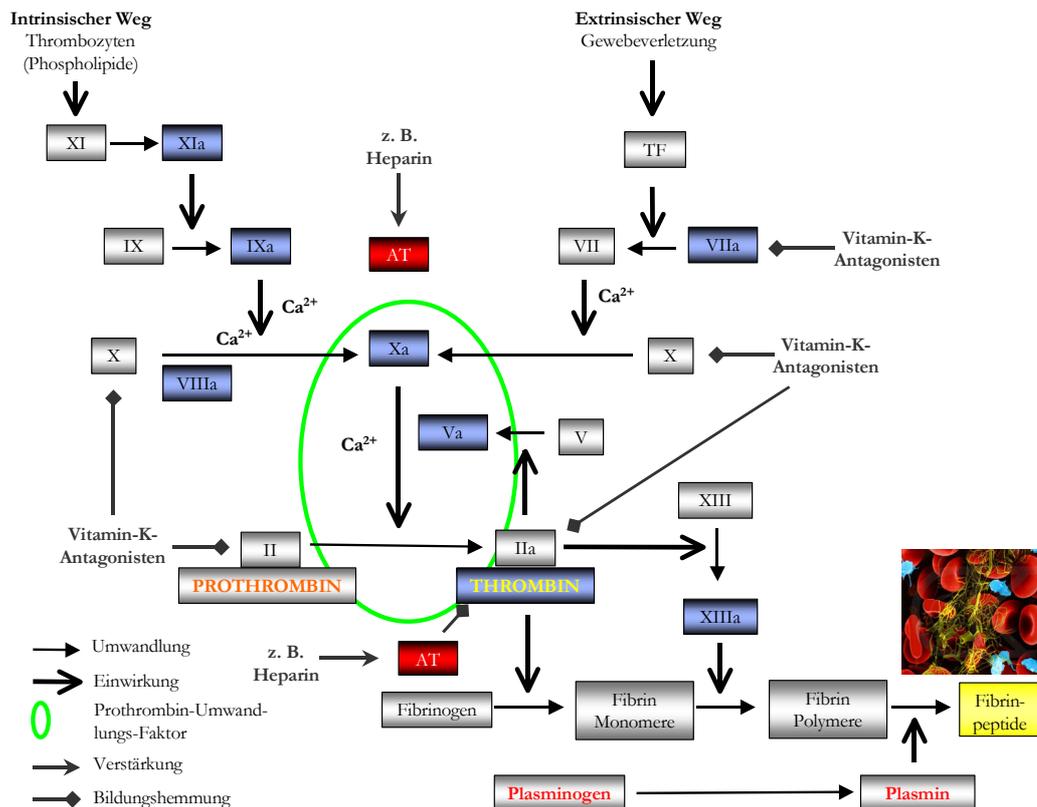


Abbildung 2.3 Die Blutgerinnungskaskade beim Menschen.

2.4 Räumliche Struktur Trypsin-ähnlicher Serinproteasen

Bereits 1974 wurde die erste dreidimensionale Struktur des Rinder-Trypsins mit Hilfe der Röntgenstruktur-Analyse aufgeklärt.¹⁴ Seitdem gilt Trypsin als Prototyp der Serinproteasen, die in der S₁-Bindungstasche eine Argininspezifität aufweisen. Diese Proteasen zeigen ein stark konserviertes Strukturmotiv in ihren Tertiärstrukturen, wobei jedoch gleichzeitig die Primärstrukturen stark voneinander abweichen können. Chymotrypsin und Trypsin weisen zum Beispiel eine beinahe identische Tertiärstruktur auf, bei gleichzeitig weniger als 50 % Identität in der Primärstruktur beider Proteasen. Zudem besitzt Chymotrypsin aufgrund einer S₁-Tasche, die keinen geladenen Rest aufweist, eine Substratspezifität für aromatische Reste, im Gegensatz zur Substratspezifität für basische Reste in Trypsin. In Trypsin-ähnlichen Proteasen sind dagegen die Positionen von sogenannten Schlüsselresten, wie die der katalytischen Triade und des Asp189-Restes am Boden der S₁-Spezifitätstasche, identisch. Die Tertiärstruktur von Serinproteasen besteht vorwiegend aus antiparallelen β -Faltblättern und ist durch zwei Domänen charakterisiert. Jede Domäne bildet ein β -barrel aus, die beide jeweils in einem *greek-key*-Motiv angeordnet sind (β 1-4), gefolgt von einer antiparallelen

Haarnadelschleife (β 5/6) (siehe Abbildung 2.1). Zusammen bilden diese beiden Domänen ein globuläres Molekül mit einer Größe von ca. $45 \times 45 \times 50 \text{ \AA}$.^{15; 16} Die Bindetasche, die die katalytische Triade und die Substratbindungstasche beinhaltet, ist genau zwischen diesen beiden Domänen lokalisiert, wobei His57 und Asp102 in der Subdomäne I, Ser195 aber in der Subdomäne II liegen.¹⁷ Die Rückgrat-Amide von X193 und Ser195 bilden die sogenannte Oxyanion-Tasche¹⁸, in der die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung zu liegen kommt. Neben wenigen, kurzen Helices besitzen alle Enzyme eine lange C-terminale α -Helix (Abbildung 2.4, gelb dargestellt).

Die Brookhaven Protein-Datenbank verzeichnet bis Ende Dezember 2004 292 Röntgenkristallstrukturen von Trypsin und 175 von Thrombin. Die meisten dieser Strukturen stellen Komplexe mit synthetischen oder natürlichen Inhibitoren dar, die gelöst wurden, um den genauen Bindungsmodus und die Selektivität der Inhibitoren aufzuklären, um diese dann nach rationalen Konzepten verbessern zu können.

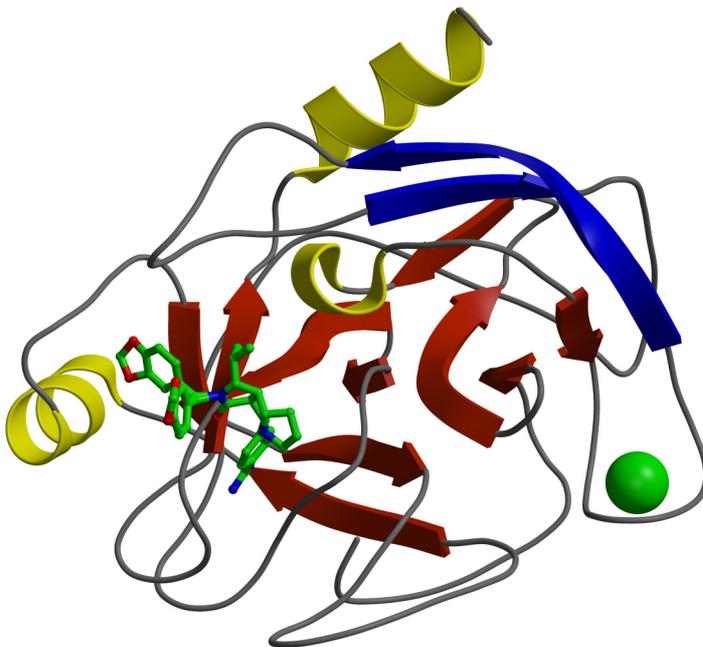


Abbildung 2.4 Die Tertiärstruktur von β -Trypsin im Komplex mit dem Thrombin-Inhibitor **1** (PDB-Code: 1Y3U). Sekundärstrukturelemente wie α -Helix und β -Faltblatt werden als helikales Band (gelb) bzw. verdrehte Pfeile (rot und blau) wiedergegeben^[5].

Sehr auffällig in der Struktur von Trypsin ist ein Calcium-Ion (in Abbildung 2.4 grün dargestellt), das im Zentrum einer externen Schleife bindet, die wie ein Scharnier beide Domänen verbindet. Das Calcium-Ion ist oktaedrisch von sechs Sauerstoffatomen koordiniert

und relativ fest gebunden, lässt sich aber trotzdem mit Hilfe von sauren Puffern gegen Ionen der Seltenen Erden (wie zum Beispiel Ytterbium) austauschen. Zur Funktion des Calciums ist bekannt, dass es die thermische Stabilität von Trypsin erhöht und die Geschwindigkeit des Selbstverdaus von Trypsin stark erniedrigt. Bei Abwesenheit von Calcium, wird das Trypsin durch die relativ mobile „Autokatalyseschleife“ nicht nur zum α -Trypsin aktiviert, sondern die autokatalytische Spaltung geht weiter und führt zu inaktiven Molekülfragmenten. Im Gegensatz zu Trypsinogen enthält Trypsin nur eine Calcium-Bindestelle.^{19; 20}

Thrombin zeigt im Gegensatz dazu eine starke Natrium-Abhängigkeit. Das Natrium-Ion wird im Thrombin für die optimale Umwandlung von Fibrinogen in Fibrinmonomere benötigt. Bei Anwesenheit erfolgt die Umsetzung schnell und spezifisch, wohingegen die „langsame Form“ des Thrombins (ohne Natrium) eine wesentlich geringere Spezifität ausweist. Genau wie das Calcium im Trypsin wird auch das Natrium im Thrombin von sechs Sauerstoffatomen koordiniert und formt somit ebenfalls ein komplexes Wasserstoffbrücken-Netzwerk.²¹

Spezifische Effekte von monovalenten Kationen in Proteinen scheinen weit verbreitet zu sein und werden schon seit längere Zeit immer wieder in der Literatur diskutiert. In der Blutgerinnungskaskade wurden diese Effekte zuerst für FXa, später dann auch für Thrombin und für aPC beschrieben. Monovalente Kationen können allosterische Einflüsse haben, die Gesamtstruktur des Proteins beeinflussen oder als Kofaktoren direkt mit dem Substrat interagieren. Detaillierte Studien über die molekulare Basis dieser Effekte wurden im Zusammenhang mit Proteinen, die eine Kalium-Abhängigkeit besitzen, durchgeführt.^{22; 23; 24; 25; 26}

2.5 Struktur der aktiven Zentren von Trypsin und Thrombin

Im Vergleich zu Trypsin besitzt Thrombin eine vergrabenerere und dadurch zur Erkennung von Substraten wesentlich spezifischere Bindetasche. Die Seitenketten des Substrats bilden, analog wie im Falle des Trypsins, in der S_1 -Spezifitätstasche eine Salzbrücke mit Asp189. An der Position 190 befindet sich im Gegensatz zu Trypsin kein Serinrest, der eine weitere Wasserstoffbrücke zu den basischen Resten des Substrats bilden kann, sondern ein Alanin. Ein ganz wesentlicher Unterschied ist die durch den *60er-Loop* begrenzte S_2 -Tasche, die dadurch nur kleine bis mittelgroße hydrophobe Reste aufnehmen kann. Auch die katalytische Triade ist bei Trypsin deutlich weniger vergraben als bei den Enzymen der Blutgerinnungskaskade. Im Vergleich zu den Verdauungsenzymen werden deshalb

spezifische Substrate erkennt. Dies ist notwendig, um einen Selbstverdau im Blut zu verhindern.

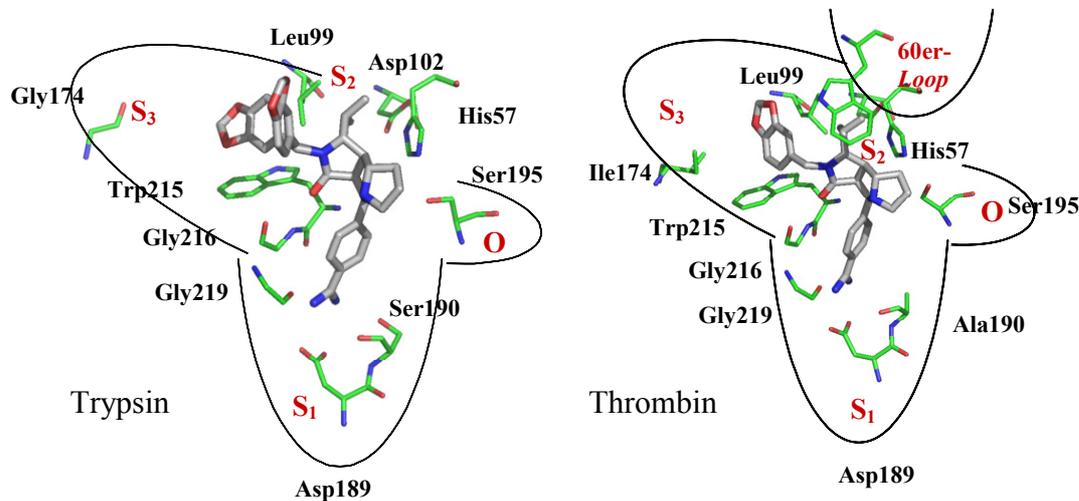


Abbildung 2.5 Die Bindetaschen der Serinproteasen Trypsin und Thrombin im Vergleich.

Bei fast identischer Sekundär- und Tertiärstruktur unterscheiden sich die Trypsin-ähnlichen Serinproteasen jedoch signifikant in einigen Bereichen entlang ihrer Aminosäuresequenz. Durch diese Unterschiede entstehen unterschiedliche räumliche Strukturierungen an der Oberfläche und in der Bindetasche der Enzyme, aus denen die Substratspezifitäten resultieren. Diese wiederum sind für die korrekte Steuerung biologischer Prozesse auf molekularer Ebene eminent wichtig. Die strukturellen Verschiedenheiten werden beim Design synthetischer Inhibitoren gezielt adressiert, um möglichst selektiv eine spezielle Protease inhibieren zu können. Gerade bei der sehr großen Familie der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, die eine zentrale Rolle in weiten Bereichen von wichtigen, biologischen Prozessen spielen - eine Deregulation könnte in vielen Fällen zu pathologischen Zuständen führen - ist eine möglichst selektive Intervention fundamental.

Betrachtet man die S_1 -Regionen, so ist allen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen die Ausbildung einer relativ tiefen, schmal eingeschnittenen, arginin- bzw. lysinspezifischen Bindungstasche gemeinsam, womit die selektive Erkennung des Strukturelements der basischen Arginin- bzw. Lysinseitenkette erfolgt. Hierbei bildet sich eine Salzbrücke zwischen der negativ geladenen Carboxylgruppe des Asp189 am Grund der S_1 -Tasche und der positiv geladenen Guanidino- bzw. Aminogruppe des Arginins bzw. Lysins in der erkannten Substratsequenz aus. Bei Trypsin ist zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette des Ser190-Restes und der ϵ -NH-Gruppe der Guanidinofunktion möglich. Diese Interaktion ist bei Thrombin nicht

möglich, da das Serin des Trypsins in dieser Position gegen ein Alanin im Thrombin ausgetauscht ist. In ihrer Gesamtstruktur wird die S_1 -Tasche auf der einen Seite durch eine antiparallele Faltblattstruktur, auf der anderen Seite durch ein β -Faltblatt begrenzt.

Am „oberen“ Ende der S_1 -Spezifitätstasche schließt sich die sogenannte Oxyanionentasche (*oxyanion hole*) an, die von drei nach innen gerichteten Aminofunktionen ausgekleidet wird, um so das geladene Sauerstoffatom, das bei der Spaltung der Peptidbindung im tetraedrischen Übergangszustand entsteht, zu stabilisieren.

Blickt man auf die S_2 -Regionen, so existieren hier bereits größere Unterschiede zwischen Trypsin und Thrombin. Thrombin bildet eine große, hydrophobe Tasche aus, die beispielsweise Prolinreste in P_2 -Position des Substrates sehr gut erkennen und damit interagieren kann. Die S_2 -Tasche wird durch den sogenannten *60er-Loop*, bestehend aus Tyr60A, Pro60B, Pro60C und Trp60D, und den Aminosäuren His57, Ser214 und Leu99 geformt.

Zusätzlich gibt es bei beiden Enzymen die sogenannte Aromatenbindetasche (S_3 -Tasche). Die S_3 -Tasche ist eine große, hydrophobe Tasche, die bevorzugt aromatische Ringsysteme aufnimmt wie zum Beispiel das Phenylalanin des Fibrinogens oder Tyrosin des Hirudins. Begrenzt wird die Tasche durch die hydrophoben Seitenketten von Leu99 und Ile174. Den Boden der S_3 -Tasche bildet der Indolring des Trp215.

Abgesehen vom eigentlichen aktiven Zentrum besitzt Thrombin noch die Möglichkeit weitere spezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche für die Bindung makromolekularer Substrate wie Fibrinogen und anderen Inhibitoren zu nutzen. Diese Bindestellen sind lokal weit vom aktiven Zentrum entfernt. Die eine ist die positiv geladene, sogenannte Fibrinogenbindungsregion (*anion binding exosite*), die an der Bindung des Fibrinogens oder auch des Inhibitors Hirudin beteiligt ist. Die zweite stark positiv geladene Oberflächenregion des Thrombins wird als Heparinbindungsstelle bezeichnet.²⁷ Die zu beobachtende Wechselwirkung beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem durch die Aminosäuren Lysin und Arginin erzeugten positivgeladenen elektrostatischen Feld des Thrombins und den negativen Feldbeiträgen, die durch das Polysaccharid Heparin hervorgerufen werden.

2.6 Katalysemechanismus der Serinproteasen

Entscheidend für die katalytische Wirkung der Serinproteasen ist die räumliche Anordnung der drei Aminosäuren (Asp102, His57 und Ser195) der katalytischen Triade.

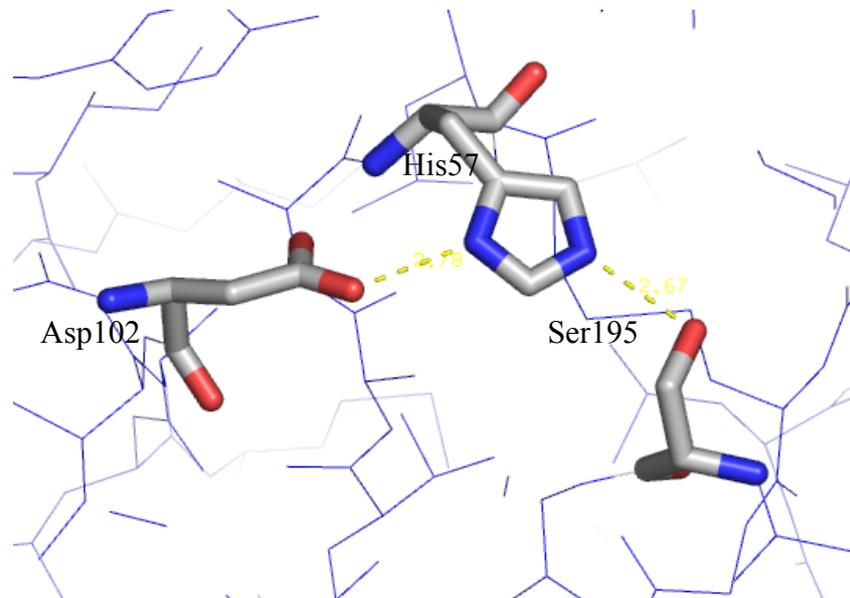


Abbildung 2.6 Aminosäuren der katalytischen Triade.

Nach der Bindung des Substrates an das Enzym ist der erste katalytische Schritt eine Acylierung, wobei über einen negativ geladenen tetraedrischen Übergangszustand unter Spaltung der Peptidbindung ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat zwischen dem Substrat und dem Ser195 entsteht. Hierbei nimmt der Imidazolring von His57 das freigesetzte Proton auf. Eine elektrostatische Stabilisierung und die richtige Positionierung des Imidazoliumions erfolgt durch die Carbonsäureseitenkette des Asp102, die sich auf der vom Lösungsmittel abgeschirmten Seite des Enzyms befindet. Das Oxyanion des tetraedrischen Intermediates wird in der Oxyanionentasche stabilisiert.

Bei der Deacylierung erfolgt ein nukleophiler Angriff eines Wassermoleküls auf diesen labilen Komplex und hydrolisiert den Serinester, wobei das gespaltene Peptid freigesetzt und die freie Hydroxylgruppe des Ser195 für den nächsten Katalysezyklus bereitgestellt wird. His57 agiert als Base und übernimmt ein Proton vom reaktiven Serin. Danach steht das Enzym für den nächsten Katalysezyklus bereit.²⁸

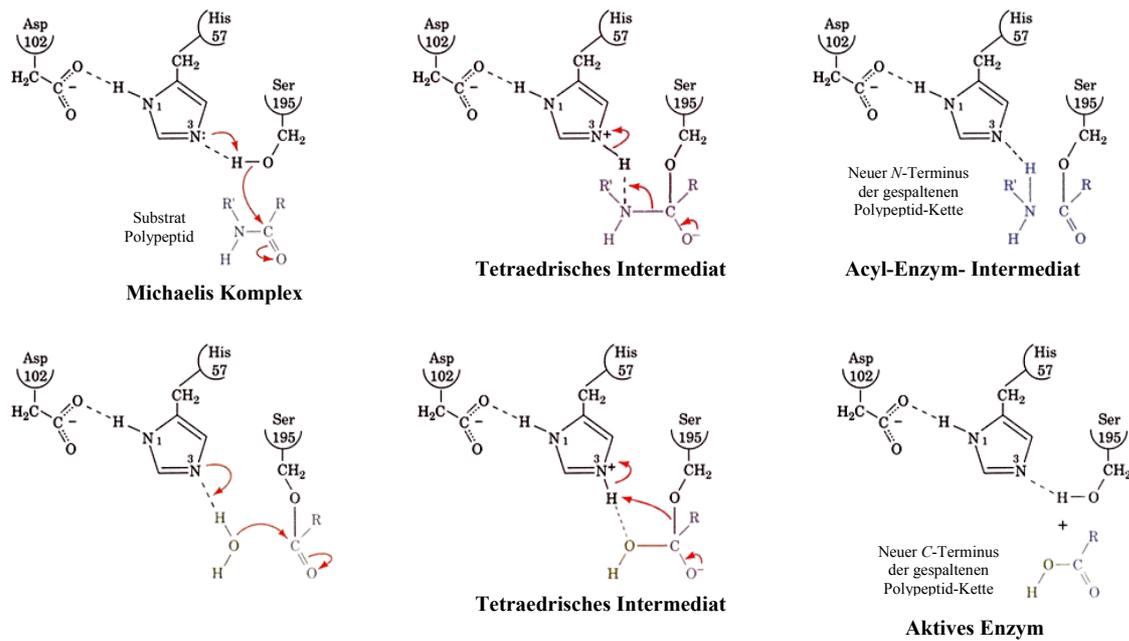


Abbildung 2.7 Der angenommene Mechanismus der Substratspaltung.

2.7 Thrombin-Inhibitoren

Hirudin, ein peptidisches Naturprodukt aus 65 Aminosäuren isoliert aus dem Speichel des Blutegels *Hirudo medicinalis*²⁹, ist der stärkste zur Zeit bekannte Inhibitor des Thrombins. Hirudin bedient sich einer bivalenten Bindungsweise: Die drei N-terminalen Aminosäuren bilden ein paralleles β -Faltblatt mit den Resten Ser214–Gly216 nahe des aktiven Zentrums von Thrombin, gleichzeitig jedoch blockiert der C-terminale Teil von Hirudin die *exosite I*.³⁰ Dieser Bindungsmodus verhilft Hirudin zu einer Dissoziationskonstante im femtomolaren Bereich ($K_i = 0.27$ pM). Somit sind Hirudin und seine kleineren Fragmenten wie zum Beispiel Hirugen ein guter Ersatz für Heparin. Heparin ist ein körpereigenes direktes Koagulans, das in den Mastzellen und den basophilen Granulozyten vorkommt. Es ist ein polyanionisches Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von 6000 – 30000, dessen biologische Bedeutung im menschlichen Körper noch ungeklärt ist. Parenteral zugeführt hemmt es die Blutgerinnung im Wesentlichen durch die Aktivierung von Antithrombin.³¹

Von diesem Standpunkt aus betrachtet scheint Hirudin ein ideales, direkt wirkendes Antikoagulanz zu sein. Für eine Therapie ist allerdings eine ausreichende biologische Halbwertszeit wesentlich wichtiger als eine sehr hohe Dissoziationskonstante. Und die ist beim Hirudin wegen dessen peptidischer Struktur naturgemäß relativ kurz. Ein weiterer

Nachteil ist, dass Hirudin verständlicherweise nicht oral verfügbar ist und deshalb parenteral appliziert werden muss.

Im Gegensatz zu den relativ großen Peptiden sind synthetische, niedermolekulare Inhibitoren in der Lage, nach oraler Gabe absorbiert zu werden. Dementsprechend besteht ein großes Interesse an neuen synthetischen, niedermolekularen Inhibitoren.

Die oben aufgeführten strukturellen Unterschiede sind gerade beim Design von synthetischen Inhibitoren wichtig und werden meist gezielt adressiert, um möglichst selektiv eine spezielle Protease inhibieren zu können. Gerade bei der sehr großen Familie der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen ist die möglichst selektive Inhibition, wie bereits erwähnt, fundamental. Zusätzlich sollte dabei beachtet werden, dass ein idealer, oral verfügbarer *active-site* Inhibitor folgende Eigenschaften haben sollte: ein lange biologische Halbwertszeit, gute Absorption nach oraler Gabe (messbar als Plasmakonzentration der aktiven Verbindung), metabolische Stabilität und eine hohe Affinität gegenüber Thrombin.^{32; 33}

In Hinblick auf Thrombin wurden in den letzten Jahren eine große Anzahl von kleinen synthetischen Thrombin-Inhibitoren mit hoher Affinität entworfen, synthetisiert und getestet, um oral aktive Anticoagulantien zu finden.^{32; 34} Trotz enormen Aufwands war die Suche nach klinisch verfügbaren Stoffen bislang von eher geringem Erfolg gekrönt.

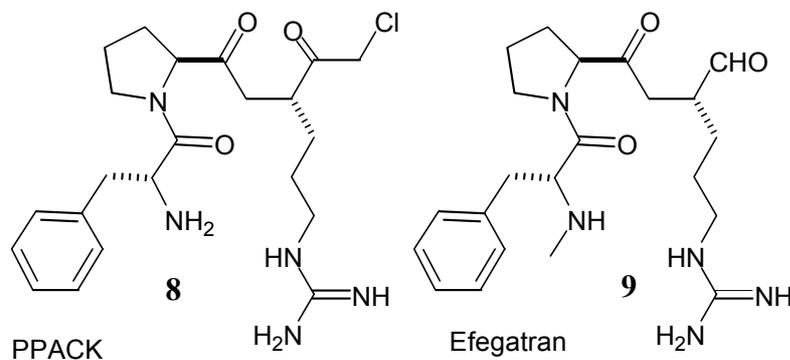


Abbildung 2.8 Elektrophile (kovalente) Thrombin-Inhibitoren. PPACK **8** (D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl) und Efgatran **9** (D-MePhe-Pro-Arg-H).

Eine Herangehensweise an dieses Problem ist der Entwurf von rekombinanten oder synthetischen Derivaten natürlicher peptidischer Inhibitoren wie Hirudin. Die ersten bivalenten, von Hirudin abgeleiteten synthetischen, niedermolekularen Peptidinhibitoren enthielten ein *N*-terminales DFPR-Segment, das, anders als Hirudin, ein substratähnliches antiparalleles β -Faltblatt im aktiven Zentrum von Thrombin bildet.^{35; 36} Ausgehend von dieser

Bedingung wurde das substratanaloge Tripeptid PPACK mit der Sequenz D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl synthetisiert (Abbildung 2.8).^{16; 27; 37}

Das Chloromethylketon reagiert unter Alkylierung des katalytischen His57 in einer irreversiblen Reaktion. Die Ketogruppe des Inhibitors ist dadurch räumlich so günstig platziert, dass es nucleophil von der Hydroxylgruppe des Ser195 angegriffen wird. Aufgrund seiner reaktiven Gruppe ist PPACK allerdings nicht als Therapeutikum geeignet.

Später wurden ausgehend von PPACK weitere dieser elektrophilen Inhibitoren entwickelt. Charakteristisch für diese Inhibitoren ist, wie bei PPACK, eine zusätzliche elektrophile funktionelle Gruppe. Die Hydroxylgruppe des Ser195 kann die elektrophile Gruppe nucleophil angreifen, wobei ein durch Wechselwirkungen mit der Oxyanionentasche des Enzyms stabilisiertes kovalentes Intermediat entsteht. Da diese Inhibitoren mit elektrophilen Carbonylgruppen dem Übergangszustand der Spaltungsreaktion sehr ähnlich sind, werden solche Inhibitoren auch als Übergangszustandsanaloga bezeichnet. Ein Beispiel für einen elektrophilen, reversibel kovalent bindenden Inhibitor³⁸ ist das Tripeptid-aldehyd Efgatran (Abbildung 2.8). Diese Verbindung ist oral verfügbar, besitzt aber den Nachteil einer nicht ausreichenden Selektivität für Thrombin.

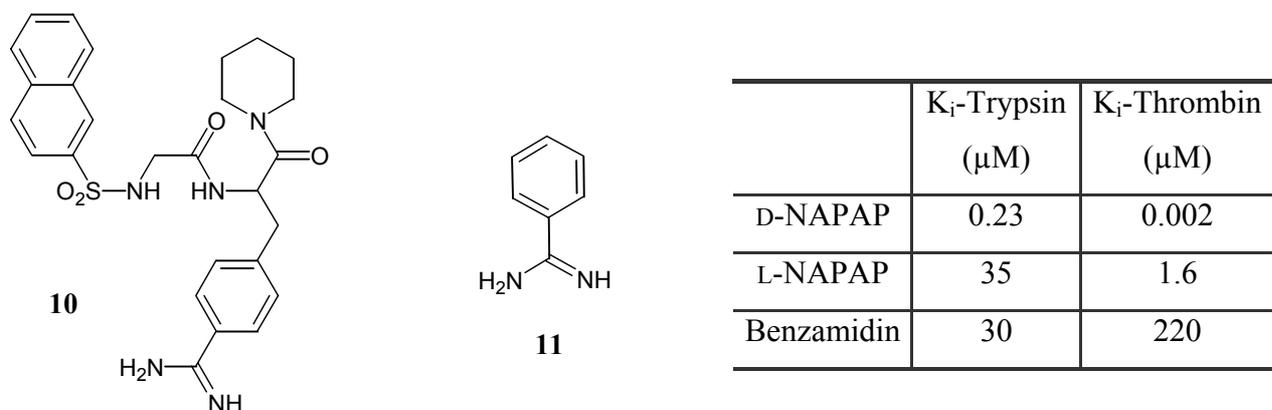


Abbildung 2.9 Der nicht-kovalente Inhibitor NAPAP **10** mit einem Benzamidinrest **11**.

Basierend auf dem Befund, dass sehr kleine basische Moleküle (sogenannte „Nadeln“) wie Benzamidin, die Trypsin schon im mikromolaren Bereich inhibieren und die S₁-Bindetasche besetzen, aber keine ausgeprägte Selektivität gegenüber Thrombin aufweisen, wurden diese „Nadeln“ für eine Erhöhung der Affinität gegenüber Thrombin und für eine erhöhte Selektivität mit verschiedenen peptidähnlichen Strukturen verknüpft. Aufgrund der fehlenden elektrophilen Gruppe zählen diese Inhibitoren zu den nichtelektrophilen Thrombin-

Inhibitoren. Einer der wirkstärkste Vertreter aus der Klasse der niedermolekularen reversiblen Inhibitoren des Thrombins war lange Zeit NAPAP.³⁹ Ein Schwachpunkt von NAPAP ist die mangelnde Thrombinspezifität im Vergleich zu Trypsin.

Die Bindung zum aktiven Zentrum ist entscheidend abhängig von der stereochemischen Konfiguration am chiralen Zentrum der Inhibitoren. Bei der Kokristallisation mit Thrombin wurde NAPAP als racemisches Gemisch eingesetzt. Allerdings zeigte sich, dass im Falle von NAPAP *p*-Amidinophenylalanin als *R*-Aminosäure an die Protease gebunden wird, während das *S*-Isomer um drei Größenordnungen weniger aktiv gegenüber Thrombin ist.

Eine alternative Herangehensweise für das Design neuartiger Thrombin-Inhibitoren stammt aus der Gruppe von Prof. François Diederich. Hierbei wurde mit Hilfe von *De novo*-Design ein relativ rigides Grundgerüst mit einem Benzamidin-Anker entworfen. Abbildung 2.10 zeigt ein Beispiel dieser Substanzklasse.⁴⁰

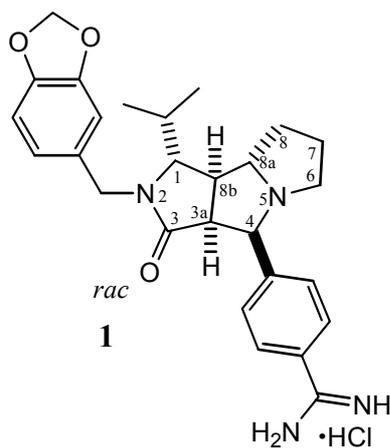


Abbildung 2.10 Beispiel aus der Serie nichtpeptidischer, starrer Thrombin-Inhibitoren, die in der Gruppe von Prof. François Diederich entwickelt wurden.

2.8 Entwicklung und Synthese der Thrombin-Inhibitoren

Aus der neue Klasse sehr aktiver und hoch selektiver Thrombin-Inhibitoren, die von Ulrike Obst in der Gruppe von Prof. François Diederich entwickelt wurden⁴¹, wurden die Liganden **1 - 6** für thermodynamische und strukturelle Untersuchungen in dieser Arbeit ausgewählt (Abbildung 2.11). Zusätzlich wurde noch der Ligand **7** entwickelt, um noch detailliertere Aussagen in Hinblick auf die Selektivitätsunterschiede zwischen Trypsin und Thrombin treffen zu können.

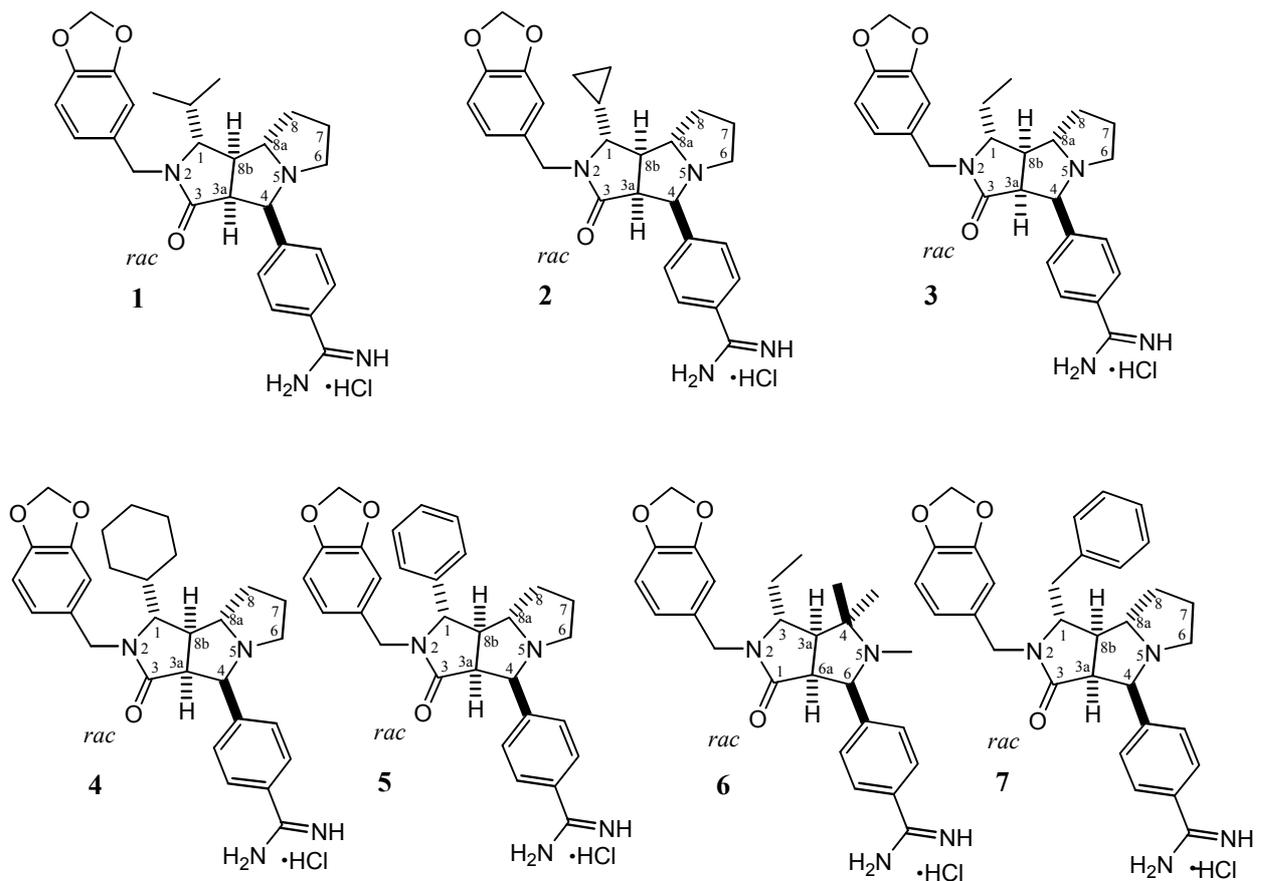


Abbildung 2.11 Die für diese Studie ausgewählten Thrombin-Inhibitoren.

Wie bereits erwähnt, wurden die Inhibitoren mit Hilfe des *De novo*-Designs entwickelt. Für das *De novo*-Design werden hochaufgelöste Röntgenstrukturen benötigt, um durch eine sehr genaue Analyse des aktiven Zentrums des Proteins in Hinblick auf die Bindung eines potentiellen Liganden wichtige Wechselwirkungen zu erkennen und anhand dieser eine neue Leitstruktur zu entwerfen. Die Leitstruktur kann anschließend nach ihrer Synthese und der Bestimmung der Röntgenstruktur ihres Protein-Inhibitor-Komplexes durch Bestimmung der Bindungsaktivität weiter verbessert werden (siehe Abbildung 2.12).

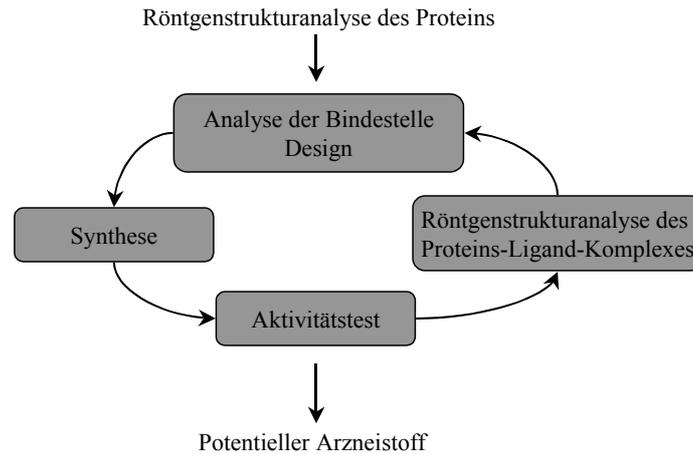


Abbildung 2.12 Der iterative Zyklus zum Design und zur Optimierung einer Leitstruktur.

Beim *De novo*-Design ist es besonders wichtig, sämtliche Typen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu beachten.⁴² Die Protein-Ligand-Wechselwirkungen lassen sich in verschiedene Kategorien einteilen (vergleiche auch Abbildung 2.13):

- Wasserstoffbrücken
- Ionische Wechselwirkungen („Salzbrücken“)
- Metallkomplexierung
- Hydrophobe Wechselwirkung
- Kation- π Wechselwirkung

Die wichtigsten polaren Wechselwirkungen sind hierbei die Wasserstoffbrücken und die ionischen Wechselwirkungen. Metalloproteasen enthalten Kofaktoren wie zum Beispiel Zinkionen, deren Wechselwirkung mit dem Liganden häufig die wichtigsten Beiträge zur Bindungsaffinität liefert. Beiträge zur Bindung resultieren auch, wenn unpolare Teile des Proteins und des Liganden durch hydrophobe Wechselwirkungen miteinander in Kontakt treten. Ungesättigte Ringsysteme geben durch ihre besondere Elektronenverteilung ebenfalls Anlass zu verstärkten Wechselwirkungen. Durch die genaue Betrachtung aller an einer Bindung beteiligten Wechselwirkungen, lassen sich die Ergebnisse jedes Design-Zyklus optimieren.

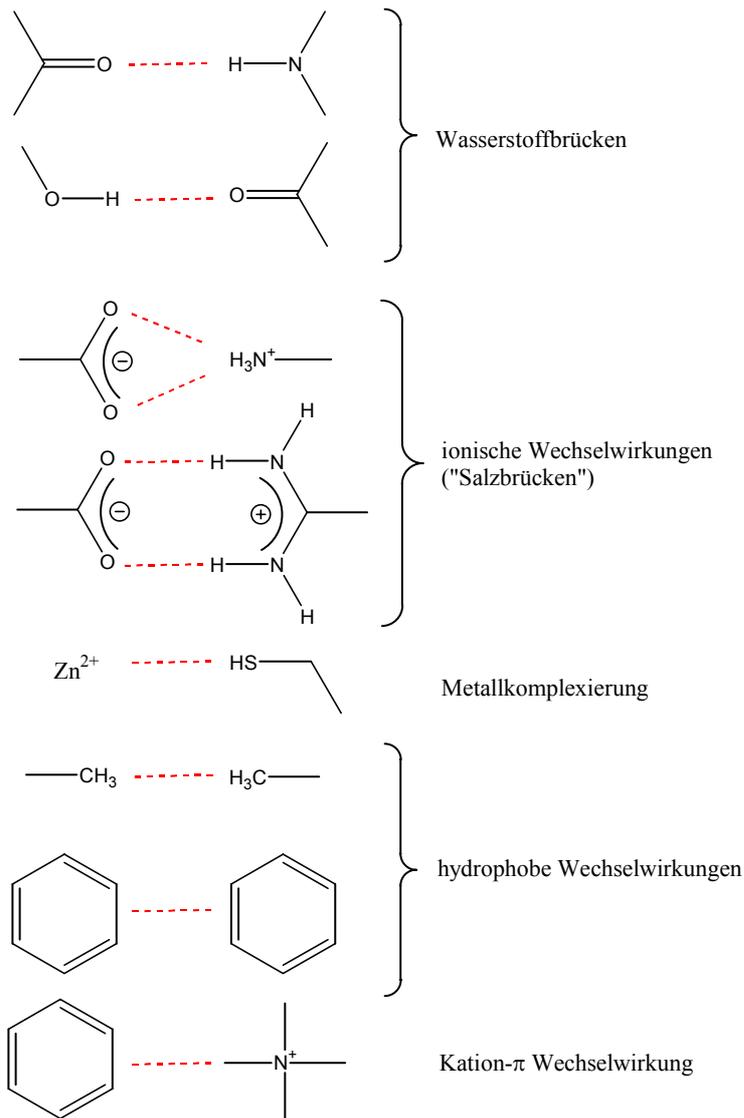


Abbildung 2.13 Häufig auftretende Protein-Ligand-Wechselwirkungen.⁴²

Diese nach mehreren Design-Zyklen und genauer Betrachtung der Protein-Ligand-Wechselwirkungen entwickelten Inhibitoren können durch eine sechsstufige Synthese dargestellt werden (Abbildung 2.14). Im ersten Schritt (a) wird das tricyclische Grundgerüst mit Hilfe einer 1,3-dipolaren Cycloaddition aufgebaut. Es handelt sich dabei um eine [2+3]-Cycloaddition, die unter Beteiligung von 6 π -Elektronen über einen konzertierten Mechanismus verläuft, wobei zwei neue Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen gebildet werden. Dabei kann sowohl das *endo*- als auch das *exo*-Produkt entstehen. Das gewünschte *endo*-Produkt kann mit Hilfe der Säulenchromatographie und mehrfacher Kristallisation abgetrennt werden. Dabei entsteht das gewünschte Produkt als racemisches Gemisch.

Zur Einführung der verschiedenen Reste, die später in die S_2 -Tasche zeigen sollen, wird zuerst die Carbonylgruppe selektiv mit Superhydrid ($\text{Li}[\text{Et}_3\text{BH}]$) reduziert (Schritt b) und

anschließend mit 4-Toluolsulfinsäure (Schritt c) umgesetzt, um eine gute Abgangsgruppe für die darauffolgende Umsetzung mit dem jeweiligen Grignard-Reagenz (Schritt d) zu erzeugen. Anschließend erfolgt die Substitution des aromatischen Bromids durch eine Nitrilgruppe, indem das Edukt zusammen mit 4 Äquivalenten Kupfer(I)cyanid in DMF unter Rückfluss erhitzt wird (Schritt e). Als letzter Schritt (f) folgt die Umwandlung der Nitril- in eine Amidiniumgruppe mit Hilfe einer leicht modifizierten PINNER-Reaktion. Die PINNER-Reaktion ist eine Abfolge von zwei Syntheseschritten. Zunächst addiert sich Methanol unter der katalytischen Wirkung von HCl-Gas, das aus Acetylchlorid freigesetzt wird, an die Nitrilgruppe. Normalerweise erfolgt die Umsetzung zum Amidin mit Ammoniak. Da aber auch cyclische Carbonsäureamid-Gruppen nucleophil durch Ammoniak angegriffen werden, wird eine Variante dieser Reaktion verwendet, bei der die freie Base des intermediären Imidoesters mit Ammoniumchlorid in wässrigem Methanol umgesetzt wird.

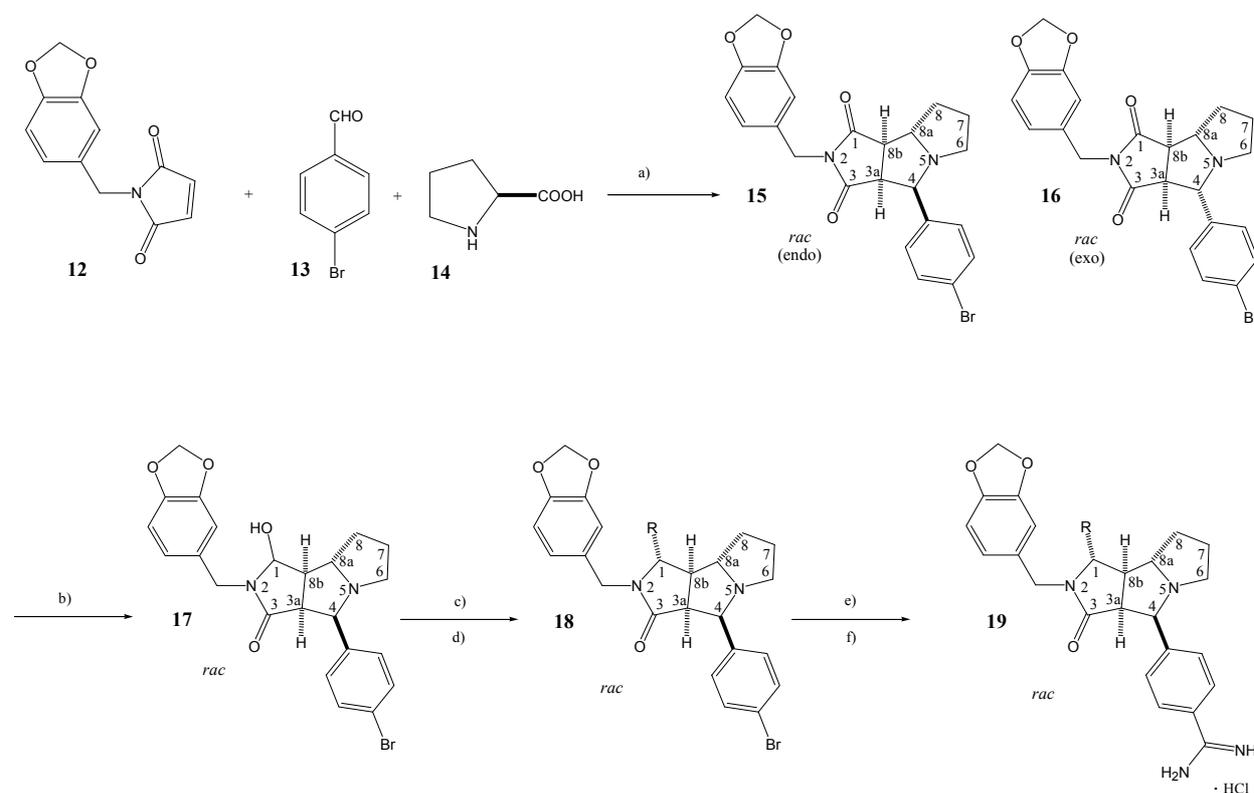


Abbildung 2.14 Synthese der tricyclischen Liganden. a) MeCN, Δ , 18 h, 25 %. b) **15**, Li[Et₃BH], CH₂Cl₂, -78°C \rightarrow 0°C, 30 min, quantitativ. c) 4-Toluolsulfinsäure, CaCl₂, CH₂Cl₂, 20°C, 6 d, 39 %. d) RMgCl, ZnCl₂, 20°C, 40 h. e) CuCN, DMF, Rückfluss, 20 h. f) AcCl, MeOH, CH₂Cl₂, 4°C, 3 d. NH₃, MeOH, 65°C, 3.5 h.

Die Synthese des Liganden **6** erfolgt nach dem gleichen Prinzip. Hierbei wird nur anstatt der Aminosäure L-Prolin die unnatürliche Aminosäure α -Aminoisobuttersäure verwendet. Außerdem ist ein zusätzlicher Schritt notwendig, in dem wird der Stickstoff des Pyrrolidin-

Rings in einer ESCHWEILER-CLARKE-Reaktion (reduktive Aminierung von Formaldehyd mit Ameisensäure als Reduktionsmittel, Schritt b) methyliert (dargestellt in Abbildung 2.15).

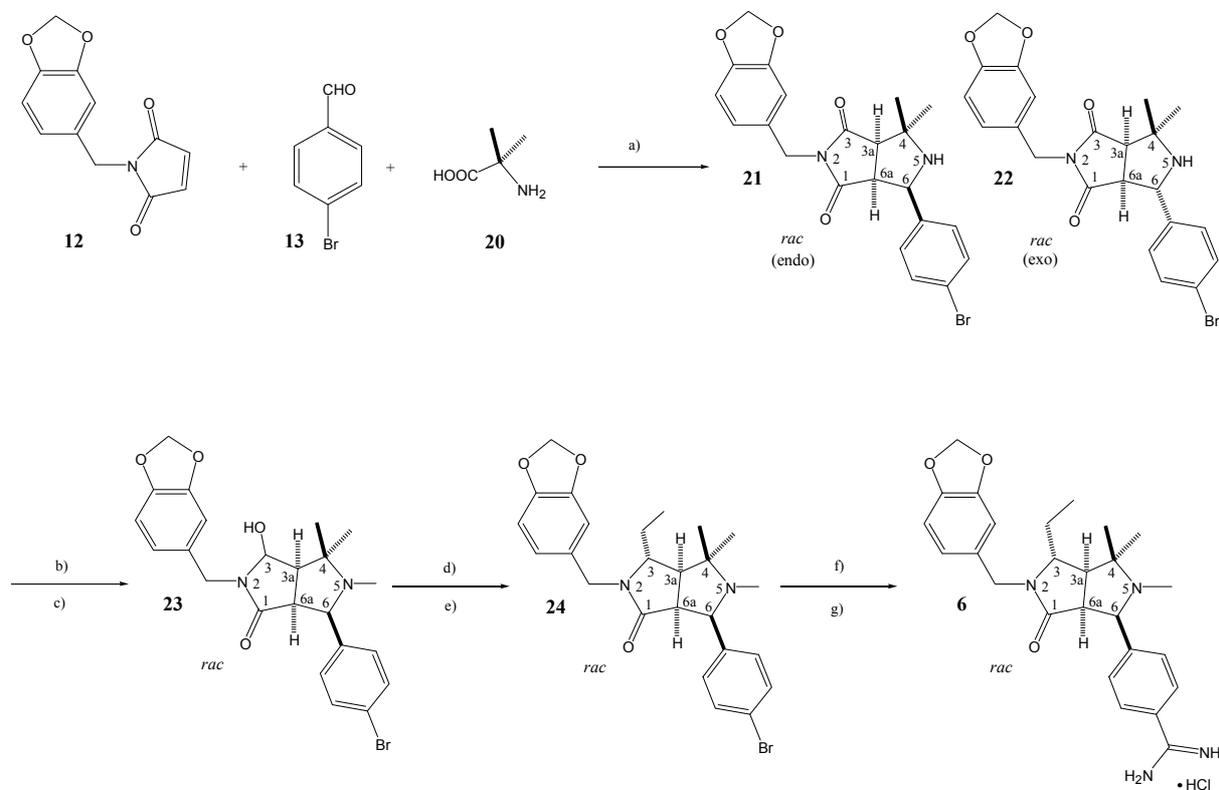


Abbildung 2.15 Synthese der bicyclischen Liganden **6**. a) MeCN, Δ , 18 h, 25 %. b) **21**, Ameisensäure, Formaldehyd, 100°C, 10 h. c) Li[Et₃BH], CH₂Cl₂, -78°C → 0°C, 30 min, quantitativ. d) 4-Toluolsulfinsäure, CaCl₂, CH₂Cl₂, 20°C, 6 d, 39 %. e) EtMgCl, ZnCl₂, 20°C, 40 h. f) CuCN, DMF, Rückfluss, 20 h. g) AcCl, MeOH, CH₂Cl₂, 4°C, 3 d. NH₃, MeOH, 65°C, 3.5 h.

Aufgrund der relativ großen Mengen, die für die thermodynamischen und strukturellen Untersuchungen benötigt wurden, war es nötig, die Synthese der Liganden im Rahmen dieser Arbeit zu wiederholen. Dabei wurde nach dem gleichen Syntheschema die neue Verbindung **7** erstmalig hergestellt und charakterisiert.

2.9 Literatur

1. Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. (1995). Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 247-50.
2. Dodson, G. & Wlodawer, A. (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* 23, 347-352.

3. Matthews, B. W., Sigler, P. B., Henderson, R. & Blow, D. M. (1967). Three-dimensional structure of tosylalpa-chymotrypsin. *Nature* 214, 652-656.
4. Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A. & Chambers, J. L. (1977). Mechanisms of zymogen activation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 177-193.
5. Bode, W. & Huber, R. (1976). Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-terminus of trypsin. *FEBS Lett.* 68, 231-6.
6. Bode, W. (1979). The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. II. The binding of the pancreatic trypsin inhibitor and of isoleucine-valine and of sequentially related peptides to trypsinogen and to p-guanidinobenzoate-trypsinogen. *J. Mol. Biol.* 127, 357-74.
7. Sigler, P. B., Blow, D. M., Matthews, B. W. & Henderson, R. (1968). Structure of crystalline - chymotrypsin. II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J. Mol. Biol.* 35, 143-164.
8. Davie, E. W. (1995). Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb. Haemost.* 74, 1-6.
9. Crook, M. (1990). Platelet prothrombinase in health and disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1, 167-74.
10. Tracy, P. B., Nesheim, M. E. & Mann, K. G. (1981). Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. *J. Biol. Chem.* 256, 743-51.
11. Rosenberg, R. D. & Damus, P. S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* 248, 6490-505.
12. Gonias, S. L. (1992). Alpha 2-macroglobulin: a protein at the interface of fibrinolysis and cellular growth regulation. *Exp. Hematol.* 20, 302-11.
13. Tollefsen, D. M., Majerus, D. W. & Blank, M. K. (1982). Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.* 257, 2162-9.
14. Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J. & Steigema, W. (1974). Structure of complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin-inhibitor. 2. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 89, 73-101.
15. Stubbs, M. T. & Bode, W. (1995). The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem. Sci.* 20, 23-8.
16. Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S. R. & Hofsteenge, J. (1989). The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-

- Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.* 8, 3467-75.
17. Blow, D. M. (1968). Chymotrypsin: tertiary structure and enzymic activity. *Biochem. J.* 110, 2P.
 18. Robertus, J. D., Kraut, J., Alden, R. A. & Birktoft, J. J. (1972). Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. *Biochemistry* 11, 4293-303.
 19. Bode, W. (1979). Aktivierung, Aktivität und Inhibierung des Rindertrypsins. *Naturwissenschaften* 66, 251-258.
 20. Bode, W. & Schwager, P. (1975). The Single Calcium-Binding Site of Crystalline Bovine β -Trypsin. *FEBS Lett.* 56, 139-143.
 21. Di Cera, E., Guinto, E. R., Vindigni, A., Dang, Q. D., Ayala, Y. M., Wuyii, M. & Tulinsky, A. (1995). The Na⁺ Binding Site of Thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 22089-22092.
 22. Evans, H. J. & Sorger, G. J. (1966). Role of Mineral Elements with Emphasis on the Univalent Cations. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17, 47-76.
 23. Suelter, C. H. (1970). Enzymes activated by monovalent cations. *Science* 168, 789-95.
 24. Orthner, C. L. & Kosow, D. P. (1980). Evidence that human alpha-thrombin is a monovalent cation-activated enzyme. *Arch Biochem Biophys* 202, 63-75.
 25. Toney, M. D., Hohenester, E., Cowan, S. W. & Jansonius, J. N. (1993). Dialkylglycine decarboxylase structure: bifunctional active site and alkali metal sites. *Science* 261, 756-9.
 26. Larsen, T. M., Laughlin, L. T., Holden, H. M., Rayment, I. & Reed, G. H. (1994). Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn²⁺, K⁺, and pyruvate. *Biochemistry* 33, 6301-9.
 27. Bode, W., Turk, D. & Karshikov, A. (1992). The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* 1, 426-71.
 28. Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 331-58.
 29. Markwardt, F., Schafer, G., Topfer, H. & Walsmann, P. (1967). [Isolation of hirudin from medicinal leech]. *Pharmazie* 22, 239-41.

30. Rydel, T. J., Tulinsky, A., Bode, W. & Huber, R. (1991). Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J. Mol. Biol.* 221, 583-601.
31. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. & Schäfer-Korting, M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 8., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage edit, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
32. Hauptmann, J. & Sturzebecher, J. (1999). Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside. *Thromb. Res.* 93, 203-41.
33. Kimball, S. D. (1995). Challenges in the development of orally bioavailable thrombin active site inhibitors. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 6, 511-9.
34. Steinmetzer, T., Hauptmann, J. & Sturzebecher, J. (2001). Advances in the development of thrombin inhibitors. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 10, 845-64.
35. Maraganore, J. M., Bourdon, P., Jablonski, J., Ramachandran, K. L. & Fenton, J. W. (1990). Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry* 29, 7095-101.
36. DiMaio, J., Gibbs, B., Munn, D., Lefebvre, J., Ni, F. & Konishi, Y. (1990). Bifunctional thrombin inhibitors based on the sequence of hirudin45-65. *J. Biol. Chem.* 265, 21698-703.
37. Berliner, L. J. (1992). *Thrombin: Structure and function*, Plenum Press, New York, USA.
38. Ripka, W. C. (1997). New thrombin inhibitors in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 242-53.
39. Stürzebecher, J., Walsmann, P., Voigt, B. & Wagner, G. (1984). Inhibition of bovine and human thrombins by derivatives of benzamidine. *Thromb. Res.* 36, 457-467.
40. Sanderson, P. E. J. (1999). Small, Noncovalent Serine Protease Inhibitors. *Med. Res. Rev.* 19, 179-197.
41. Obst, U., Betschmann, P., Lerner, C., Seiler, P., Diederich, F., Gramlich, V., Weber, L., Banner, D. W. & Schönholzer, P. (2000). Synthesis of Novel Nonpeptidic Thrombin Inhibitors. *Helv. Chim. Acta* 83, 855-909.
42. Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H. (1996). *Wirkstoffdesign*, Spektrum-Verlag, Heidelberg.

3 Grundlagen und Ergebnisse

3.1 Kristallstrukturanalyse

3.1.1 Proteinkristallisation und Bewertung der Kristallqualität

Alle Kristallisationsexperimente wurden nach der Technik des *hanging drops* angesetzt. Für ein Liganden-*soaking* geeignete Trypsin-Kristalle wurden bei 18°C und mit einer Proteinkonzentration von 60 mg/mL in Ammoniumsulfat/MES-Puffer bei pH 6.0 gezüchtet. Parallel wurden Kristallisationsversuche bei 4°C und 22°C durchgeführt. Die bei 4°C erhaltenen Kristalle hatten eine geschlossene hexagonale Raumgruppe und waren somit nicht für ein *soaking* geeignet. Bei 22°C entstanden größere Kristalle, die jedoch offensichtlich mehr Baufehler aufwiesen. Um gut streuende und möglichst perfekte Kristalle, die gut streuen und keine allzu großen Baufehler aufweisen, zu erhalten, wurde die Technik des *macroseeding* angewandt. Für die anschließende Behandlung mit Glutaraldehyd wurden möglichst klare, mittelgroße Kristalle ohne sichtbare Baufehler ausgewählt. Diese wurden in eine Lösung aus Ammoniumsulfat/MES-Puffer (pH 6.0), die mit Calciumchlorid gesättigt war und 1.25 % Glutaraldehyd enthielt, überführt. Durch das Glutaraldehyd werden die Proteinmoleküle an der Kristalloberfläche quervernetzt und somit stabilisiert. Die so behandelten Kristalle konnten in eine MES/PEG 8000-Lösung überführt werden, die den einzulagernden Ligand enthielt. Trotz der vorangehenden Quervernetzung wurden die Kristalle regelmäßig überprüft, da sie mit der Zeit an Qualität verloren und sich teilweise nach einigen Stunden (maximal 12 h) langsam auflösten. Zuletzt wurden die Kristalle in einen *cryo*-Puffer überführt und für die anschließende Röntgenstrukturanalyse eingefroren.

Bei jeder Kokristallisation von Trypsin mit einem Liganden wurde ein *screening* mit verschiedenen Ammoniumsulfat- und PEG 8000-Konzentrationen sowie mindestens zwei pH-Werten durchgeführt, da die optimalen Kokristallisationsbedingungen stark vom Liganden abhängen. Es wurden möglichst klare, mittelgroße Kristalle ohne sichtbare Baufehler ausgewählt, in den *cryo*-Puffer überführt und für die anschließende Röntgenstrukturanalyse eingefroren.

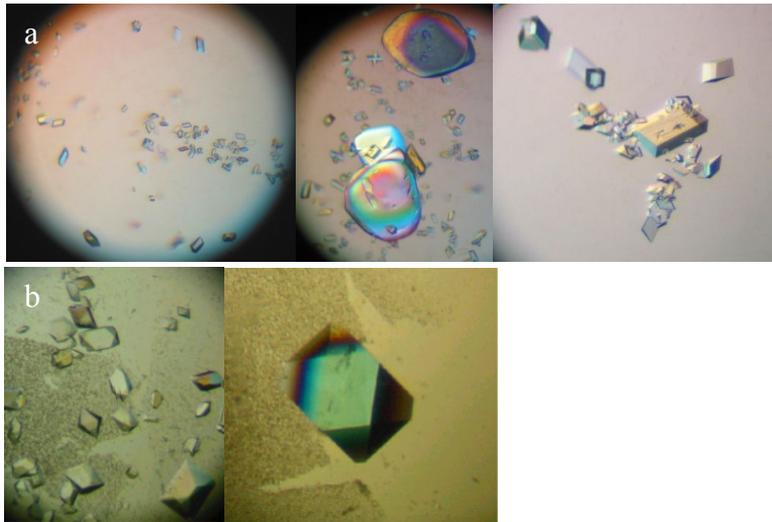


Abbildung 3.1 Kristalle von Thrombin (a) und Trypsin (b) im polarisierten Licht.

Die Kristallisation des humanen α -Thrombin war nur bei 4°C möglich. Dabei war es wichtig, dass reines α -Thrombin zum Einsatz kam, wobei sich α -Thrombin der Firma Haemochrom als besonders geeignet erwies. Für die Thrombin-Kristallisation wurde ein Phosphatpuffer bei pH 7.5 verwendet. Um eine für das *soaking* geeignete Molekülpackung zu erreichen, war bei der Kristallisation von Thrombin im Gegensatz zu Trypsin eine Blockierung der *exosite* mit einem Hirudin-Fragment notwendig. Dadurch wird das Thrombin in eine Packung gezwungen, die die Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums über einen Wasserkanal im Kristall ermöglicht. Die anfänglich entstandenen Mikrokristalle mussten durch mehrfaches *macroseeding* vergrößert werden. Kristalle mit einer Größe von mindestens 0.1 x 0.1 x 0.1 mm³ streuten bereits bis mindestens 3 Å, größere Kristalle zeigten ein Diffraktionsvermögen bis 2 Å (siehe Abbildung 3.2).

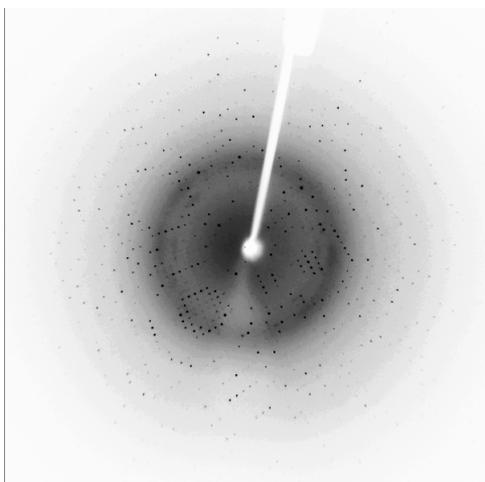


Abbildung 3.2 Beugungsbild eines Thrombin-Kristalls mit einer Auflösung von 1.78 Å.

Bei Thrombin wurde beobachtet, dass die Kristalle bei Verwendung eines *cryo*-Puffers sofort an Streuqualität verloren. Die Reservoir-Lösung ließ sich aber nur dann als *cryo*-Puffer verwenden, wenn die Kristalle direkt in einen *loop* aufgenommen, am Gerät in den Stickstoff-Strom überführt und danach auf dem Goniometerkopf des Röntgendiffraktometers montiert wurden. Durch längeren Transport in flüssigem Stickstoff und anschließender Montage ergab sich das Problem, dass eine so große Menge gefrorenen Wassers auf der Kristalloberfläche eingefangen wurde, das im Beugungsbild Eisringe erkennbar waren. Auch bei Verwendung der Reservoir-Lösung als *cryo*-Puffer bildeten sich Eisringe, vor allem wenn der *loop* zu groß gewählt wurde und zu viel Reservoir-Lösung im *loop* verblieb. Dies ließ sich zum einen durch kleinere *loops* und zum anderen durch vorsichtiges Abtupfen der Lösung im *loop* auf einem Deckgläschen verhindern.

Die Aufnahme aller Beugungsdaten erfolgte anschließend bei einer Wellenlänge von 1.5418 Å ($K\alpha$ -Strahlung der Kupferanoden). Abhängig von der vom Steuerprogramm des Diffraktometers ermittelten Messstrategie wurden zwischen 120 und 300 Bilder in Schritten von 0.5° bei einer Belichtungszeit von 2 - 10 (meist 5) min aufgenommen. Die Belichtungszeit wurde dabei entsprechend der Streukraft des Kristalls gewählt.

3.1.2 Interpretation der Trypsin-Kristallstrukturen

Von den Liganden **1**, **2**, **3**, **5**, **6** und **7** wurden die Kristallstrukturen im Komplex mit Trypsin bestimmt, wobei mit Ausnahme des Komplexes mit Ligand **5** alle Komplexe mit Hilfe des *soaking*-Verfahren erhalten wurden. Der Komplex mit Ligand **5** wurde dagegen durch Kokristallisation erzeugt, da auch nach langem *soaking* keine Differenzelektronendichte für den Liganden in der Bindetasche zu erkennen war. Trotz intensiven Bemühungen war es nicht möglich, den Ligand **4** im Komplex mit Trypsin zu erhalten. Als problematisch erwies sich vor allem die sehr schlechte Löslichkeit des Liganden und die Tatsache, dass sich die Trypsin-Kristalle in Gegenwart von Ligand **4** erheblich schneller auflösten als mit den anderen Liganden. Dies konnte auch durch Quervernetzung des kristallisierten Proteins mit Glutaraldehyd nicht verhindert werden. Bei Kristallisationsexperimenten zeigte das Protein in Anwesenheit von Ligand **4** eine starke Tendenz zur Präzipitation, was auch eine geringere Proteinkonzentration oder bei Verwendung einer Trypsin-L99Y-Mutante nicht vermieden werden konnte. Diese Trypsin-Mutante wurde im Arbeitskreis von Armida Di Fenza

verwendete und es war bekannt, dass sie sich in einigen Fällen wesentlich besser zur Kokristallisation eigneten als das native Trypsin.

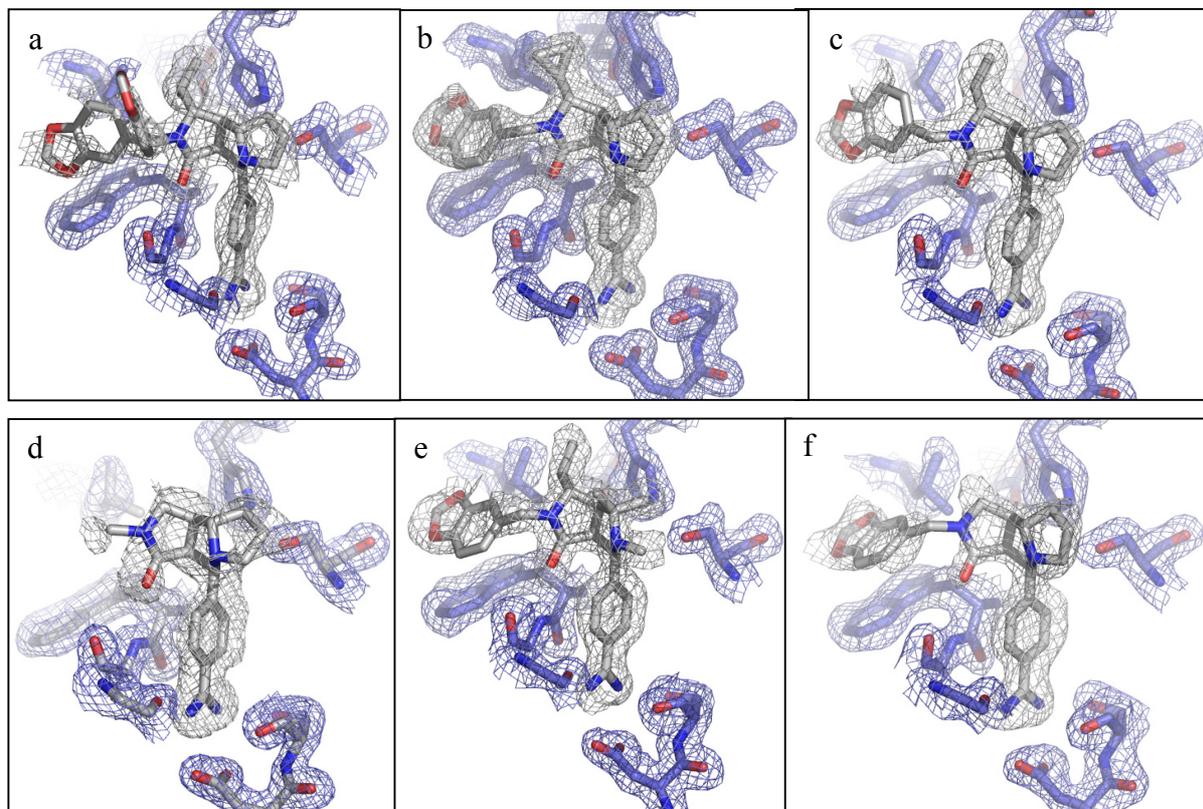


Abbildung 3.3 Die F_0-F_c Elektronendichten ($\sigma = 2.5$) für die Liganden **1** (a), **2** (b), **3** (c), **5** (d), **6** (e) und **7** (f) und die $2F_0-F_c$ Elektronendichten ($\sigma = 1.5$) für die wichtigsten Aminosäuren in der Bindetasche von Trypsin.

Die Analyse der Datensätze für die Komplexe, die durch das *soaking* erhalten wurden, ergab, dass das Trypsin in der für das *soaking* günstigen orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ kristallisierte und jeweils nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit enthielt. Im Fall des Liganden **5** kristallisierte das Trypsin dagegen in der trigonalen Raumgruppe $P3_121$. Für alle Liganden ist die Elektronendichte der Aminosäuren in der Bindetasche gut definiert. Die Elektronendichte der Liganden ist, außer für **5**, zumindest für den Benzamidinanker und das starre Grundgerüst gut definiert. Die Elektronendichte ist für die Piperonylgruppe für alle Liganden nur teilweise definiert, für Ligand **5** war die Dichte so schlecht charakterisiert, dass die Piperonylgruppe nicht eingebaut werden konnte. Offensichtlich liegt diese Gruppe in mehreren Orientierungen vor, so dass auch die entsprechenden B-Faktoren signifikant höhere Werte aufweisen als das benachbarte starre Grundgerüst und den Benzamidinanker. Darauf deutet zusätzlich noch hin, dass sich für den Ligand **1** zwei unterschiedliche Konformationen (mit einer Besetzung von 34 bzw. 66 %) für die Piperonylgruppen verfeinern ließen. Für die

Liganden **1**, **2**, **3** und **6** ist die Elektronendichte für die verschiedenen Alkylreste am Bi- bzw. Trizyklus gut definiert. Für die anderen beiden Liganden (**5**, **7**) lässt sich hier keine signifikante Differenzdichte zuweisen, entsprechend konnten die Arylreste nicht eingebaut werden.

In Tabelle 3.1 sind die durchschnittlichen B-Werte, aufgeteilt nach unterschiedlichen Komplexkomponenten, für die Trypsin-Komplexe aufgeführt. Für das gesamte Protein unterschieden sich die Werte nur geringfügig, abgesehen von dem Komplex mit Ligand **5**, für den deutlich niedrigeren B-Werte verfeinert werden. Interessanterweise wurden die Kristalle mit Ligand **5** über Kokristallisation gewonnen und nehmen eine andere Raumgruppe ein. Die B-Werte für die einzelnen Liganden liegen in einem Bereich zwischen 36.2 und 42.3 Å². Für die in den Modellen enthaltenen Wassermoleküle unterscheiden sich die B-Werte geringfügig stärker (27.4 bis 37.2 Å²).

Tabelle 3.1 Durchschnittliche B-Werte für die Trypsin-Komplexe.

	Ligand 1	Ligand 2	Ligand 3	Ligand 5	Ligand 6	Ligand 7
Durchschnittlicher B-Wert Protein (Å ²)	21.6	22.7	21.4	18.5	22.8	21.3
Hauptkette (Å ²)	18.0	18.9	17.7	14.7	18.3	16.7
Seitenkette (Å ²)	23.8	24.9	23.6	20.9	24.5	20.7
Ligand (Å ²)	36.2	37.1	42.3	42.0	37.9	40.1
Wasser (Å ²)	30.8	32.8	31.6	27.4	37.2	36.5

Alle Liganden bilden Komplexgeometrien mit Trypsin, die sich sehr ähnlich sind. Da sich die meisten Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand in allen sechs Komplexen stark ähneln, wird zunächst auf einige, allen Inhibitoren gemeinsame Eigenschaften eingegangen. Bei der Bindung der Liganden werden insgesamt jeweils dreizehn Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängt, während zwei Wassermoleküle nahezu unverändert bleiben und ein weiteres um ca. 1.8 Å verschoben wird. Eines der verdrängten Wassermoleküle wird dabei direkt von der Carbonylgruppe der Liganden ersetzt. Diese Betrachtung bezieht sich auf die Struktur 1S0Q des unkomplexierten Trypsins in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ und die bis zu einer Auflösung von 1.02 Å bestimmt werden konnte.

Die basische Benzamidingruppe ist tief in der S₁-Spezifitätstasche des Trypsins vergraben. Die beiden Stickstoffatome der Benzamidingruppe bilden mit den Sauerstoffatomen der Carboxylseitenkette des Asp189 eine zweizählige symmetrische Salzbrücke. Weiterhin

wird diese Gruppe durch Wasserstoffbrücken des einen Stickstoffatoms zum Carbonylsauerstoffatom von Gly219 und das andere zur Hydroxylgruppe des Ser190 stabilisiert (siehe Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5).

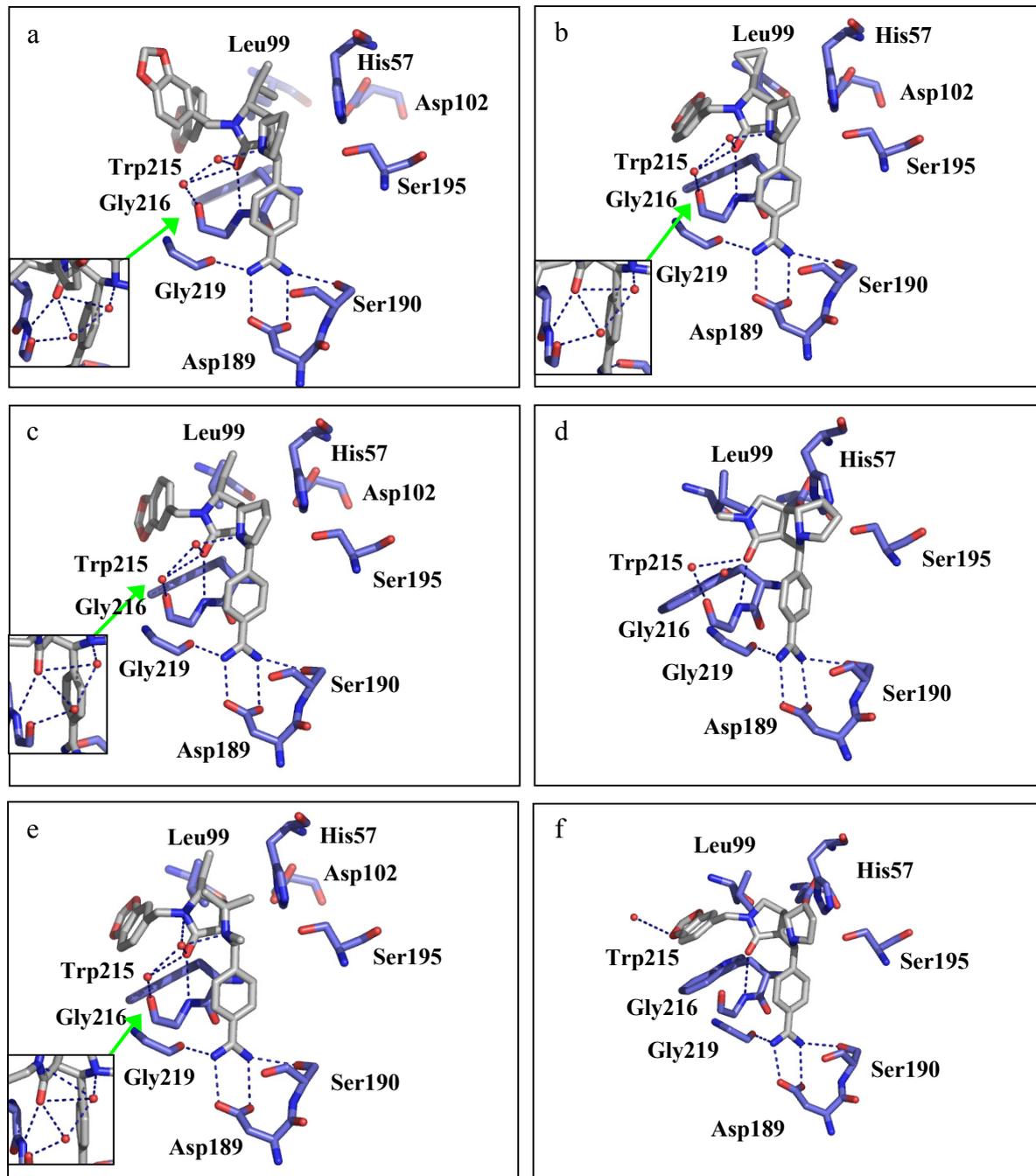


Abbildung 3.4 Wechselwirkungen der Liganden 1 (a), 2 (b), 3 (c), 5 (d), 6 (e) und 7 (f) mit Trypsin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien (blau) und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt. Für die Liganden 1 (a), 2 (b), 3 (c) und 6 (e) sind die Wasserstoffbrücken in Bereich der Aminosäure Gly216 in einem kleinen Bild noch einmal in einer anderen Orientierung dargestellt.

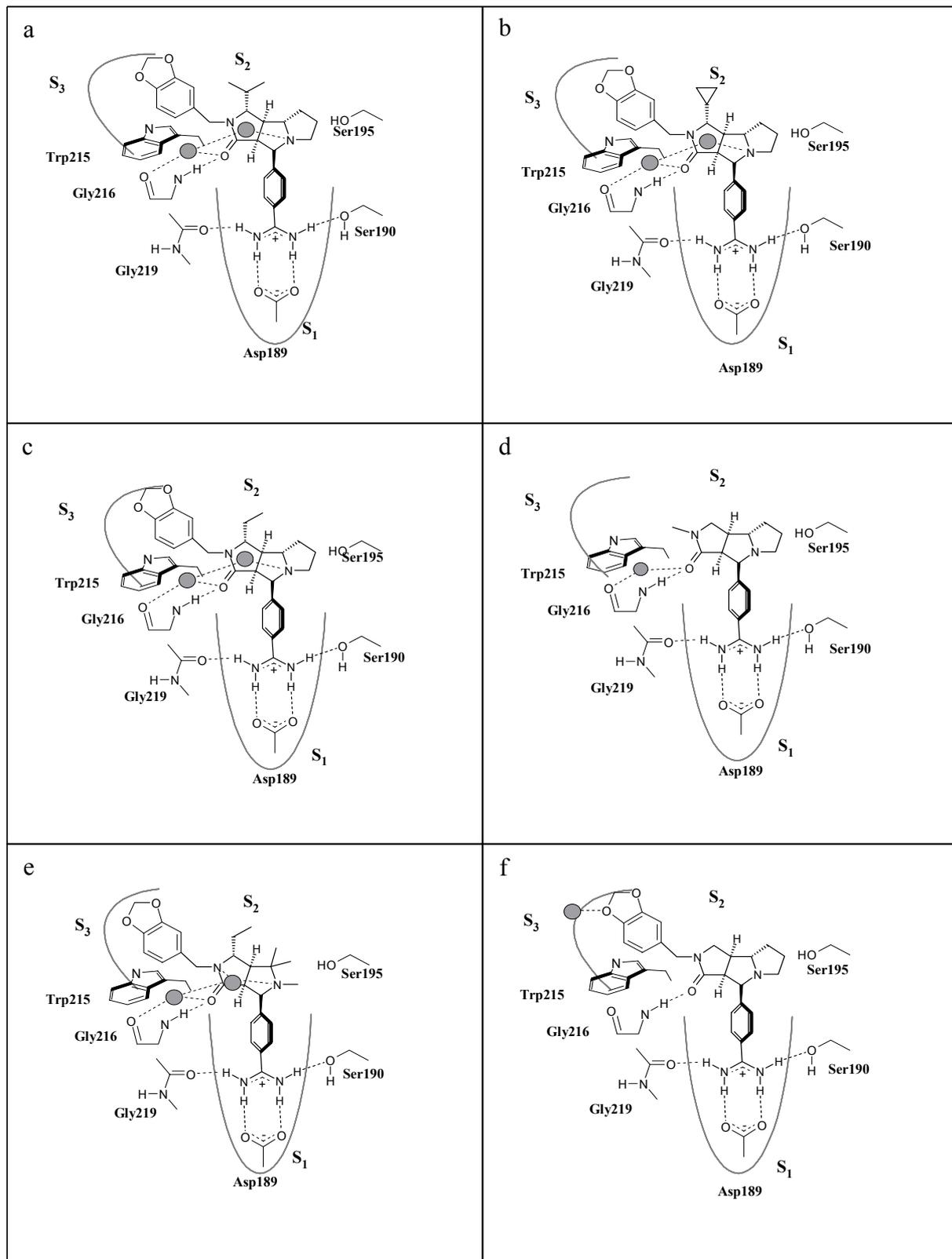


Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen der Liganden 1 (a), 2 (b), 3 (c), 5 (d), 6 (e) und 7 (f) mit Trypsin (die in der Elektronendichte nicht erkennbare Seitenkette in 5 und 7 wurden weggelassen). Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien und die Wassermoleküle als graue Kugeln dargestellt.

Die Carbonylgruppe der Liganden bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem Stickstoffatom des Gly216. Bei den Liganden **1**, **2**, **3** und **6** sind jeweils noch zwei Wassermoleküle anwesend, mit welchen die Carbonylgruppe des jeweiligen Liganden je eine Wasserstoffbrücke bildet. Diese Wassermoleküle formen eine Wasserstoffbrücke untereinander. Schließlich geht eines der Wassermoleküle eine Wasserstoffbrücke mit dem tertiären Stickstoffatom der Liganden ein, das andere eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoffatom des Gly216. Die beiden Wassermoleküle sind in der Struktur von Ligand **5** ebenfalls enthalten, jedoch ist eines der beiden Wassermoleküle hier weiter als 4 Å von möglichen Wasserstoffbrückenpartnern entfernt und liegt somit für eine Wasserstoffbrücke in zu weiter Distanz.

Die unterschiedlichen Alkylreste binden in die kleinere S₂-Tasche, eine analoge Anordnung lässt sich für die beiden Arylreste der Liganden **5** und **7** annehmen. Diese Reste waren in der Elektronendichte nicht zu charakterisieren.

Die Piperonylgruppe besetzt die S₃-Aromatenbindetasche, wobei ihr Benzolring in einem Teil der gefundenen Orientierungen eine nahezu senkrechte Ausrichtung (Ligand **1** und **2**) zum Indolring des Trp215 einnimmt, aber auch im Falle des Liganden **7** eine π-π-Stapelwechselwirkung mit Trp215 eingeht.

Insgesamt bilden alle Liganden zusätzlich zu der zweizähligen symmetrischen Salzbrücke jeweils mindestens vier Wasserstoffbrücken aus. Die Liganden **1**, **2** und **3** gehen jeweils noch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke ein, der Ligand **6** sogar zwei. Eines der beiden Wassermoleküle (das rechte Wassermolekül in Abbildung 3.5e) ist im Falle des Liganden **6** so nah am zweiten Stickstoffatom, dass hier auch noch eine Wasserstoffbrücke geformt werden kann (Wasserstoffbrücke bis 2.5 Å, schwache Wasserstoffbrücke bis 3.6 Å). Bei den Liganden **5** und **7** lässt sich aus den Kristallstrukturen keine genaue Aussage über die Gesamtzahl der Wasserstoffbrücken treffen, da bei Ligand **5** nur für den Benzamidinanker und das Grundgerüst die Elektronendichte gut definiert ist, bei Ligand **7** ist zusätzlich noch die Piperonylgruppe definiert, aber auch hier fehlt der Arylrest. Die Anzahl der Van-der-Waals-Wechselwirkungen liegt zwischen 67 und 93. Die geringste Anzahl wurde für Ligand **5**, die höchste für Ligand **7** ermittelt. Die anderen liegen mit 75 (Ligand **1** und **6**), 78 (Ligand **2**) und 79 (Ligand **3**) zwischen **5** und **7** als Extrema.

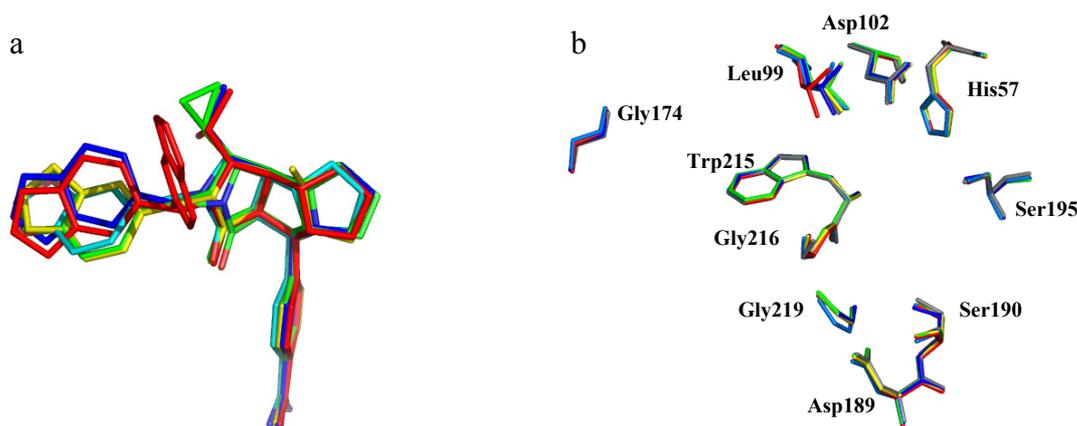


Abbildung 3.6 Überlagerung aller sechs der Liganden (a) und der wichtigsten Aminosäuren der Bindetasche der Trypsin-Komplexe.

Eine Überlagerung der Liganden in den sechs Trypsin-Komplexen anhand der C_α-Koordinaten der benachbarten Atome (mit einem Radius von ca. 8 Å) zeigt nur geringe Unterschiede in der Orientierung der Benzamidingruppen und des starren Grundgerüsts. Ebenso ist deutlich zu sehen, dass sich die Orientierung der Alkylgruppen, die in die S₂-Tasche weisen, relativ ähnlich ist. Die größten Unterschiede zeigen sich in der jeweiligen Anordnung der Piperonylgruppe.

Auch die Überlagerung der verbleibenden Proteinstrukturen zeigt nur relativ geringe Unterschiede. Die folgenden Betrachtungen beziehen sich jeweils auf die Überlagerung der Trypsin-Komplexe auf den Komplex von Trypsin mit Ligand **1** als Referenz mit Hilfe des Programms ProFit 2.3¹. In Bezug auf den Komplex von Trypsin mit Ligand **1** zeigt der Komplex mit Ligand **2** einen rmsd-Wert von 0.09 Å, mit Ligand **3** einen rmsd-Wert von 0.13 Å, mit Ligand **5** einen rmsd-Wert von 0.30 Å, mit Ligand **6** einen rmsd-Wert von 0.08 Å und mit Ligand **7** einen rmsd-Wert von 0.20 Å. In Bezug auf die Aminosäuren in der Bindetasche der Komplexe **1** und **2** zeigt nur Leu99 eine deutliche Abweichung mit einem rmsd-Wert von 0.24 Å. Das gleiche gilt für die Komplexe **3** und **6**, wobei die rmsd-Werte für diese Reste bei 0.22 Å und 0.24 Å liegen. Bei dem Komplex mit Ligand **5** zeigt Leu99 mit 0.26 Å die übliche Abweichung, aber zusätzlich ist auch bei den anderen Aminosäuren eine Abweichung von mehr als 0.1 Å zu sehen. Bei Ligand **7** zeigen die Aminosäuren Leu99 (0.35 Å) und Asn97 (0.55 Å) eine deutliche Abweichung. Abgesehen von der Bindetasche fallen vor allem Abweichungen im Bereich der Autolyseschleife auf. Die Autolyseschleife wird von den Aminosäuren Trp141 bis Asp153 bestimmt.

3.1.3 Interpretation der Thrombin-Kristallstrukturen

Von den Liganden **2**, **3** und **6** wurden die Kristallstrukturen im Komplex mit Thrombin bestimmt, wobei sämtliche Komplexe durch Kokristallisation erhalten wurden. Es war nicht möglich, die Komplex durch *soaking* zu erhalten, obwohl die Zeitdauer des *soakings*, die Konzentration der Liganden und die Mischungsverhältnisse mit der Reservoir-Lösung variiert wurden. Auch bei der Kokristallisation mit den Liganden **4**, **5** und **7** erwies sich die schlechte Löslichkeit der Liganden als Problem. Trotz mehrfachen *seedings* war es für diese Liganden nicht möglich, Kristalle zu züchten, die ein nennenswertes Kristallwachstum in allen drei Dimensionen zeigten, was Voraussetzung für die Bildung von Kristallen mit ausreichendem Streuvermögen ist.

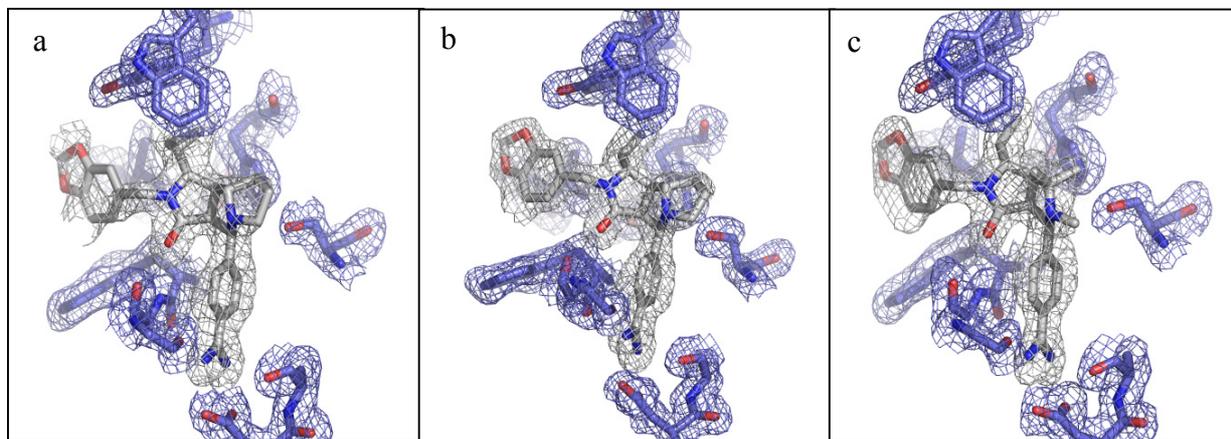


Abbildung 3.7 Die F_o-F_c Elektronendichten ($\sigma = 2.5$) für die Liganden **2** (a), **3** (b) und **6** (c) und die $2F_o-F_c$ Elektronendichten ($\sigma = 1.5$) für die wichtigsten Aminosäuren in der Bindetasche von Thrombin.

Die Analyse der Datensätze für die Komplexe ergab, dass das Thrombin in der monoklinen Raumgruppe C2 kristallisierte und jeweils nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit enthielt. Für alle Liganden ist die Elektronendichte der Aminosäuren in der Bindetasche gut definiert, ebenfalls ist die gesamte Elektronendichte der Liganden gut ausgeprägt. Lediglich die Elektronendichte um die Piperonylgruppe für Ligand **2**, ist nur teilweise definiert. Offensichtlich ist diese Gruppe in Thrombin wesentlich weniger ungeordnet als in Trypsin.

In Tabelle 3.2 sind die durchschnittlichen B-Werte, aufgeteilt nach unterschiedlichen Komplexkomponenten, für die Thrombin-Komplexe aufgeführt. Für das gesamte Protein unterscheiden sich die Werte für Ligand **2** und **6** nur geringfügig, für den Komplex mit Ligand **3** ist der B-Wert deutlich niedriger. Die B-Werte für die einzelnen Liganden liegen ebenfalls in einem sehr weiten Bereich zwischen 18.3 und 36.1 Å². Für die in den Modellen

enthaltenen Wassermoleküle unterscheiden sich die B-Werte dagegen wesentlich geringfügiger (33.3 bis 36.3 Å²).

Tabelle 3.2 Durchschnittliche B-Werte für die Thrombin-Komplexe.

	Ligand 2	Ligand 3	Ligand 6
Durchschnittlicher B-Wert Protein (Å ²)	27.2	19.6	31.7
Hauptkette (Å ²)	24.3	16.6	29.2
Seitenkette (Å ²)	30.2	22.5	34.2
Ligand (Å ²)	36.1	18.3	29.4
Wasser (Å ²)	33.3	34.8	36.3

Alle drei Liganden bilden mit Thrombin sehr ähnliche Komplexgeometrien. Da sich die meisten Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand für alle drei Komplexe stark ähneln, soll auch hier zunächst auf einige, allen Inhibitoren gemeinsame Eigenschaften eingegangen werden. Bei der Bindung der Liganden werden jeweils sechs Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängt, während ein Wassermolekül nahezu unverändert an seiner Position verbleibt. Diese Betrachtung bezieht sich auf die Struktur 1HXF des nur mit einer Hirudin-Variante komplexierten Thrombins, dessen Bindetasche keine Inhibitoren enthält. Sie konnte in der Raumgruppe C2 und einer Auflösung von 2.1 Å bestimmt werden.

Die basische Benzamidingruppe ist tief in der S₁-Spezifitätstasche des Thrombins vergraben. Die beiden Stickstoffatome der Benzamidingruppe bilden mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette des Asp189 eine zweizählige symmetrische Salzbrücke. Weiterhin wird diese Gruppe durch Wasserstoffbrücken des einen Stickstoffatoms zum Carbonylsauerstoffatom von Gly219 fixiert (siehe Abbildung 3.8).

Die Carbonylgruppe der Liganden bildet zwei Wasserstoffbrücken, die eine zum Stickstoffatom des Gly216 und die andere zum Carbonylsauerstoffatom des Gly216.

Die unterschiedlichen Alkylreste binden in die kleinere S₂-Tasche.

Die Piperonylgruppe besetzt die S₃-Aromatenbindetasche, wobei jeweils ein Sauerstoffatom je eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des Tyr60D und zu einem Wassermolekül bildet.

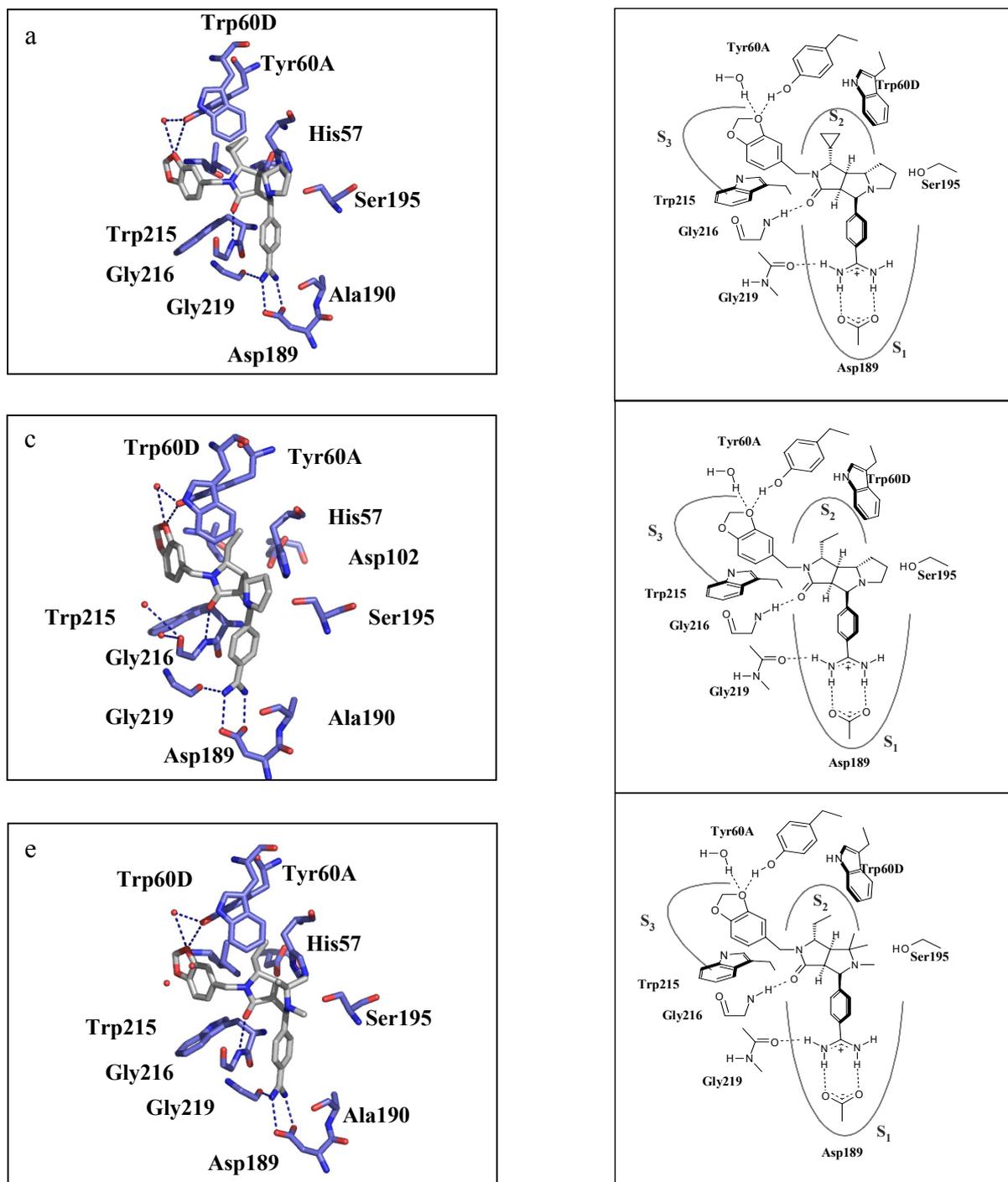


Abbildung 3.8 Wechselwirkungen des Liganden **2** (a, b), **3** (c, d) und **6** (e, f) mit Thrombin. Links sind die Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien (blau) und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt. Rechts sind die Wechselwirkungen schematisch dargestellt mit den Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien und den Wassermoleküle als grauen Kugeln.

Insgesamt bildet alle Liganden zusätzlich zu der zweizähligen Salzbrücke vier Wasserstoffbrücken aus. Die Anzahl der Van-der-Waals-Wechselwirkungen liegt zwischen 89 (Ligand **2**) und 93 (Ligand **3**). Ligand **6** liegt mit 91 Van-der-Waals-Wechselwirkungen dazwischen.

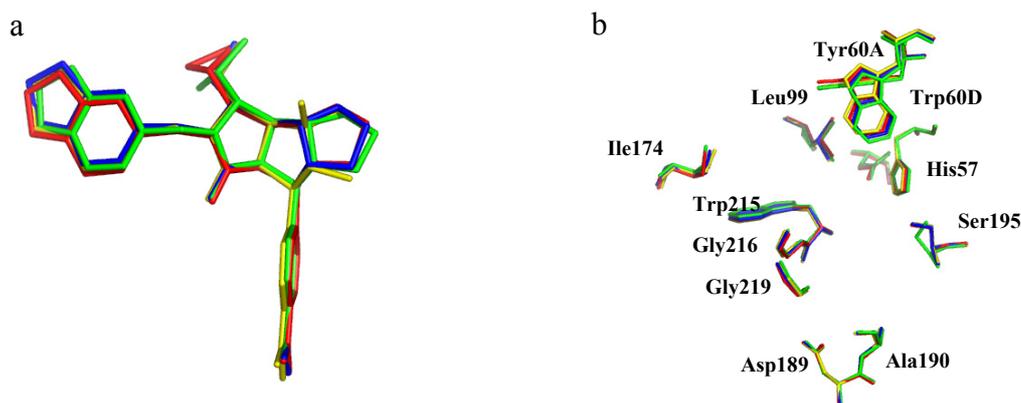


Abbildung 3.9 Überlagerung der Liganden (a) und der wichtigsten Aminosäuren der Bindetasche der Thrombin-Komplexe. Die Überlagerung enthält zusätzlich die Struktur von Ligand **1** dazugenommen, die schon von Obst *et al.*² gelöst worden war.

Eine Überlagerung der Liganden in den vier Thrombin-Komplexen anhand der C_{α} -Koordinaten der benachbarten Atome (mit einem Radius von ca. 8 Å) zeigt nur geringe Unterschiede in der Orientierung der Benzamidingruppen und des starren Grundgerüsts. Es fällt auf, dass die Alkylreste und die Piperonylgruppe ebenfalls nur geringe Unterschiede aufweisen.

Eine Überlagerung der gesamten Proteinstrukturen zeigt, dass auch hier die Unterschiede nur gering sind. Die folgenden Betrachtungen beziehen sich jeweils auf die Überlagerung der Thrombin-Komplexe auf den Komplex von Thrombin mit Ligand **1** als Referenz mit Hilfe des Programms ProFit 2.3¹. In Bezug auf den Komplex von Thrombin mit Ligand **1** zeigt der Komplex mit Ligand **2** einen rmsd-Wert von 0.23 Å, mit Ligand **3** einen rmsd-Wert von 0.19 Å und mit Ligand **6** einen rmsd-Wert von 0.23 Å. Beim Vergleich der Aminosäuren in der Bindetasche zeigen vor allem die Aminosäuren des 60er-Loops eine deutliche Abweichung mit einem rmsd-Wert von 0.23 Å bis 0.64 Å für Ligand **2**, 0.21 bis 0.53 Å für Ligand **3** und 0.18 bis 0.53 Å für Ligand **6** auf. Zusätzlich fällt ein deutlicher Unterschied zwischen Ser195 des Thrombin-Komplexes mit Ligand **1** zum Ser195 der anderen (rmsd-Wert für Ligand **2**: 0.44 Å, rmsd-Wert für Ligand **3**: 0.47 Å und rmsd-Wert für Ligand **6**: 0.50 Å). Die übrigen Aminosäuren in der Bindetasche besitzen einen rmsd-Wert unter 0.2 Å. In allen Strukturen ist für die Aminosäuren Trp148 bis Lys149E keine Elektronendichte zu sehen, so dass diese Aminosäuren nicht in das Modell eingebaut werden konnten. Diese Aminosäuren befinden sich nicht in unmittelbarer Nähe der Bindetasche an der Oberfläche des Proteins.

3.1.4 Weitere Thrombin-Kristallstrukturen

Thrombin im Komplex mit CRC220

Der Thrombin-Inhibitor CRC220 von der Firma Chiron-Behring (Marburg) war bereits Grundlage früherer thermodynamischer Studien.³ Aufgrund der vielen drehbaren Bindungen handelt es sich um einen sehr flexiblen Inhibitor. Da ein Vergleich eines flexiblen Inhibitors mit einem der starren Liganden aus den hier vorgestellten Studien in Hinblick auf die thermodynamischen Daten sehr interessant erscheint, wurde die Struktur von CRC220 im Komplex mit Thrombin gelöst. Die entsprechende Struktur im Komplex mit Trypsin wurde schon von Frank Dullweber im Rahmen seiner thermodynamischen Studien gelöst (PDB-Code 1K1N).³ Weiterhin wurde ein entsprechender Komplex von Stüber *et al.*⁴ beschrieben, allerdings wurden keine Koordinaten hinterlegt.

Die Kristallstruktur im Komplex mit Thrombin wurde, wie die anderen Thrombin-Strukturen, durch Kokristallisation erhalten.

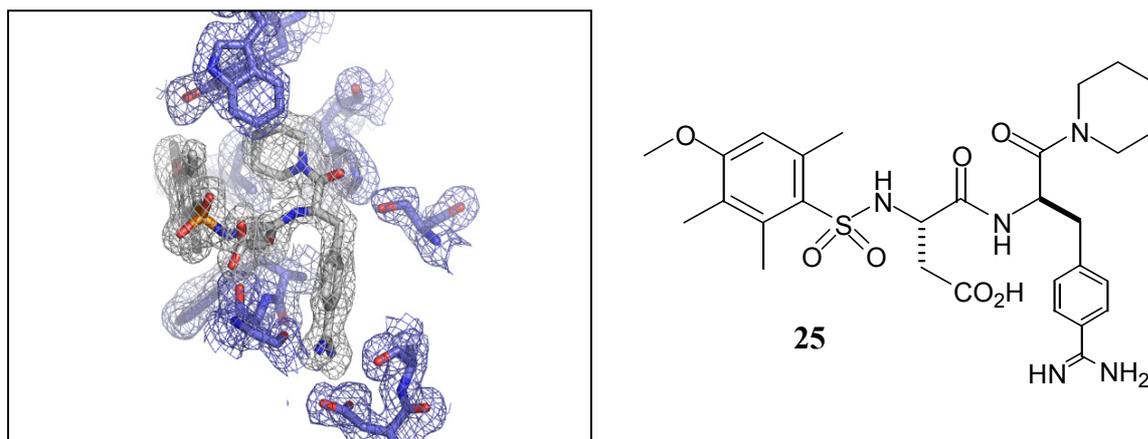


Abbildung 3.10 Die $F_o - F_c$ Elektronendichte ($\sigma = 2.5$) für CRC220 und die $2F_o - F_c$ Elektronendichte ($\sigma = 1.5$) für die wichtigsten Aminosäuren in der Bindetasche von Thrombin.

Die Analyse der Diffraktionsdaten dieses Komplexes ergab, dass das Thrombin in der monoklinen Raumgruppe $C2$ kristallisierte mit jeweils nur einem Molekül pro asymmetrischer Einheit. Die Elektronendichte der Aminosäuren in der Bindetasche ist wie bei den anderen Thrombin-Strukturen gut definiert. Die Elektronendichte des Liganden ist ebenfalls gut definiert.

In Tabelle 3.3 sind die durchschnittlichen B-Werte, aufgeteilt nach unterschiedlichen Komplexkomponenten, für den Thrombin-Komplex von CRC220 im Vergleich mit dem

Komplex von Ligand **2** aufgeführt. Abgesehen vom B-Wert für den Liganden unterscheiden sich die B-Werte nur unwesentlich.

Tabelle 3.3 Durchschnittliche B-Werte für die Thrombin-Komplexe.

	Ligand 2	CRC220
Durchschnittlicher B-Wert Protein (\AA^2)	27.2	24.4
Hauptkette (\AA^2)	24.3	21.5
Seitenkette (\AA^2)	30.2	27.3
Ligand (\AA^2)	36.1	20.1
Wasser (\AA^2)	33.3	31.3

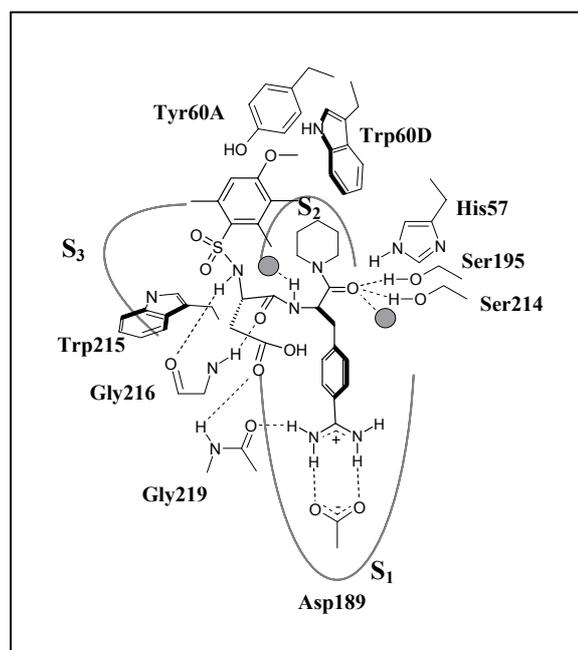
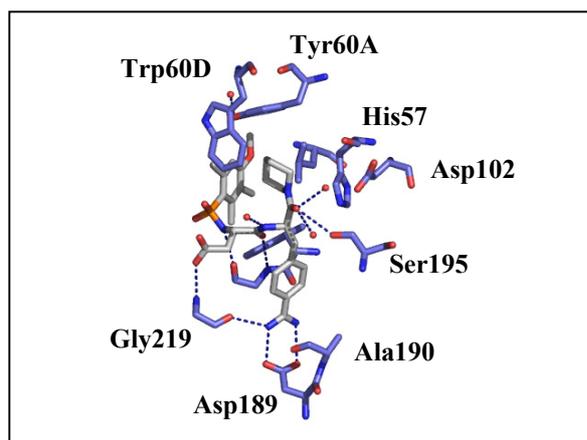


Abbildung 3.11 Wechselwirkungen des Liganden CRC220 mit Thrombin. Links sind die Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien (blau) und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt. In der schematischen Darstellung (rechts) sind die Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien und die Wassermoleküle als graue Kugeln repräsentiert.

Die Komplexgeometrie mit Thrombin unterscheidet sich signifikant von derjenigen mit den zuvor besprochenen Liganden. Einige der Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand sind dennoch sehr ähnlich.

Die basische Benzamidingruppe ist, wie bei den anderen Liganden, tief in der S₁-Spezifitätstasche des Thrombins vergraben. Die beiden Stickstoffatome der

Benzamidingruppe bilden mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette des Asp189 eine zweizählige symmetrische Salzbrücke. Weiterhin wechselwirkt diese Gruppe durch Wasserstoffbrücken des einen Stickstoffatoms zum Carbonylsauerstoffatom von Gly219 (siehe Abbildung 3.11).

Die zentrale Carbonylgruppe des Liganden bildet eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom des Gly216.

Eines der beiden Sauerstoffatome der Aspartylseitenkette des Inhibitors formt (mit dem anti *lone-pair*) eine schwache Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom der Seitenkette von Gly219.

Die Sauerstoffatome der Sulfonylgruppe orientieren sich eindeutig von der Thrombinoberfläche weg und stehen in Richtung des umgebenden Wassers. In der Kristallstruktur sind allerdings keine lokalisierten Wassermoleküle in der Nachbarschaft zu diesen beiden Sauerstoffatomen in der Elektronendichte zu erkennen. Folglich ist diese Gruppe wahrscheinlich von in der Röntgenstruktur nicht aufgelösten, nicht zu lokalisierenden Wassermolekülen umgeben. Der Phenylring, der die S₃-Aromatenbindetasche ausfüllt, steht nahezu senkrecht zum Indolring des Trp215.

Der C-terminale Piperidinring interkaliert zwischen dem Phenylring des Inhibitors und dem Imidazolring des His57 und füllt so die S₂-Tasche aus, ohne jedoch direkte Van-der-Waals-Kontakte mit diesen Ringsystemen einzugehen. Zusätzlich kann die benachbarte Carbonylgruppe Wasserstoffbrücken zur Hydroxylgruppe des Ser195, zur Hydroxylgruppe des Ser214 und zu einem Wassermolekül formen. Aus der Elektronendichte ist nicht ersichtlich, welche Wasserstoffbrücken geformt werden. Legt man Distanzkriterien zugrunde, kann davon ausgegangen werden, dass diese Carbonylgruppe wenigstens durch zwei direkte Wasserstoffbrücken stabilisiert wird.

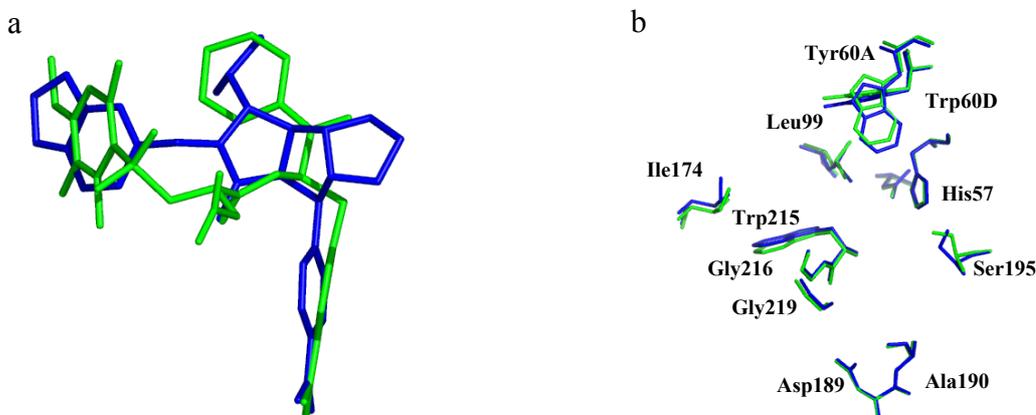


Abbildung 3.12 Überlagerung des Liganden (a) und der wichtigsten Aminosäuren der Bindetasche mit der Struktur von Ligand 1.

Die Überlagerung der CRC-Thrombin-Struktur mit dem Komplex von Ligand **1** anhand der C_{α} -Koordinaten der benachbarten Atome (mit einem Radius von ca. 8 Å) zeigt zwar einige Unterschiede zwischen den Liganden, aber trotzdem ist der Bindungsmodus relativ ähnlich. Der Piperidinring weist wie der Isopropylrest in die S_2 -Tasche und auch der aromatische Ring wird, wie der Piperonylrest des Liganden **1**, in der S_3 -Tasche gebunden und nimmt dort eine vergleichbare Orientierung ein.

Die folgenden Betrachtungen beziehen sich jeweils auf die Überlagerung des CRC-Thrombin-Komplexes auf den Komplex von Thrombin mit Ligand **1** als Referenz mit Hilfe des Programms ProFit 2.3¹. Eine Überlagerung der Proteinstrukturen von Thrombin im Komplex mit CRC220 und Ligand **1** zeigt, dass hier die Unterschiede nur relativ gering sind (rmsd-Wert von 0.23 Å). Beim Vergleich der Aminosäuren in der Bindetasche zeigen vor allem die Aminosäuren des 60er-*Loops* eine deutliche Abweichung mit einem rmsd-Wert von 0.19 Å bis 0.52 Å. Zusätzlich fällt ein deutlicher Unterschied in der Orientierung von Ser195 auf (rmsd-Wert 0.49 Å). Die übrigen Aminosäuren in der Bindetasche weisen Abweichungen mit einem rmsd-Wert unter 0.20 Å auf. In allen Strukturen ist für die Aminosäuren Trp148 bis Lys149E keine Elektronendichte zu erkennen, so dass diese Aminosäuren nicht in das Modell eingebaut werden konnten. Diese Aminosäuren befinden sich nicht in unmittelbarer Nähe der Bindetasche an der Oberfläche des Proteins.

Thrombin im Komplex mit RA-1008 und RA-1014^{5; 6}

Zusätzlich zu den bisher besprochenen Kristallstrukturen wurden die Strukturen mit zwei neuen Thrombin-Inhibitoren gelöst. Es handelt sich dabei um selektive Inhibitoren auf der Basis von Cyanopeptiden. Cyanopeptide sind sekundäre Metabolite der Cyanobakterien mit interessanten biologischen Aktivitäten⁷ wie Antitumor-⁸, kardioaktiven⁹ und immunosuppressiven¹⁰ Effekten. Eine beträchtliche Anzahl von nichttoxischen Cyanopeptiden inhibiert Mitglieder der Familie der Serinproteasen¹¹ und ist somit aus pharmakologischer Sicht von großem Interesse. Die hier vorgestellten Inhibitoren wurden ausgehend von Aeruginosin 98-B aus *Microcystis aeruginosa* als Leitstruktur entwickelt (siehe Abbildung 3.13).

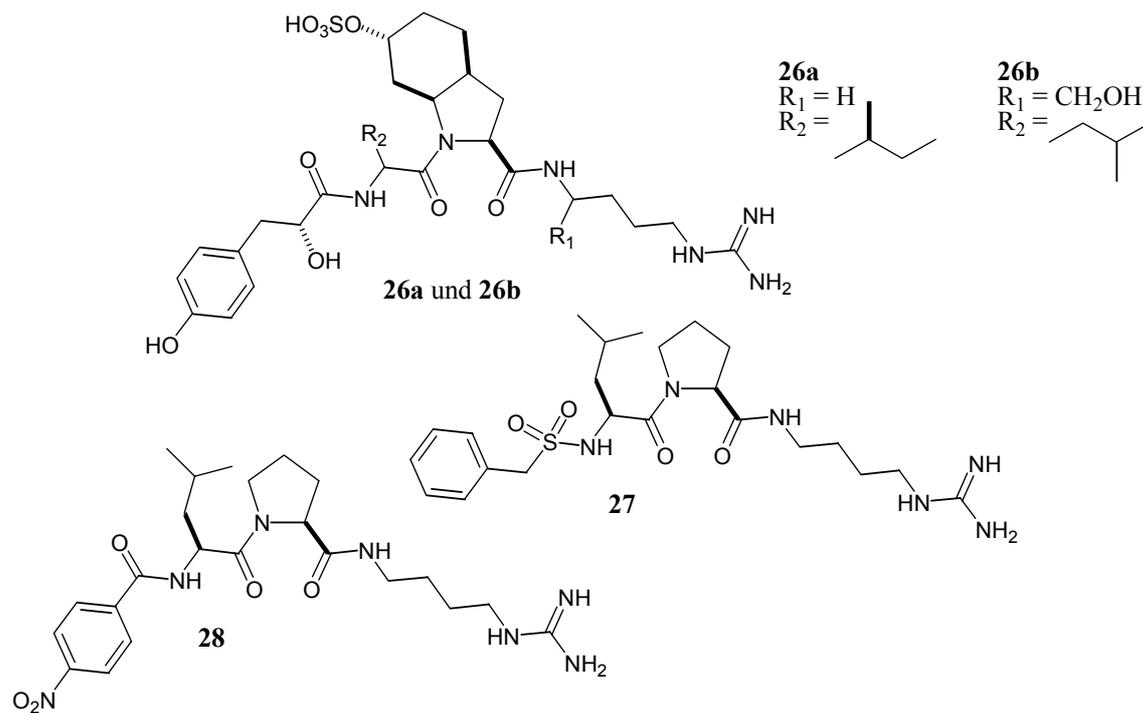


Abbildung 3.13 Die Leitstruktur Aeruginosin 98-B aus *Microcystis aeruginosa* **26a** und die beiden daraus abgeleiteten Thrombin-Inhibitoren RA-1008 **27** und RA-1014 **28**.

Der neu entwickelte Inhibitor RA-1008 besitzt gegenüber Thrombin einen K_i -Wert von $10.6 \mu M$, der Inhibitor RA-1014 einen K_i -Wert von $1.9 \mu M$.

Die Kristallstrukturen im Komplex mit Thrombin wurden wie die anderen Thrombin-Strukturen durch Kokristallisation erhalten.

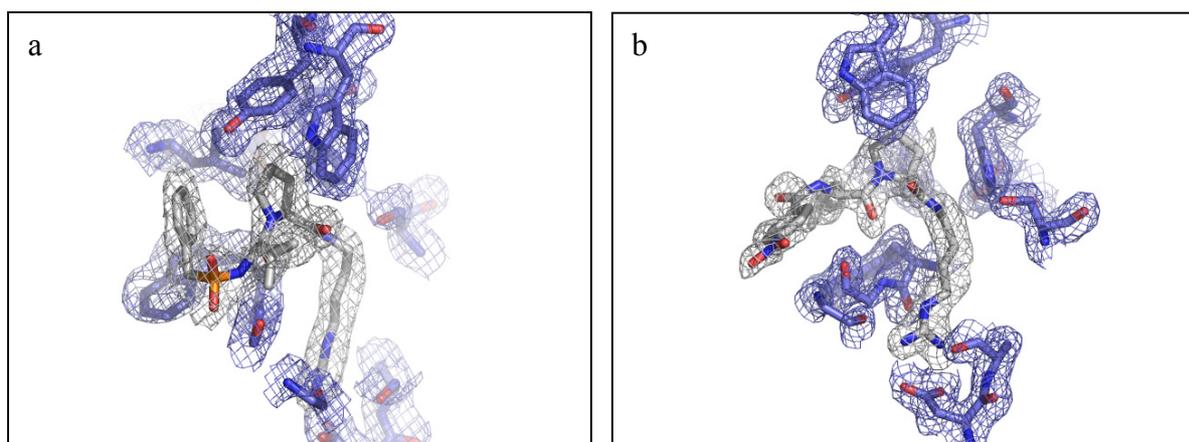


Abbildung 3.14 Die F_0 - F_c Elektronendichten ($\sigma = 2.5$) für die Liganden RA-1008 **27** (a) und RA-1014 **28** (b) und die $2F_0$ - F_c Elektronendichten ($\sigma = 1.5$) für die wichtigsten Aminosäuren in der Bindetasche von Thrombin.

Die Analyse der Datensätze für die Komplexe ergab, dass das Thrombin in der monoklinen Raumgruppe C2 kristallisierte und jeweils nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit enthielt. Für beide Liganden ist die Elektronendichte der Aminosäuren in der Bindetasche gut definiert. Die Elektronendichte der Liganden ist ebenfalls gut definiert, mit Ausnahme des mit der Nitrogruppe substituierten Aromaten, dessen Elektronendichte nicht vollständig zu erkennen ist.

In Tabelle 3.4 sind die durchschnittlichen B-Werte, aufgeteilt nach unterschiedlichen Komplexkomponenten, für die Thrombin-Komplexe mit den Cyanopeptidanaloga aufgeführt. Für das gesamte Protein unterscheiden sich die Werte für die beiden Liganden um etwa 4 \AA^2 . Die B-Werte für die einzelnen Liganden liegen in einem noch weiteren Bereich zwischen 27.5 und 46.1 \AA^2 . Für das Wasser unterscheiden sich die B-Werte dagegen wesentlich weniger (32.3 bis 33.4 \AA^2).

Tabelle 3.4 Durchschnittliche B-Werte für die Thrombin-Komplexe.

	RA-1008 (27)	RA-1014 (28)
Durchschnittlicher B-Wert Protein (\AA^2)	26.4	30.6
Hauptkette (\AA^2)	23.6	27.5
Seitenkette (\AA^2)	29.2	33.6
Ligand (\AA^2)	27.5	46.1
Wasser (\AA^2)	32.3	33.4

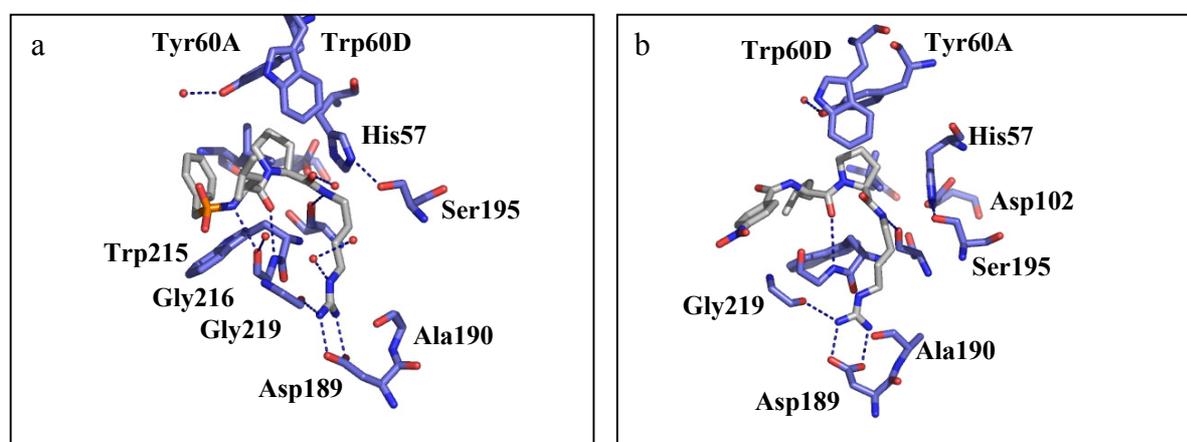


Abbildung 3.15 Wechselwirkungen der Liganden RA-1008 27 (a) und RA-1014 28 (b) mit Thrombin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien (gelb) und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.

Beide Liganden bilden Komplexgeometrien mit Thrombin, die sich im Bereich der S_1 -Spezifitätstasche sehr ähnlich sind, ansonsten nehmen sie deutlich unterschiedliche Bindungsmoden ein.

Die basische Guanidiniumgruppe ist tief in der S_1 -Spezifitätstasche des Thrombins vergraben. Die beiden Stickstoffatome der Guanidiniumgruppe bilden mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette des Asp189 eine zweizählige Salzbrücke. Weiterhin wird diese Gruppe durch eine Wasserstoffbrücke des einen Stickstoffatoms zum Carbonylsauerstoffatom von Gly219 stabilisiert. Im Falle von RA-1008 bildet das N_ϵ -Stickstoffatom des Agmatinrestes eine weitere Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül (siehe Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16).

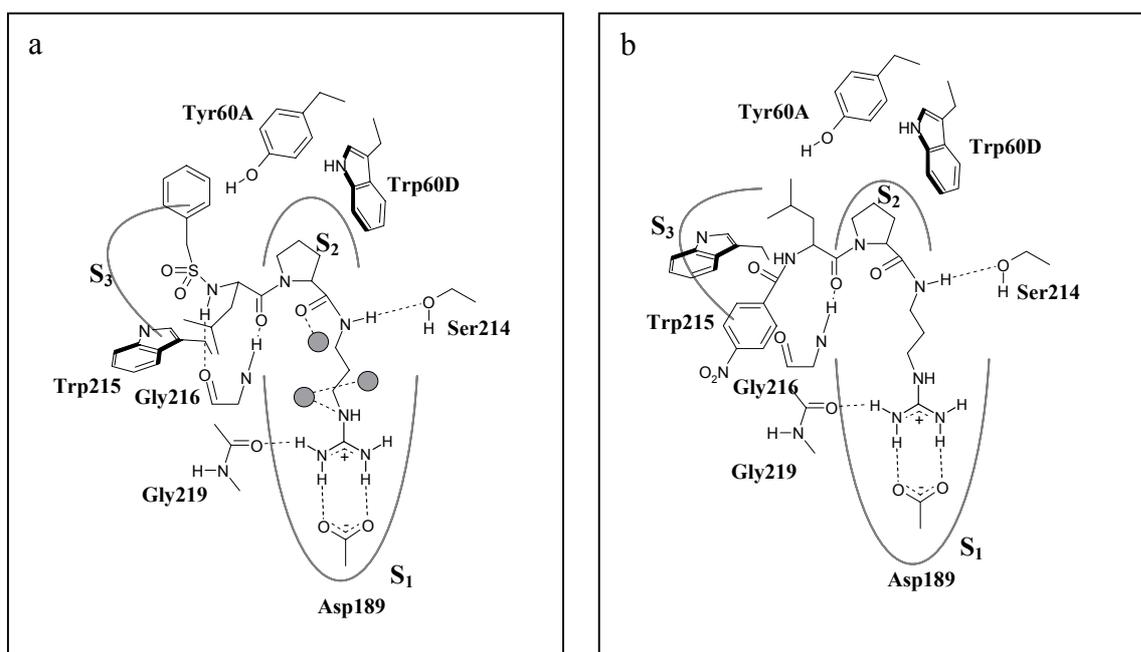


Abbildung 3.16 Schematische Darstellung der Wechselwirkungen der Liganden RA-1008 **27** (a) und RA-1014 **28** (b) mit Thrombin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien und die Wassermoleküle als graue Kugeln dargestellt.

Bei beiden Liganden bildet das Stickstoffatom zwischen dem Agmatinrest und dem zentralen Prolin eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des Ser214. Bei RA-1008 bildet weiterhin die benachbarte Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül, das in der Struktur mit RA-1014 nicht lokalisiert werden konnte.

Die zum Stickstoffatom im Prolinring benachbarte Carbonylgruppe beider Liganden bildet eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom des Gly216.

Wie bei CRC220 orientieren sich die Sauerstoffatome der Sulfonylgruppe von RA-1008 von der Thrombinoberfläche weg in Richtung des umgebenden Wassers. In der Kristallstruktur

sind allerdings auch hier keine lokalisierten Wassermoleküle in der Nachbarschaft zu diesen beiden Sauerstoffatomen in der Elektronendichte zu erkennen.

Insgesamt bilden beide Liganden zusätzlich zu der zweizähligen Salzbrücke zwei (RA-1014) bzw. drei (RA-1008) Wasserstoffbrücken zum Protein aus. Bei RA-1008 kommen noch drei Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen hinzu. Die Anzahl der Van-der-Waals-Wechselwirkungen liegt bei 71 für RA-1008 und 81 für RA-1014.

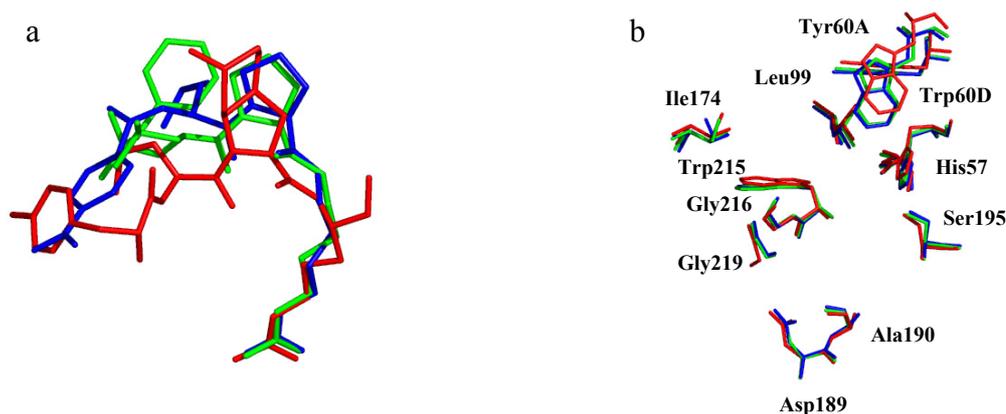


Abbildung 3.17 Überlagerung der Liganden RA-1008 (grün), RA-1014 (blau) und Aeruginosin 298-A (rot) (a) und der wichtigsten Aminosäuren der Bindetasche der Thrombin-Komplexe.

Eine Überlagerung der beiden Thrombin-Komplexe von RA-1008 und RA-1014 mit dem bereits literaturbekannten Komplex von Aeruginosin 298-A **26b** (PDB-Code 1A2C), das im Gegensatz zum Aeruginosin 98-B ein Leucin anstelle von D-allo-Isoleucin (R_2) und eine zusätzlich $-CH_2OH$ -Gruppe (R_1) im Bereich des Guanidinrestes besitzt, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Liganden. Lediglich im Bereich der S_1 -Tasche sind die Unterschiede nur gering.

Die folgenden Betrachtungen beziehen sich jeweils auf die Überlagerung der Thrombin-Komplexe von RA-1008 und RA-1014 auf den Komplex von Thrombin mit Aeruginosin298-A als Referenz mit Hilfe des Programms ProFit 2.3¹. Eine Überlagerung der gesamten Proteinstrukturen zeigt, dass auch hier die Unterschiede etwas größer sind als bei den zuvor beschriebenen Thrombin-Komplexen. In Bezug auf den Komplex von Thrombin-Aeruginosin298-A besitzt der Komplex mit RA-1008 einen rmsd-Wert von 0.38 Å und mit RA-1014 einen rmsd-Wert von 0.39 Å. Beim Vergleich der Aminosäuren in der Bindetasche zeigen vor allem die Aminosäuren des *60er-Loops* eine deutliche Abweichung mit einem rmsd-Wert von 0.27 Å bis 1.01 Å (Trp60D) für RA-1008 und 0.18 bis 1.12 Å (Trp60D) für RA-1014. Zusätzlich fällt ein deutlicher Unterschied zwischen den übrigen Aminosäuren in der Bindetasche auf. Am niedrigsten ist der rmsd-Wert jeweils für Asp189 (für RA-1008

0.12 Å und für RA-1014 0.17 Å), am höchsten für Asp102 (für RA-1008 0.53 Å und für RA-1014 0.51 Å). In allen Strukturen ist für die Aminosäuren Trp148 bis Lys149E keine Elektronendichte zu erkennen, so dass diese Aminosäuren nicht in das Modell eingebaut werden konnten. Diese Aminosäuren befinden sich nicht in unmittelbarer Nähe der Bindetasche an der Oberfläche des Proteins.

3.2 Isothermale Titrationskalorimetrie

3.2.1 Einleitung

Liganden, die untereinander nur minimale strukturelle Variationen aufweisen, so wie die für diese Studien ausgewählten Liganden, zeigen häufig nur kleine Unterschiede in der Freien Bindungsenthalpie ΔG° , wohingegen Enthalpie ΔH° und Entropie ΔS° stark variieren können. Größere Änderungen von ΔH° und ΔS° können auf einen veränderten Bindungsmodus hinweisen, wobei dies häufig nicht aus den geringen Unterschieden von ΔG° hervorgeht. Ist bekannt, ob die strukturellen Änderungen enthalpie- oder entropiegetrieben sind, speziell in eine Serie von sehr ähnlichen Inhibitoren, lassen sich daraus Schlüsse über die Natur der assoziierten nichtkovalenten Wechselwirkungen ziehen.

Wie bereits erwähnt, bietet sich vor allem die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) als Methode zur Studie der globalen thermodynamischen Parameter an, um einen umfassenden Einblick in die Thermodynamik der Liganden-Bindung zu erhalten.¹² Ein einzelnes Experiment liefert sowohl die Bindungskonstante K_A als auch die Bindungsenthalpie ΔH° , woraus die Freie Bindungsenthalpie ΔG° und die Bindungsentropie ΔS° berechnet werden können. Ein weiterer Vorteil der isothermalen Titrationskalorimetrie ist, dass keine chemischen Modifikation oder Immobilisierung von Ligand und Enzym notwendig sind. Die Entwicklung des für diese Messungen notwendigen Kalorimeters hat einen langen Weg hinter sich seit es zuerst von Théophile de Donder, dem Gründer der Brüsseler Schule der Thermodynamik, 1920 beschrieben wurde.¹³

Mit der ITC wird die Energetik (über Wärmeeffekte) von chemischen Reaktionen oder Wechselwirkungen direkt bei konstanter Temperatur gemessen. Das Ziel der Messung ist, eine Kurve zu erhalten, die den Grad der Sättigung des Proteins in Bezug auf die Konzentration des zu bindenden Liganden wiedergibt, die sogenannte Bindungsisotherme.¹⁴ Zu diesem Zweck werden kleine Mengen des Liganden mit Hilfe einer computergesteuerten

Spritze in eine Lösung des Makromoleküls, das in der Messzelle vorgelegt wird, hinein titriert (Abbildung 3.16). Nach jeder Injektion wird die vom System aufgenommene (endotherme Reaktion) bzw. abgegebene Wärme (exotherme Reaktion) im Vergleich zu der nur mit Wasser gefüllten Referenzzelle gemessen. Die Wärmeänderung wird mit Hilfe der elektrische Energie überwacht, die benötigt wird, um die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen möglichst klein zu halten. Wichtig dabei ist, dass sich beide Zellen innerhalb eines adiabatischen Schutzschildes befinden, um einen Wärmeaustausch mit der Umgebung auszuschließen. Sowohl die Zellen als auch der adiabatische Mantel besitzen voneinander unabhängige Heizelemente und Thermoelemente, die die Temperaturdifferenzen zwischen den beiden Zellen einerseits und zwischen den Zellen und dem adiabatischen Schild andererseits messen und dadurch die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen möglichst gering halten.

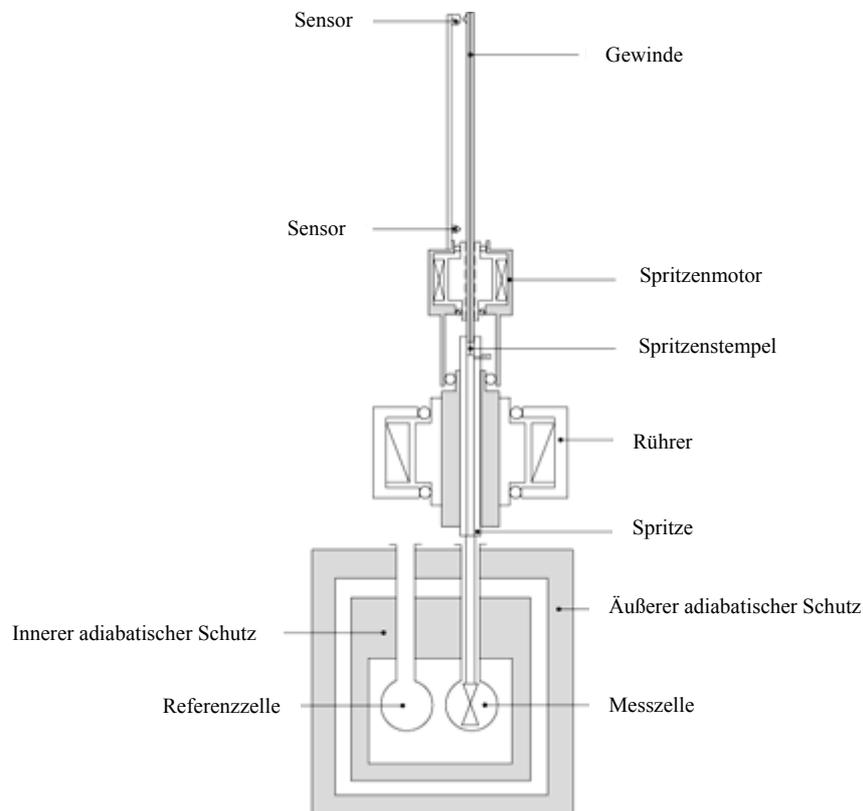


Abbildung 3.18 Schematischer Aufbau eines ITC-Gerätes.¹⁵

Das Detektionslimit des Gerätes liegt bei ca. $0.5 \mu\text{cal}$ (ca. $2 \mu\text{J}$) und entspricht etwa einer Temperaturänderung in der Messzelle von 10^{-6} K . Eine Messung kann dann als ausreichend aufgelöst betrachtet werden, wenn die gemessene Signalhöhe mindestens $0.1 \mu\text{cal/s}$ (ca. $0.4 \mu\text{J/s}$) beträgt.

3.2.2 Theoretische Grundlagen

Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes lässt sich die reversible Bindung eines Liganden L an ein Protein P zu einem Protein-Ligand-Komplex PL im thermodynamischen Gleichgewicht beschreiben:

$$K_A = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad \text{(Gleichung 3.1)}$$

Dabei sind die Gesamtkonzentration des Proteins $[P]_{\text{tot}}$ und des Liganden $[L]_{\text{tot}}$ wie folgt definiert:

$$[L]_{\text{tot}} = [L] + [PL] \quad \text{(Gleichung 3.2)}$$

$$[P]_{\text{tot}} = [PL] + [P] = [PL] + \frac{[PL]}{K_A [L]} \quad \text{(Gleichung 3.3)}$$

Aus diesen Gleichungen geht hervor, dass sich die Gesamtkonzentration des Liganden in der Messzelle aus der Summe der Konzentrationen des freien und gebundenen Liganden zusammensetzt. Die Gesamtkonzentration an Protein setzt sich analog dazu aus der ungebundenen und der komplexierten Menge zusammen. Die Konzentration an ungebundenem Protein kann, wie in Gleichung 3.3 zu sehen ist, durch den Term, der sich nach Auflösen des Massenwirkungsgesetzes nach $[P]$ ergibt, ersetzt werden. Wird anschließend Gleichung 3.2 nach $[L]$ aufgelöst und in Gleichung 3.3 substituiert, kann durch weitere mathematische Operationen folgende quadratische Gleichung erhalten werden:

$$[PL]^2 + [PL] \left(-[P]_{\text{tot}} - [L]_{\text{tot}} - \frac{1}{K_A} \right) + [P]_{\text{tot}} [L]_{\text{tot}} = 0 \quad \text{(Gleichung 3.4)}$$

Durch ziehen der Wurzel ergibt sich aus Gleichung 3.4 folgende Lösung für die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes:

$$[PL] = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4a}}{2} \quad \text{(Gleichung 3.5)}$$

mit

$$b = -[P]_{\text{tot}} - [L]_{\text{tot}} - \frac{1}{K_A} \quad (\text{Gleichung 3.6})$$

und

$$a = [P]_{\text{tot}} [L]_{\text{tot}} \quad (\text{Gleichung 3.7})$$

Aus der Ableitung der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes [PL] nach der Gesamtkonzentration des Liganden $[L]_{\text{tot}}$ ergibt sich nach Umstellen der erhaltenen Gleichung folgender Ausdruck:

$$\frac{d[PL]}{d[L]_{\text{tot}}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{\sqrt{X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2}} \quad (\text{Gleichung 3.8})$$

mit

$$r = \frac{1}{K_A [P]_{\text{tot}}} \quad (\text{Gleichung 3.9})$$

und

$$X_r = \frac{[L]_{\text{tot}}}{[P]_{\text{tot}}} \quad (\text{Gleichung 3.10})$$

In einem kalorimetrischen Titrationsexperiment wird ein kleines Volumen der Ligandlösung in die Messzelle mit der Proteinlösung eingespritzt. Bei der Einspritzung wird eine bestimmte Wärme Q freigesetzt oder absorbiert. Das Ziel der mathematischen Umformungen ist es, einen Zusammenhang zwischen der Wärmemenge Q und den Konzentrationen der vorliegenden Reaktionspartner in der Messzelle zu finden. Dabei hängt Q von folgenden Faktoren ab:

- a) Zellvolumen V ,
- b) Konzentrationen der Reaktionspartner in der Messzelle,
- c) Molare Bindungsenthalpie ΔH° ,
- d) Stöchiometrie,
- e) Menge des eingespritzten Liganden.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass mit der Abnahme an unkomplexiertem Protein die freigesetzte Wärmemenge verringert wird, ergibt sich die nachfolgende Gleichung. Die Änderung $d[PL]$ der Konzentration $[PL]$ ist proportional zur Änderung dQ der Wärmemenge Q .

$$dQ = d[PL] \cdot \Delta H^\circ \cdot V \quad \text{(Gleichung 3.11)}$$

Der Term $d[PL]$ enthält dabei die Faktoren b), d) und e), von denen die Wärmemenge Q abhängig ist. Diese Gleichung zeigt somit, dass eine größere Änderung von $[PL]$ auch zu einer umso größeren umgesetzten Wärmemenge führt und umgekehrt.

Durch Einsetzen der Beziehung von Gleichung 3.8 in Gleichung 3.11 ergibt sich für eine Bindungsreaktion zwischen einem Protein und einem Liganden im Verhältnis 1:1 folgende Beziehung:

$$\frac{1}{V} \cdot \frac{dQ}{d[L]_{\text{tot}}} = \Delta H^\circ \left\{ \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{\sqrt{X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2}} \right\} \quad \text{(Gleichung 3.12)}$$

Der experimentelle Parameter, der in einer Messung mit dem Titrationskalorimeter bestimmt wird, ist die differenzielle Wärme $dQ/d[L]_{\text{tot}}$. Allerdings hängt dieser Wert nicht von der absoluten Konzentration des Proteins $[P]_{\text{tot}}$ in der Messzelle ab, sondern nur von dem Wert relativ zur Bindungskonstanten K_A und zur Gesamtkonzentration des Liganden $[L]_{\text{tot}}$ in der Messzelle. Bei einer starken Bindung zwischen Protein und Ligand, d.h. bei hohen K_A -Werten, werden bei jeder Zugabe die Ligandmoleküle sofort quantitativ gebunden. Die freigesetzte Wärmemenge bleibt gleich, da sie bei überschüssiger Enzymkonzentration nur von der Anzahl an eingespritzten Ligandmolekülen abhängt. Dieser Vorgang wiederholt sich bis zur kompletten Sättigung des Enzyms. Wird der Äquivalenzpunkt überschritten, so wird, da keine Bindung mehr erfolgt, auch keine Wärme mehr freigesetzt. Der dennoch beobachtete Wärmeumsatz muss demnach auf andere Phänomene, wie zum Beispiel Verdünnungseffekte, zurückgeführt werden. Bei hohen K_A -Werten hat die Titrationskurve die Form einer Stufenfunktion, deren Höhe ΔH° entspricht.

Bei kleineren Werten für K_A nimmt die freigesetzte Wärmemenge ab, sobald sich die Titration dem Sättigungspunkt nähert. Dies kommt dadurch zustande, dass nicht mehr alle Ligandmoleküle quantitativ gebunden werden und sich ein dynamisches Gleichgewicht aus

Dissoziation und Assoziation einstellt. Somit geht die Bindungskurve beim Übergang zu kleineren Werten für K_A aufgrund der eben beschriebenen Phänomene in eine sigmoidale Form über. Zu kleine K_A -Werte ergeben fast eine Horizontale. Aus solch flachen Kurven lassen sich jedoch keine präzise Information über K_A mehr entnehmen.

Simulierte Bindungskurven bezüglich der Gleichung 3.12 sind in Abbildung 3.19 dargestellt. Für die Interpretation dieser Kurven wird ein zusätzlicher Parameter c eingeführt, der reziprok zum Wert r aus Gleichung 3.9 ist.

$$c = \frac{1}{r} = K_A [P]_{\text{tot}} \quad (\text{Gleichung 3.13})$$

Bei einer sehr starken Bindung ($c = \infty$) des Liganden L an das Protein P werden alle Moleküle des Liganden sofort gebunden, bis die Sättigung des Proteins eintritt, d.h. bis alle katalytischen Zentren besetzt sind. Als Bindungskurve ergibt sich dann eine Stufenfunktion mit der Höhe ΔH° .

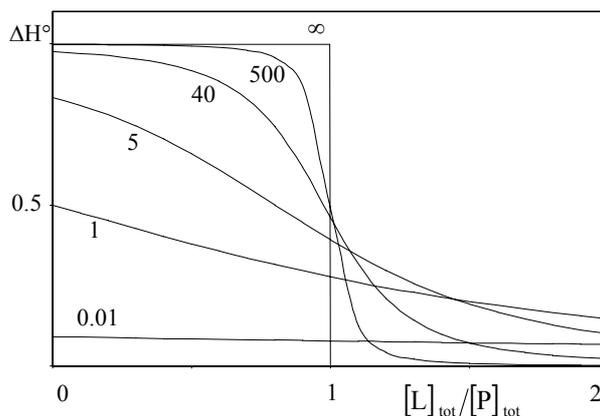


Abbildung 3.19 Simulierte Bindungsisotherme für eine endotherme Reaktion nach Gleichung 3.12 für verschiedene Parameter $c = K_A [P]_{\text{tot}}$. Die verschiedenen Werte für c sind in der Abbildung dargestellt.

Für eine relativ starke Ligandenbindung mit $c = 10 - 500$ geht diese Stufenfunktion, wie oben beschrieben, in eine sigmoidale Kurve über, deren Verlauf stark von dem Parameter c abhängt. Schwache Ligandenbindungen ergeben fast horizontale Bindungskurven ($c < 5$). Der c -Wert und die Bindungskonstante K_A sind direkt proportional zueinander. Große c -Werte sprechen daher für eine hohe Bindungskonstante, kleine c -Werte für eine niedrige.

Anhand des oben genannten Bereichs geeigneter c -Werte und dem K_i -Wert, der etwa der Dissoziationskonstante K_D entspricht (siehe Gleichung 3.15), lässt sich die für eine Messung benötigte Proteinkonzentration abschätzen. Dabei werden bei großen Bindungskonstanten nur

geringe Proteinkonzentrationen benötigt. Der Einsatz einer geringeren Proteinkonzentration führt aber gleichzeitig zu einer Verringerung der insgesamt freigesetzten Wärmemenge. Daher besteht unter Umständen in diesem Fall das Problem, dass hierbei das Detektionslimit des Messgerätes unterschritten wird und dadurch eine Messung unmöglich wird. Liegt das Ergebnis der ersten Messungen im Detektionsbereich, so muss bei weiteren Messungen die Proteinkonzentration entsprechend angepasst werden, falls die Messkurve noch nicht dem gewünschten sigmoidalen Kurvenverlauf entspricht.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass das Detektionslimit des Messgerätes überschritten werden kann, wenn es sich um eine sehr starke Bindung im Bereich von $c > 500$ handelt. In diesem Fall bieten sich kompetitive Bindungsexperimente an, bei denen ein schwächer bindender Ligand durch einen stärker bindenden verdrängt wird. Solche Experimente werden durchgeführt, indem das Protein zusammen mit dem schwächer bindenden Ligand in der Zelle vorgelegt wird.¹⁶

3.2.3 Bestimmbare Größen

Im Gegensatz zur Mikrokalorimetrie erfordert die Bestimmung der Enthalpieänderung ΔH° durch andere nicht-kalorimetrische Methoden zahlreiche Bindungsexperimente bei verschiedenen Temperaturen und anschließende Analyse der Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_A durch die van't Hoffsche Reaktionsisochore:

$$\left(\frac{\partial \ln K_A}{\partial T} \right)_P = \frac{\Delta H^\circ_{\text{vH}}}{RT^2} \quad \text{(Gleichung 3.14)}$$

wobei K_A für die Gleichgewichtskonstante, T für die absolute Temperatur und R für die Gaskonstante steht.

Obgleich die van't Hoff Enthalpie $\Delta H^\circ_{\text{vH}}$ unter der Voraussetzung, dass die Enthalpie temperaturunabhängig ist und sich der Bindungsvorgang als einstufige Reaktion zwischen Ausgangs- und Endzustand beschreiben lässt, identisch zur kalorimetrisch bestimmten Enthalpie $\Delta H^\circ_{\text{ITC}}$ sein sollte, werden zahlreiche Beispiele zitiert, bei denen größere Differenzen zwischen den Enthalpien beider Bestimmungsmethoden beobachtet wurden.^{17; 18} Größere Differenzen deuten dabei darauf hin, dass ΔH° für diesen Fall nicht temperaturunabhängig ist bzw. der Bindungsvorgang über mehrere Stufen verläuft. Aus

diesem Grund und wegen der wesentlich einfacheren Bestimmung von ΔH°_{ITC} ist heutzutage die Mikrokalorimetrie die geeignete Methode zur Bestimmung thermodynamischer Daten. Das Messsignal der ITC ist, wie oben beschrieben, der Heizstrom zum Erwärmen der Messzelle, angegeben in $\mu\text{cal/s}$, aufgetragen gegen die Zeit. Es resultiert eine Kurve wie in Abbildung 3.20 dargestellt:

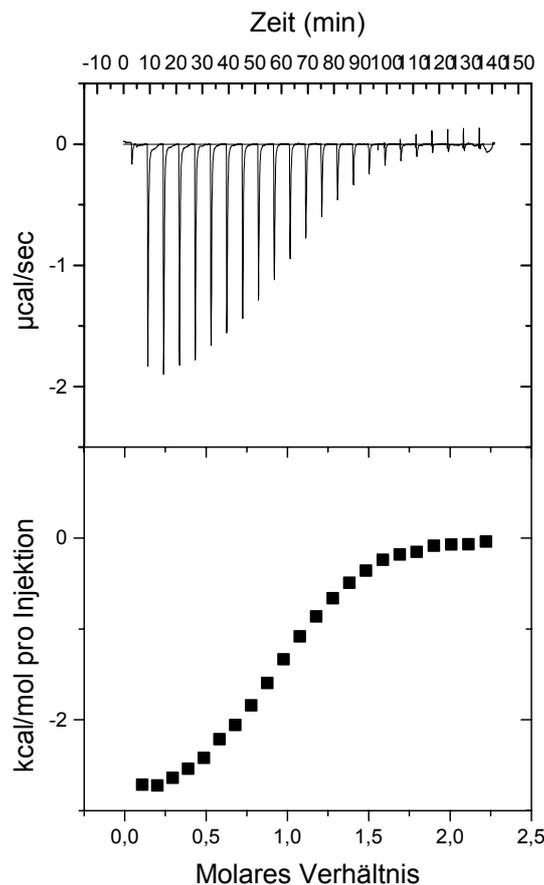


Abbildung 3.20 Ergebnis einer ITC-Messung. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten einer typischen Messung, dabei steht jeder Peak für eine Injektion. Nach der vollständigen Sättigung des Proteins zeigen die letzten Peaks nur die Wärmetönung, die durch die Verdünnung des Liganden in der Zelle entsteht. Die Messpunkte in der unteren Hälfte der Abbildung sind jeweils das Integral der obigen Peaks.

Anschließend wird mit Hilfe eines Computerprogramms (Origin) das Integral der einzelnen Peaks zwischen Basislinie und Kurvenverlauf gebildet. Dieses wird dann gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Protein aufgetragen, wie in Abbildung 3.20 dargestellt.

Die Berechnung der Kurve erfolgt vollautomatisch mit Hilfe eines Rechners und der entsprechenden Software. Anhand einer mathematischen Anpassungsfunktion (Gleichung 3.12), die eine Levenberg-Marquardt Iteration oder eine Simplex Iteration verwendet, um den sigmoidalen Kurvenverlauf zu erhalten, wird die Kurve an die erhaltenen

Messpunkte angepasst. Aus dem Kurvenverlauf berechnet sich der Wert der Bindungskonstante K_A , die Stöchiometrie der Reaktion und die Enthalpie ΔH° als gesamte Wärmetönung der Reaktion. Die freie Enthalpie ΔG° und die Entropie ΔS° können anschließend daraus abgeleitet werden.

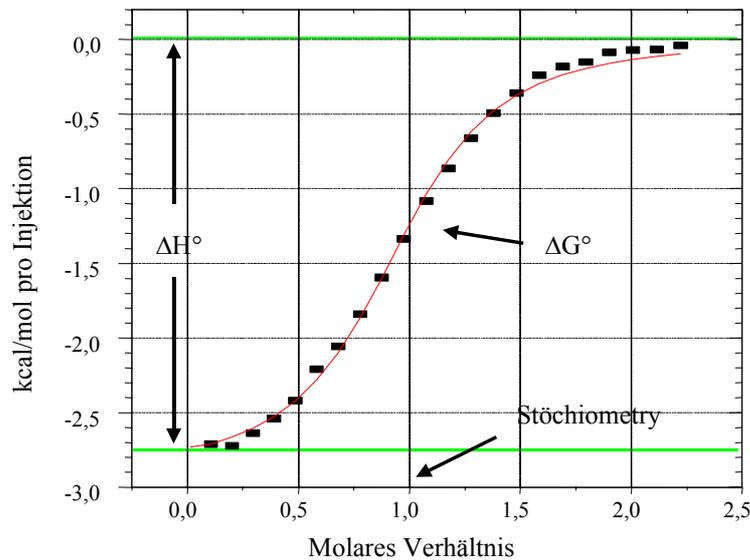


Abbildung 3.21 Auswertung einer ITC Messung. Die Messpunkte in der Abbildung entsprechen jeweils dem Integral unter den einzelnen Messsignalen. Die durchgezogene Kurve repräsentiert das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate repräsentiert die Bindungsenthalpie ΔH° , aus dem Kurvenverlauf lässt sich die Bindungskonstante K_A und somit auch die Freie Bindungsenthalpie ΔG° bestimmen.

Enthalpie

Wie der Abbildung 3.21 zu entnehmen ist, lässt sich der Betrag der Enthalpie der untersuchten Bindungsreaktion direkt aus dem Kurvenschnittpunkt mit der y-Achse ablesen. Die durch die ITC-Messung bestimmte Enthalpie enthält jedoch die gesamte Wärmetönung des kompletten Reaktionssystems. Demnach wird nicht nur der Wärmeaustausch zwischen den reagierenden Molekülen gemessen, sondern auch die durch alle überlagerten Prozesse umgesetzte Wärmemenge.

Bei diesen Prozessen kann es sich zum Beispiel um konformative Änderungen, um die Ionisierung von polaren Gruppen oder die Wechselwirkungen mit den anderen Pufferkomponenten handeln. Aus diesem Grund müssen alle Wärmemengen zuvor abgezogen werden, um die Enthalpie der reinen Bindungsreaktion bestimmen zu können.

Bindungskonstante

Da es sich bei der ITC um eine Methode zur Bestimmung thermodynamischer Größen handelt, können keinerlei Aussagen über die Kinetik einer Reaktion getroffen werden, sondern lediglich Daten über energetische Änderungen der Reaktionspartner gesammelt werden. In einem ITC-Experiment wird die Abgabe (exothermer Prozess) bzw. die Aufnahme (endothermer Prozess) von Wärme registriert. Um die Ergebnisse auswerten zu können, ist es notwendig, dass bei Konzentrationen gearbeitet wird, bei denen ausreichende Mengen an Ligand, freiem Protein und Komplex vorhanden sind. Bei der ITC wird das Bindungsexperiment mit Konzentrationen oberhalb der Dissoziationskonstante K_D durchgeführt. Nur bei den höheren Konzentrationen kann die Bindungskonstante K_A und somit auch die Freie Enthalpie ΔG° aufgrund des sigmoiden Kurvenverlaufs der Bindungsisothermen bestimmt werden. Der Grund dafür ist, dass der Grad der Wechselwirkungen vom Massenwirkungsgesetz (Gleichung 3.1) von der Bindungskonstanten K_A abhängt.

Freie Enthalpie und Entropie

Nach der Bestimmung der Reaktionsenthalpie ΔH° und der Bindungskonstanten K_A durch eine ITC-Messung wird der Beitrag der Freie Enthalpie ΔG° und der entropische Beitrag ΔS° mit Hilfe der folgenden Gleichungen berechnet. Dabei wird ausgenutzt, dass die Freie Enthalpie ΔG° proportional dem natürlichen Logarithmus der Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten ist und somit bei Kenntnis von K_A berechnet werden kann. Die Berechnung von ΔS° ist anschließend möglich, da die Messung isotherm erfolgt.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A = RT \ln K_D \approx RT \ln K_i \quad (\text{Gleichung 3.15})$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (\text{Gleichung 3.16})$$

Hierbei ist wiederum zu beachten, dass sich die gemessene Entropieänderung aus den Beiträgen des gesamten Systems zusammensetzt.

Änderung der Wärmekapazität

Indem mehrere ITC-Messungen über einen Temperaturbereich durchgeführt werden, kann zusätzlich zu den anderen thermodynamischen Daten auch die Wärmekapazität ermittelt werden. Dabei wird die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p einfach bestimmt, indem die Bindungsenthalpie bei mehreren Temperaturen gemessen und gegen die korrespondierenden Temperaturen aufgetragen wird. Die Steigung des Graphen bestimmt dabei den ΔC_p -Wert. Dies ist möglich, da unter der Voraussetzung, dass die Änderung der Wärmekapazität temperaturunabhängig ist, ΔC_p bei konstantem Druck durch folgende Gleichung ausgedrückt werden kann:

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H^\circ_{T_2} - \Delta H^\circ_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad \text{(Gleichung 3.17)}$$

Zeigt ein System eine Änderung der Wärmekapazität, so lässt sich dies auch nutzen, falls das Signal für die Enthalpie bei einer Messtemperatur zu klein ist, um eine präzise Aussage über die Bindungsdaten zu erzielen. In diesem Fall kann das Experiment bei einer anderen (höheren) Temperatur durchgeführt werden, um eine vollständig auswertbare Bindungsisotherme zu erhalten. Biologische Reaktionen haben den Vorteil, dass sie fast immer zu einer Veränderung der Wärmekapazitäten führen und in aller Regel mit steigender Temperatur zunehmend exothermer werden.

Stöchiometrie der Reaktion

Zusätzlich zu den thermodynamischen Daten lässt sich mit Hilfe einer ITC-Messung auch noch eine Aussage über die Stöchiometrie der beobachteten Reaktion treffen. Die Stöchiometrie ist direkt aus der Bindungsisothermen abzulesen, aber nur unter der Voraussetzung, dass bei Konzentrationen oberhalb der Dissoziationskonstanten K_D gemessen wird. Eine obere Grenze für die Konzentrationen muss hierbei nicht eingehalten werden, wenn am Ende des Titrationsexperimentes die Gesamtkonzentration des Liganden oberhalb der Gesamtkonzentration des Proteins liegt. Nur in diesem Fall ist der zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes benötigte Sprung in der Titrationskurve deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 3.19).

3.2.4 Bestimmung der Bindungskonstante K_A

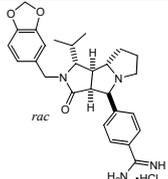
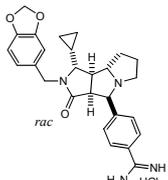
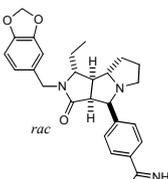
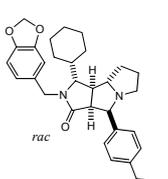
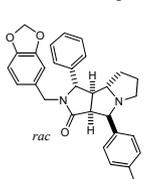
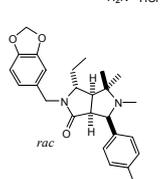
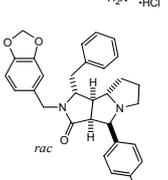
Die Inhibitionskonstanten der hier untersuchten Verbindungen wurden bereits im Rahmen der Dissertation von Ulrike Obst¹⁹ bestimmt. Dies erfolgte in einem kompetitiven Enzymassay. Dazu wurden die Inhibitoren in einer gepufferten Lösung (pH 7.8) mit humanem Thrombin inkubiert. Anschließend wurde das chromogene Substrat H-D-Phe-Pip-Arg-*p*-nitroanilid (S-2238)²⁰ zugegeben. Die Spaltung des Substrats (Freisetzung von *p*-Nitroanilin) wurde spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Diese Messungen wurden bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt und daraus die IC_{50} -Werte erhalten (die Inhibitorkonzentration, bei der die Spaltung des chromogenen Substrats im Vergleich zu einer Kontrollprobe ohne Inhibitor zu 50 % inhibiert ist). Der K_i -Wert (Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes) der Inhibitoren wurde aus den IC_{50} -Werten nach der Formel:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left\{ 1 + \left(\frac{S}{K_m} \right) \right\}} \quad \text{(Gleichung 3.18)}$$

berechnet, wobei S für die Substratkonzentration und K_m für die Michaelis-Menten-Konstante steht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Da bei der Synthese die Liganden jeweils als Racemat entstehen, sind alle angegebenen Werte auf das Racemat des jeweiligen Liganden bezogen, falls nicht anderes vermerkt. Zusätzlich enthält die Tabelle noch Informationen über den Selektivitätsquotienten der Bindung an Thrombin gegenüber Trypsin (letzte Spalte). Es fällt sofort auf, dass der Ligand **1** die höchste Selektivität zugunsten des Thrombins zeigt. Die Liganden **2** und **3** zeigen schon eine geringere Selektivität gegenüber Thrombin und die Liganden **4**, **5** und **7** weisen nahezu keinen Selektivitätsunterschied mehr auf.

Diejenigen Liganden, die keinen sichtbaren Selektivitätsunterschied aufweisen, sind auch die mit der geringsten Affinität gegenüber Thrombin. Die Affinität der gesamten Serie gegenüber Trypsin unterscheidet sich nur geringfügig.

Tabelle 3.5 Ergebnisse der biologischen Testung. Alle Werte beziehen sich auf das Racemat.

Ligand	Struktur	Inhibitionskonstante		Selektivität
		Trypsin K _i (nM)	Thrombin K _i (nM)	$\frac{K_i(\text{Trypsin})}{K_i(\text{Thrombin})}$
1		9900	13	760
2		2300	10	230
3		1680	8	210
4		4420	1700	2.6
5		5040	1400	3.6
6		7315	95	77
7		7700	1100	7

Für die ausgewählte Liganden-Serie konnten die Bindungskonstanten K_A für die Wechselwirkung der Racemate mit Trypsin thermodynamisch in mindestens einem Puffer bestimmt werden. In Tabelle 3.6 sind die Werte, teilweise für vier verschiedene Puffersysteme, aufgelistet. Die Messungen wurden bei pH 7.8 durchgeführt. Die gefundenen Bindungskonstanten liegen alle in einem relativ engen Bereich von $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bis $27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Tabelle 3.6 Bindungskonstanten K_A für verschiedene Inhibitoren gegenüber Trypsin. Die Werte wurden, wenn möglich, für vier verschiedene Puffersysteme ermittelt.

Ligand	Bindungskonstante K_A (10^4 M^{-1})			
	HEPES	Pyrophosphat	TRICINE	TRIS
1	--**	14.72 ± 1.71	14.10 ± 2.52	21.56 ± 2.28
2	--**	2.95 ± 0.38	4.02 ± 0.58	2.75 ± 0.30
3	4.58 ± 0.40	--**	2.35 ± 0.32	3.18 ± 0.47
4	--*	--*	--*	5.86 ± 1.72
5	26.44 ± 3.14	21.82 ± 3.43	26.50 ± 3.93	15.63 ± 1.66
6	2.95 ± 0.40	3.80 ± 0.54	--*	--**
7	--*	--*	--*	12.83 ± 1.29

*: Nicht bestimmt. **: Wegen zu geringer Wärmetönung keine Aufnahme einer Titrationskurve möglich.

Für die ausgewählte Liganden-Serie konnten die Bindungskonstanten K_A für die Wechselwirkung der Racemate mit Thrombin nur für die Liganden 1, 4, 5 und 7 thermodynamisch in mindestens einem Puffer bestimmt werden. Für die fehlenden Liganden konnten die Bindungskonstanten bisher nicht bestimmt werden, da sich aufgrund des verwendeten Racemats bei den Messungen zweistufige Titrationskurven (vergleiche Abbildung 3.22) ergaben. In Tabelle 3.7 sind die Werte, teilweise für vier verschiedene Puffersysteme, aufgelistet. Die Messungen wurden bei pH 7.8 durchgeführt. Es wird ein Bereich von $1.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bis $5.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ für die Bindungskonstanten abgedeckt.

Tabelle 3.7 Bindungskonstanten K_A für verschiedene Inhibitoren gegenüber Thrombin. Die Werte wurden, wenn möglich, für vier verschiedene Puffersysteme ermittelt.

Ligand	Bindungskonstante K_A (10^6 M^{-1})			
	HEPES	Pyrophosphat	TRICINE	TRIS
1	23.37 ± 5.66	--*	13.18 ± 2.77	53.40 ± 17.94
4	--*	--*	--*	0.20 ± 0.01
5	0.25 ± 0.03	1.09 ± 0.14	0.19 ± 0.02	0.34 ± 0.02
7	--*	--*	--*	0.22 ± 0.02

*: Nicht bestimmt.

In Tabelle 3.8 sind die pK_D -Werte für die Bindung an Trypsin aufgeführt, die den negativen dekadischen Logarithmus der Dissoziationskonstanten K_D darstellen. Diese verhält sich reziprok zur gemessenen Bindungskonstanten K_A . Verwendet wurde die gemittelte Bindungskonstante aus den Messungen mit TRIS-Puffer. Dem sind die kinetisch bestimmten K_i -Werte gegenübergestellt. In Abbildung 3.22 sind die Werte aus der Tabelle graphisch dargestellt.

Tabelle 3.8 Vergleich der kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten K_i (pK_i) und der thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten K_D (pK_D) für Trypsin.

Ligand	Trypsin			
	thermodynamisch	thermodynamisch	kinetisch	kinetisch
	K_D in μM	pK_D	K_i in μM	pK_i
1	4.6 ± 0.5	5.3 ± 0.6	9.9	5.0
2	36.4 ± 4.5	4.4 ± 0.5	2.3	5.6
3	31.4 ± 4.9	4.5 ± 0.7	1.7	5.8
4	17.1 ± 5.0	4.8 ± 1.4	4.4	5.4
5	6.4 ± 0.6	5.2 ± 0.5	5.0	5.3
6	--**	--**	7.3	5.1
7	7.8 ± 0.8	5.1 ± 0.5	7.7	5.1

** : Wegen zu geringer Wärmetönung keine Aufnahme einer Titrationskurve möglich.

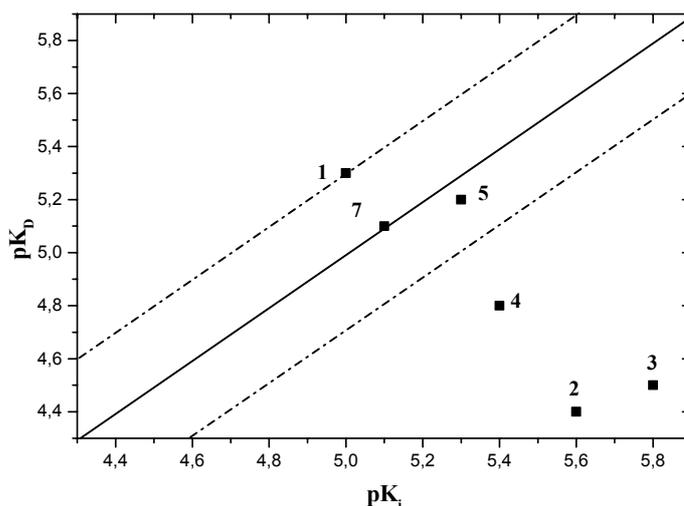


Abbildung 3.22 Auftrag der kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten pK_i und der thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten pK_D für Trypsin für die racemisch eingesetzten Liganden, die durchgezogene Linie entspricht der Diagonalen mit $pK_i = pK_D$, die beiden gestrichelten Linie geben Abweichungen von ± 1 logarithmischen Einheit von der idealen Korrelation an.

In Tabelle 3.9 sind die pK_D -Werte für die Bindung an Thrombin aufgeführt, die den negativen dekadischen Logarithmus der Dissoziationskonstanten K_D darstellen. Verwendet wurde die gemittelte Bindungskonstante aus den Messungen mit TRIS-Puffer. Dem sind die kinetisch bestimmten K_i -Werte gegenübergestellt. In Abbildung 3.23 sind die Werte aus der Tabelle graphisch dargestellt.

Tabelle 3.9 Vergleich der kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten K_i (pK_i) und der thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten K_D (pK_D) für Thrombin.

Ligand	Thrombin			
	thermodynamisch K_D in μM	thermodynamisch pK_D	kinetisch K_i in μM	kinetisch pK_i
1	0.02 ± 0.01	7.7 ± 2.5	0.013	8.9
2	--***	--***	0.01	8.0
3	--***	--***	0.008	8.1
4	5.0 ± 0.3	5.3 ± 0.3	1.7	5.8
5	2.9 ± 0.2	5.5 ± 0.4	1.4	5.9
6	--***	--***	0.095	7.0
7	4.5 ± 0.4	5.3 ± 0.5	1.1	6.0

***: zweistufige Titrationskurve.

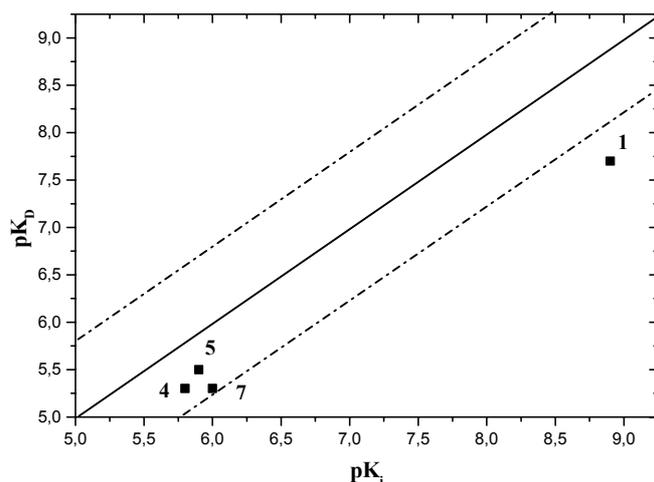


Abbildung 3.23 Auftrag der kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten pK_i und der thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten pK_D für Thrombin für die racemisch eingesetzten Liganden, die durchgezogene Linie entspricht der Diagonalen mit $pK_i = pK_D$, die beiden gestrichelten Linie geben Abweichungen von ± 1 logarithmischen Einheit von der idealen Korrelation an.

Wie die Abbildung 3.22 und 3.23 zeigen, stimmen die thermodynamisch gemessenen Werte nicht sehr gut mit den kinetisch bestimmten Größen überein. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass racemische Mischungen der Liganden vermessen wurden. Es muss als wahrscheinlich gelten, dass beide Enantiomere unterschiedliche Affinität zum Enzym aufweisen. Ulrike Obst gelang in einem Fall die Enantiomertrennung und die Bestimmung der Affinität (siehe Tabelle 3.10). Der Affinitätsquotient für Thrombin liegt bei 800, für Trypsin bei 22. Die kinetische Daten aller anderen Derivate sind an der Mischung erhoben. Ist ein Enantiomer wesentlich affiner als das zweite wird praktisch ein um den Faktor 2 kleinerer Wert angezeigt, sind beide gleich affin, entspricht der gemessene Wert der tatsächlichen Affinität (wie es sich zum Beispiel für die Bindung der Liganden **5** und **7** an Trypsin annehmen lässt). Im Falle der Titrationskurven bei der ITC stellt sich das Problem komplizierter. Eine zweistufige Titrationskurve zeigt die Bindung eines Racemates an, wobei beide unterschiedliche Affinitäten aufweisen und sich die Affinitäten etwa um den Faktor 70 - 200 unterscheiden. Wird nur eine einstufige Titrationskurven beobachtet, kann entweder ein Racemat mit gleich affinen Liganden vorliegen (wie zum Beispiel bei Ligand **1** gegenüber Trypsin) oder ein Enantiomer bindet deutlich stärker als das andere (wie zum Beispiel bei Ligand **1** gegenüber Thrombin).

Beim genauen Vergleich der am Racemat bestimmten Dissoziationskonstanten pK_D , die durch thermodynamische Messungen charakterisiert wurden, mit den kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten pK_i fällt auf, dass die Werte bei Trypsin um 0.0 bis 1.3 logarithmische Einheiten abweichen. Bei Thrombin liegt die Differenz in einem Bereich von 0.4 bis 1.2 logarithmische Einheiten.

3.2.5 Racemische Mischungen

Wie bereits erwähnt, zeigen einige der Liganden eine zweistufige Titrationskurve (siehe Abbildung 3.24). Dies ist darauf zurückzuführen, dass alle Liganden als Racemate eingesetzt wurden und dadurch während einer Messung unterschiedliche Bindungsprozesse verfolgt werden konnten (siehe Kapitel 4.3).

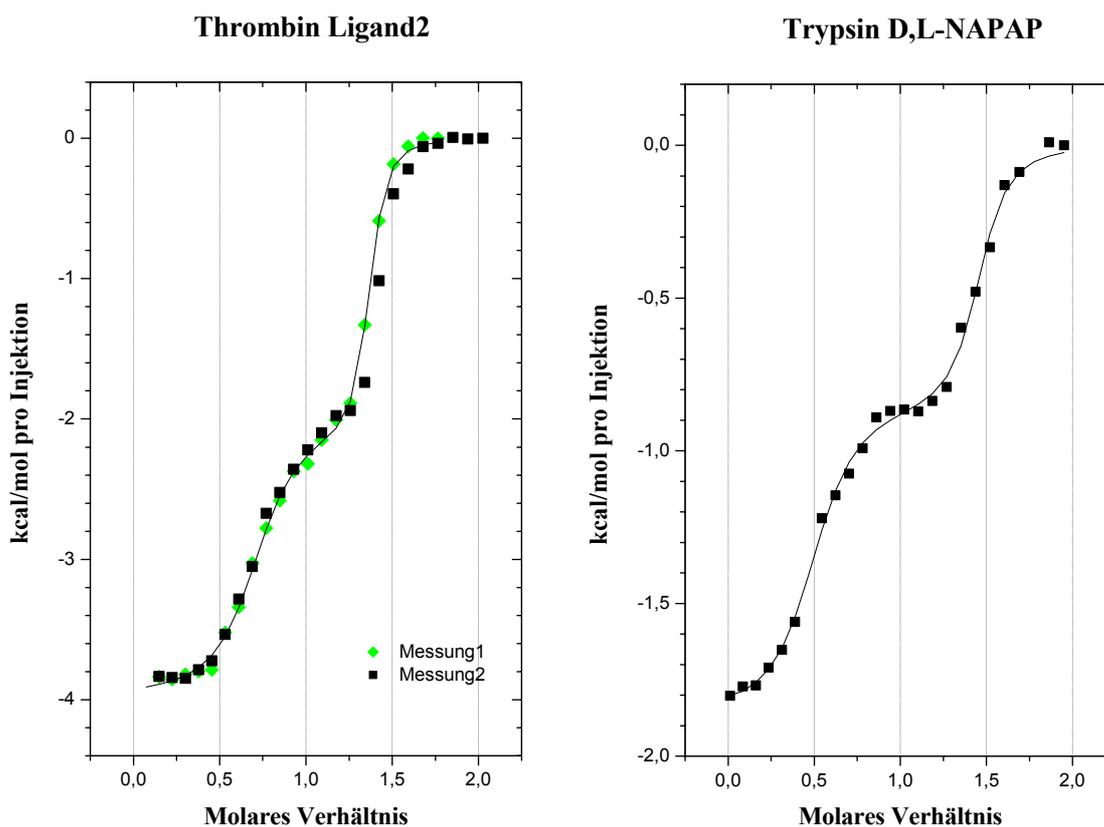


Abbildung 3.24 Typische Beispiele für die Titrationskurve eines Racemates.

Um diese Kurven zu interpretieren, ist es notwendig, die zweifachen Titrationskurven des Racemats mit den Titrationskurven der getrennten Enantiomere zu vergleichen. Die Trennung der Enantiomere gestaltete sich jedoch aus chemischen Gründen schwierig, so dass die Enantiomere im Rahmen dieser Arbeit leider nicht in ausreichender Menge für die thermodynamischen Messungen zur Verfügung standen. Aus der Dissertation von Ulrike Obst¹⁹ ist bekannt, dass die Enantiomere (zumindest im Falle des Liganden **1**, Abbildung 3.25 und Tabelle 3.10) insbesondere bezüglich einen großen Affinitätsunterschied aufweisen.

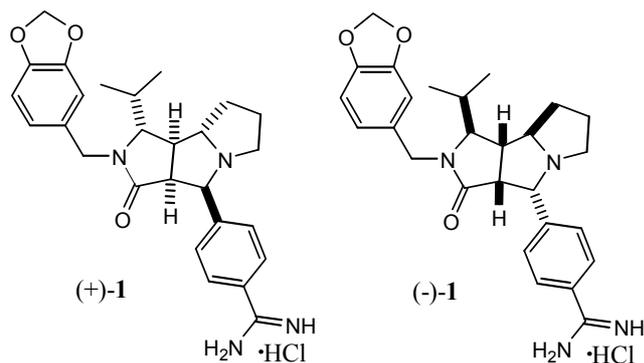


Abbildung 3.25 Die beiden Enantiomere von Ligand **1**.

Tabelle 3.10 Die Affinitäten der enantiomerenreinen Liganden (+)-**1** und (-)-**1** sowie des Racemats von **1** gegenüber Thrombin und Trypsin.

	<i>rac-1</i>	(+)- 1	(-)- 1	(+)- 1 /(-)- 1
Thrombin K_i (μM)	0.013	0.007	5.6	800
Trypsin K_i (μM)	9.9	5.5	120	22
$\frac{K_i(\text{Trypsin})}{K_i(\text{Thrombin})}$ *	760	740	21	

* Selektivitätskoeffizient

Das Racemat von Ligand **1** zeigt weder bei der Titration gegen Thrombin noch gegen Trypsin eine klar erkennbare zweistufige Titrationskurve wie sie zum Beispiel der Ligand **2** gegen Thrombin (siehe Abbildung 3.24 und 3.26) aufweist. Doch ist bei beiden Titrationskurven zu erkennen, dass die Anpassung etwas von einem einfachen sigmoidalen Verlauf abweicht. Bei der Titrationskurve von Ligand **1** gegen Thrombin ist zu Beginn der Kurve ein Ansatz einer zweifachen Titrationskurven zu erkennen, für die Titrationskurve gegen Trypsin deutet sich eine leichte Abweichung von dem einfachen sigmoidalen Verlauf am Ende der Kurve an.

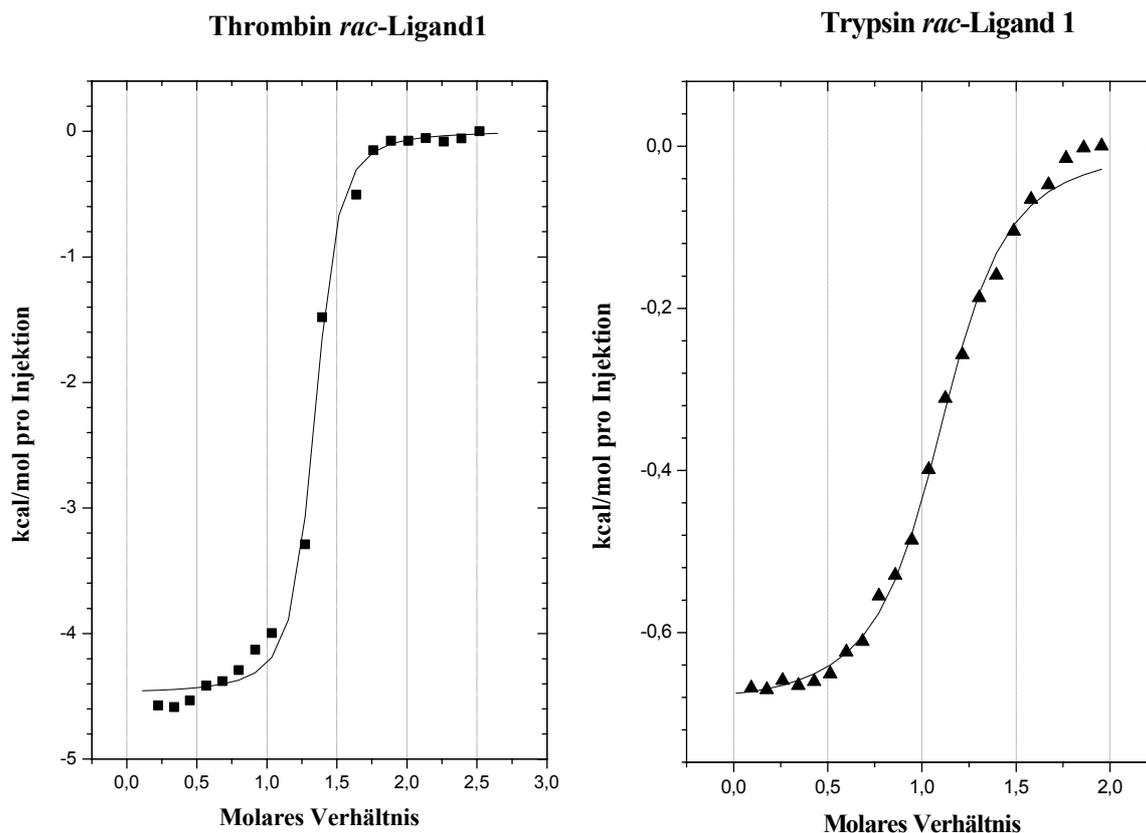
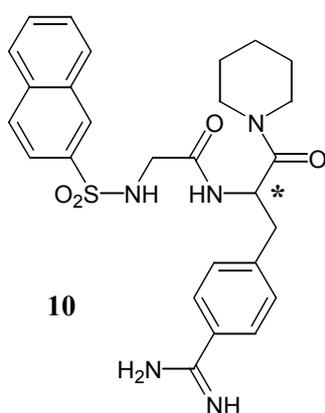


Abbildung 3.26 Die Titrationskurven von Ligand 1 in Trypsin und in Thrombin.

Um einen detaillierten Einblick in das Titrationsverhalten eines Racemats bei den thermodynamischen ITC-Messungen im Vergleich zu den reinen Enantiomeren zu erhalten, wurde als Testsystem der nicht-kovalente Inhibitor NAPAP verwendet (Abbildung 3.27).



	K_i -Trypsin (μM)	$1/K_i$ (10^5 M^{-1})
D,L-NAPAP	0.69	14.5
D-NAPAP	0.23	43.5
L-NAPAP	35	0.3
$\frac{\text{L-NAPAP}^*}{\text{D-NAPAP}}$	152	

* Selektivitätskoeffizient

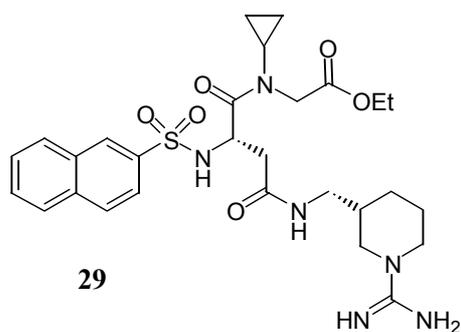
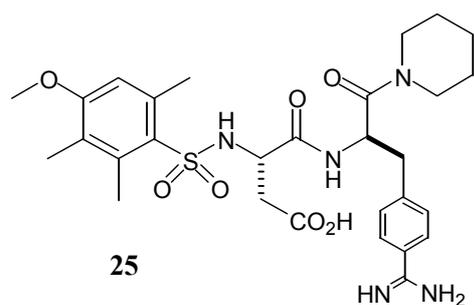
Abbildung 3.27 Der nicht-kovalente Inhibitor NAPAP 10 und die Affinität von D,L-NAPAP bzw. der beiden Enantiomeren gegenüber Trypsin.

Um das Verhalten von racemischen Mischungen genauer zu untersuchen, wurden zuerst die thermodynamischen Daten für die beiden Enantiomere D-NAPAP und L-NAPAP gegenüber Trypsin bestimmt. Beide Enantiomere zeigen die gleiche einfache sigmoidale Titrationskurve wie sie üblicherweise für ITC-Messungen auftreten. Diese konnten problemlos ausgewertet werden. Der Vergleich der Bindungskonstanten K_A mit dem Kehrwert des K_i -Wertes zeigt eine sehr gute Übereinstimmung (siehe auch Tabelle 3.11). Anschließend wurden Messungen mit dem Racemat durchgeführt. Auch dieses Racemat zeigt eine zweistufige Titrationskurve wie sie in Abbildung 3.24 zu sehen ist. Bisher ist die Auswertung einer solchen doppelten Kurve mit dem erhältlichen Auswertprogramm nicht möglich, da keine kompetitiven Interaktionen sowie Verdrängungsreaktionen berücksichtigt werden. Es wurde auch alternativ versucht, die beiden Stufen der doppelten Titrationskurve getrennt auszuwerten, indem jeweils die Daten für den einen Teil der Kurve unberücksichtigt blieben (siehe „Untere Kurve“ und „Obere Kurve“ in Tabelle 3.11). Beim Vergleich mit dem reziproken K_i -Wert liegt der K_A -Wert für die „Untere Kurve“ im Bereich des Racemats, der Wert für die „Obere Kurve“ dagegen im Bereich von D-NAPAP.

Tabelle 3.11 Thermodynamische Parameter K_A , ΔG° , $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ und $-\Delta S^\circ$ für das Testsystem NAPAP.

	K_A (10^5 M^{-1})	ΔG° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$-\Delta S^\circ$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
D-NAPAP	43.9 ± 4.4	-37.8 ± 1.0	-22.7 ± 0.2	-15.1 ± 2.4
L-NAPAP	0.2 ± 0.0	-24.3 ± 0.3	-5.3 ± 0.2	-19.0 ± 1.6
Untere Kurve (D,L-NAPAP)	12.4 ± 2.1	-34.8 ± 0.3		
Obere Kurve (D,L-NAPAP)	40.57 ± 13.8	-37.8 ± 0.4		

Als weiteres Testsystem wurde eine 1:1-Mischung der Inhibitoren CRC220 und Napsagatranethylester (NapEt) ausgewählt (Abbildung 3.26). Hierbei war vor allem interessant, ob eine Inhibitormischung mit einem Faktor von 73 in ihrer Affinität ebenfalls eine zweistufige Titrationskurve zeigt und die Ergebnisse das Verhalten der racemischen Mischungen der beiden Enantiomere D-NAPAP und L-NAPAP gegenüber Trypsin bestätigen.



	K_i -Trypsin (μM)	$1/K_i$ (10^5 M^{-1})
Mischung	3.1	3.2
CRC220	0.4	24.4
NapEt	30	0.3
$\frac{\text{CRC220}}{\text{NapEt}}$	73	

* Selektivitätskoeffizient

Abbildung 3.28 Die Inhibitoren CRC220 **25** und Napsagatranethylester **29** und deren Affinität gegenüber Trypsin.

Für beide Inhibitoren wurden wiederum zuerst einzeln die thermodynamischen Daten bestimmt, wobei beide Inhibitoren die gleiche einfache sigmoidale Titrationskurve zeigen wie sie üblicherweise für ITC-Messungen auftreten. Diese konnten problemlos ausgewertet werden. Der Vergleich der Bindungskonstanten K_A mit dem Kehrwert des K_i -Wertes zeigt eine sehr gut Übereinstimmung (siehe auch Tabelle 3.12). Anschließend wurden Messungen mit dem Racemat durchgeführt. Auch dieses Racemat zeigt eine ähnliche zweistufige Titrationskurve wie sie in Abbildung 3.29 zu sehen ist.

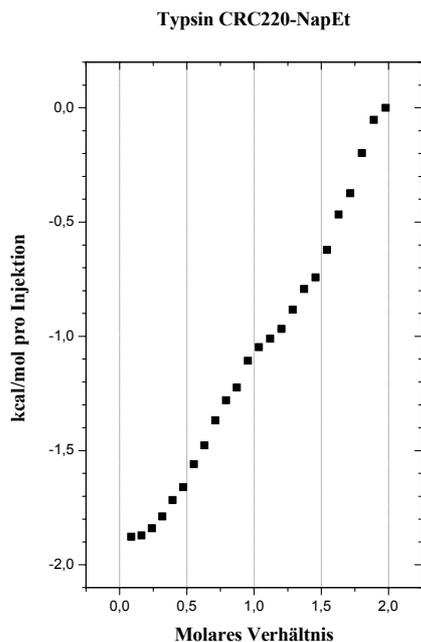


Abbildung 3.29 Zweistufige Titrationskurve für das Testsystem CRC220/NapEt.

Tabelle 3.12 Thermodynamische Parameter K_A , ΔG° , $\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ und $-T\Delta S^\circ$ für das Testsystem CRC220/NapEt.

	K_A (10^5 M^{-1})	ΔG° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta H^\circ_{\text{obs}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$-T\Delta S^\circ$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
CRC220	20.5 ± 2.8	-36.0 ± 1.0	-14.3 ± 0.1	-21.7 ± 1.2
NapEt	0.8 ± 0.2	-27.9 ± 1.3	-4.4 ± 0.3	-23.5 ± 1.8
Untere Kurve der 1:1-Mischung	2.5 ± 0.3	-30.8 ± 0.1		
Obere Kurve der 1:1-Mischung	23.3 ± 0.6	-36.2 ± 1.1		

Wie bei NAPAP beschrieben, wurden die beiden Stufen der doppelten Titrationskurve einzeln auszuwerten, indem jeweils die Daten für den einen Teil der Kurve unberücksichtigt blieben (siehe „Untere Kurve“ und „Obere Kurve“ in Tabelle 3.12). Beim Vergleich mit dem reziproken K_i -Wert liegt der K_A -Wert für die „Untere Kurve“ im Bereich der 1:1-Mischung, der Wert für die „Obere Kurve“ dagegen im Bereich von CRC220.

3.2.6 Änderung der Protonierungszustände bei der Bindung

Korrektur des Pufferbeitrages

Um einen allgemeinen Vergleich der thermodynamischen Daten zwischen den unterschiedlichen Liganden anstellen zu können, ist es notwendig, dem eigentlichen Bindungsprozess überlagerte thermodynamische Prozesse zu bestimmen und sie anschließend von den betroffenen thermodynamischen Parameter abzuziehen. Falls also gleichzeitig mit der Bindungsreaktion Protonen vom untersuchten System aufgenommen oder abgegeben werden, müssen der enthalpische Beitrag des Puffers bzw. die enthalpischen Beiträge der ionisierbaren Protein- bzw. Ligandgruppen, die an diesen Protonierungsreaktionen beteiligt sind, von der gemessenen Gesamtenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ abgezogen werden, um die intrinsische Bindungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{bind}}$ zu erhalten.

$$\Delta H^{\circ}_{\text{obs}} = \Delta H^{\circ} + n \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{ion}} \quad \text{(Gleichung 3.19)}$$

Um die korrigierte Bindungsenthalpie ΔH° zu bestimmen, wurden die ITC-Experimente bei pH 7.8 und 25°C in vier verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen Ionisierungsenthalpien $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ durchgeführt. Die verwendeten Puffersubstanzen sind mit den dazugehörigen Ionisierungsenthalpien $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ in Tabelle 3.13 aufgelistet und beziehen sich jeweils auf die Deprotonierung der betrachteten funktionellen Gruppe.

Tabelle 3.13 Übersicht über die verwendeten Ionisierungsenthalpien bei 25°C. Die Werte beziehen sich auf die Deprotonierung der Puffersubstanz.

Puffersubstanz	Ionisierungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ (kJ·mol ⁻¹)
Pyrophosphat	5.12
HEPES	21.07
TRICINE	31.97
TRIS	48.07

Durch Abzug der Ionisierungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ des Puffers wird die korrigierte Enthalpie ΔH° erhalten. Anschließend muss noch um die Wärmetönung korrigiert werden, die für die Protonierung/Deprotonierung der entsprechenden funktionellen Gruppe des Liganden oder

des Proteins auftritt. Erst nach Berücksichtigung des enthalpischen Beitrags dieser ionisierbaren Gruppen ergibt sich die intrinsische Enthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{bind}}$ (siehe unten).

Alle untersuchten Verbindungen zeigen eine Abhängigkeit der Enthalpie von der verwendeten Puffersubstanz (siehe Tabelle 3.14 und 3.15). Die Art und Richtung dieser Abhängigkeit ist bei allen Inhibitoren sowohl gegenüber Trypsin als auch gegenüber Thrombin gleich, das Ausmaß schwankt allerdings von Ligand zu Ligand. Die größten Enthalpien wurden jeweils im TRIS-Puffer gemessen.

Tabelle 3.14 Gemessene Enthalpien $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ für verschiedene Inhibitoren in unterschiedlichen Puffern bei 25°C gegenüber Trypsin.

Ligand	Enthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ (kJ·mol ⁻¹) gegen Trypsin			
	HEPES	Pyrophosphat	TRICINE	TRIS
1	--**	2.7 ± 0.0	-1.6 ± 0.0	-2.9 ± 0.2
2	--**	3.6 ± 0.1	-6.1 ± 0.2	-11.2 ± 0.3
3	-3.4 ± 0.1	--**	-6.6 ± 0.4	-12.3 ± 0.6
4	--*	--*	--*	-2.1 ± 0.1
5	-3.6 ± 0.1	-2.3 ± 0.1	-8.0 ± 0.2	-11.0 ± 0.2
6	-1.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0	--*	--**
7	--*	--*	--*	-12.2 ± 0.2

*: Nicht bestimmt. **: Wegen zu geringer Wärmetönung keine Aufnahme einer Titrationskurve möglich.

Tabelle 3.15 Gemessene Enthalpien $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ für verschiedene Inhibitoren in unterschiedlichen Puffern bei 25°C gegenüber Thrombin.

Ligand	Enthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ (kJ·mol ⁻¹) gegen Thrombin			
	HEPES	Pyrophosphat	TRICINE	TRIS
1	-5.2 ± 0.0	--*	-7.3 ± 0.0	-9.7 ± 0.1
4	--*	--*	--*	-5.0 ± 0.1
5	-3.7 ± 0.0	2.6 ± 0.0	-11.3 ± 0.1	-12.7 ± 0.3
7	--*	--*	--*	-24.2 ± 0.5

*: Nicht bestimmt.

Da bei allen Liganden ein Protonenaustausch stattfindet, muss eine Korrektur vorgenommen werden. Dazu wurde die in unterschiedlichen Puffern gemessene Wärmetönung $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ gegen die Ionisierungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ des Puffers aufgetragen. Durch lineare Regressionsanalyse können aus diesem Auftrag die Anzahl n der vom Puffer auf das Protein-Ligand-System übertragenen Protonen und die Enthalpie ΔH° der Reaktion, die die um $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$ korrigierte Reaktionsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ darstellt, bestimmt werden. Die Anzahl der übertragenen Protonen n ergibt sich nach Gleichung 3.19 aus der Steigung der Regressionsgeraden und ΔH° als Achsenabschnitt auf der Ordinate $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ (Abbildung 3.30 und 3.31).

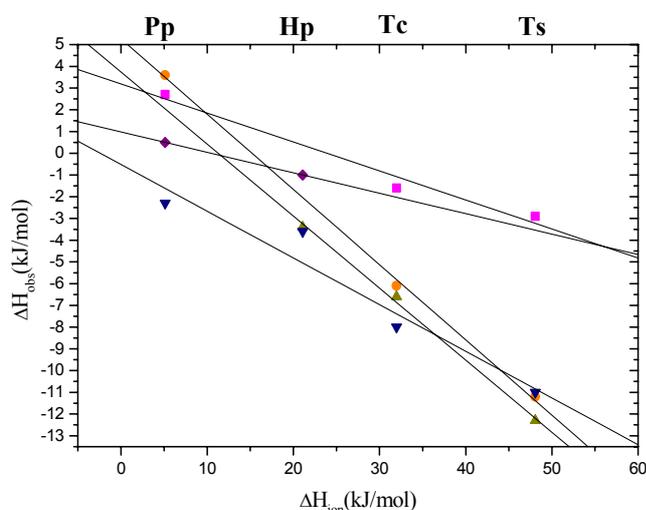


Abbildung 3.30 Auftragung der gemessenen Enthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ gegen die Ionisierungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$. Die Anzahl n der vom Puffer übertragenen Protonen ergibt sich aus der Steigung der Geraden und die korrigierte Enthalpie ΔH° aus dem Achsenabschnitt auf der Ordinate $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$. L1-Trypsin \blacksquare , L2-Trypsin \bullet , L3-Trypsin \blacktriangle , L5-Trypsin \blacktriangledown und L6-Trypsin \blacklozenge . Die Puffer sind in der Abbildung folgendermaßen abgekürzt: Pyrophosphat Pp, HEPES Hp, TRICINE Tc und TRIS Ts.

Nachdem für alle Liganden gegenüber Trypsin und Thrombin die beschriebene Enthalpiekorrektur durchgeführt worden war, zeigt sich durch Auswertung der in den Abbildung 3.30 und 3.31 gezeigten Auftragsungen, dass bei allen Reaktionen Protonen vom Enzym-Ligand-System an den Puffer abgegeben wurden.

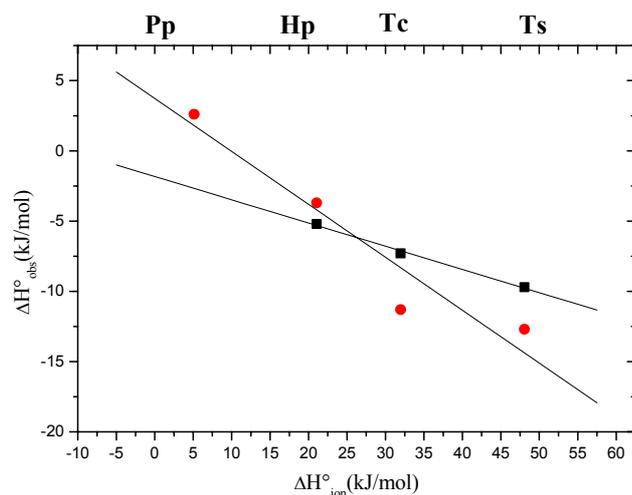


Abbildung 3.31 Auftragung der gemessenen Enthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ gegen die Ionisierungsenthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$. Die Anzahl n der vom Puffer übertragenen Protonen ergibt sich aus der Steigung der Geraden und die korrigierte Enthalpie ΔH° aus dem Achsenabschnitt auf der Ordinate $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$. L1-Thrombin ■ und L5-Thrombin ●. Die Puffer sind in der Abbildung folgendermaßen abgekürzt: Pyrophosphat Pp, HEPES Hp, TRICINE Tc und TRIS Ts.

Aus Tabelle 3.16 lässt sich ablesen, dass zwischen 0.09 und 0.38 Protonen übertragen werden, wobei die Werte für den Ligand **1** für beide Enzyme keinen großen Unterschied aufweisen. Für die korrigierte Enthalpie ΔH° liegen die Werte im Bereich zwischen -1.83 und 5.26 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabelle 3.16 Korrektur ($\Delta H^{\circ} = \Delta H^{\circ}_{\text{obs}} - n \cdot \Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$) der gemessenen Wärmetönungen $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ um die Ionisierungsenthalpien $\Delta H^{\circ}_{\text{ion}}$, die vom verwendeten Puffer herrühren. Die Werte sind der Auftragung in Abbildung 3.27 und 3.28 entnommen. Die negativen n -Werte deuten auf eine Protonenabgabe des Enzym-Ligand-Systems hin.

Ligand	Enzym	n	ΔH° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
1	Trypsin	-0.13 ± 0.02	3.19 ± 0.74
2	Trypsin	-0.35 ± 0.01	5.26 ± 0.39
3	Trypsin	-0.33 ± 0.02	3.74 ± 0.59
5	Trypsin	-0.21 ± 0.04	-0.52 ± 1.20
6	Trypsin	-0.09 ± 0.00	0.98 ± 0.00
1	Thrombin	-0.17 ± 0.00	-1.83 ± 0.00
5	Thrombin	-0.38 ± 0.08	3.73 ± 2.47

Die pK_a -Werte der Liganden wurden freundlicherweise von Herrn Björn Wagner bei der Hoffmann-LaRoche AG gemessen. Mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung kann anhand der pK_a -Werte, der eingesetzten Konzentrationen und des unter Messbedingungen vorliegenden pH-Wertes (7.8) der Grad der Deprotonierung berechnet werden. Der Grad der Deprotonierung kann direkt mit der Anzahl der übertragenen Protonen n verglichen werden.

Tabelle 3.17 Vergleich mit dem aus den pK_a -Werte der Liganden und der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (HH) berechneten Grad der Deprotonierung und der Anzahl n der übertragenen Protonen.

Ligand	Enzym	$pK_{a,N\text{-tert}}$	$pK_{a,Amidin}$	Übertragene	
				Protonen laut HH (n_{Lig})	n
1	Trypsin	6.35	> 11	-0.036	-0.13 ± 0.02
2	Trypsin	6.29	11.23	-0.031	-0.35 ± 0.01
3	Trypsin	6.45	11.71	-0.045	-0.33 ± 0.02
4	Trypsin	6.35	11.71	-0.036	-*
5	Trypsin	6.06	11.75	-0.018	-0.21 ± 0.04
6	Trypsin	5.37	11.72	-0.003	-0.09 ± 0.00
7	Trypsin	6.42	11.91	-0.042	-*
1	Thrombin	6.35	>11	-0.036	-0.17 ± 0.00
5	Thrombin	6.06	11.75	-0.018	-0.38 ± 0.08

*: Nicht bestimmt.

Ionisierung von funktionellen Gruppen

Zusätzlich zur Korrektur der gemessenen Wärmetönung ΔH°_{obs} um die Ionisierungsenthalpie ΔH°_{ion} des Puffers (Abbildung 3.30, Abbildung 3.31 und Tabelle 3.16) ist noch ein weiterer Korrekturterm wichtig. Die Ionisierungsenthalpie der funktionellen Gruppe des Liganden bzw. des Proteins, die während der eigentlichen Bindungsreaktion protoniert bzw. deprotoniert wird, muss ebenfalls berücksichtigt werden. Bei den oben genannten Reaktionen werden jeweils funktionelle Gruppen des Liganden sowie das His57 deprotoniert. Aufgrund der pK_a -Werte (siehe Tabelle 3.17) wird angenommen, dass die Inhibitoren während der Bindung Protonen an den Puffer abgeben. Dies entspricht einem Teil der gesamten während der Reaktion abgegebenen Protonen. Wie Berechnungen der pK_a -Verschiebung des His57 zeigen, wird es höchstwahrscheinlich während der Bindung deprotoniert.²¹ Unter dieser Annahme muss die gemessene Enthalpie ΔH°_{obs} zusätzlich zur Korrektur der

Ionisierungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{ion}}$ des Puffers aufgrund der teilweisen Deprotonierung ($n = -0.09$ bis -0.38) um den jeweiligen Teil der Ionisierungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{i,Lig}}$ für die Liganden und der Ionisierungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{i,His}}$ für His57 korrigiert werden (s. Tabelle 3.18). Die Ionisierungsenthalpie der Liganden wurde mit Hilfe einer Modellverbindung gemessen (siehe Kapitel 6.5.8). Die Verwendung einer den Liganden ähnliche Verbindung als Modellverbindung war aufgrund der großen benötigten Menge für diese Messungen notwendig. Die Ionisierungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{i,Lig}}$ bezieht sich auf die Deprotonierung der funktionellen Gruppe. Die Ionisierungsenthalpie des His57 wurde der Literatur entnommen.²² Folgende Gleichung muss für die Korrektur berücksichtigt werden:

$$\Delta H^\circ_{\text{bind}} = \Delta H^\circ + (n_{\text{Lig}} \cdot \Delta H^\circ_{\text{i,Lig}} + n_{\text{His}} \cdot \Delta H^\circ_{\text{i,His}}) \quad \text{(Gleichung 3.20)}$$

mit

$$n = n_{\text{Lig}} + n_{\text{His}} \quad \text{(Gleichung 3.21)}$$

Tabelle 3.18 Korrektur (nach Gleichung 3.20) der Enthalpie ΔH° um die für die Modellverbindung gemessene Ionisierungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{i,Lig}} = 9.4 \pm 0.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, die von der ionisierbaren funktionellen Gruppe des Liganden herrührt und die Ionisierungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{i,His}} = 30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Ligand	Enzym	ΔH° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$n_{\text{Lig}} \cdot \Delta H^\circ_{\text{i,Lig}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$n_{\text{His}} \cdot \Delta H^\circ_{\text{i,His}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta H^\circ_{\text{bind}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
1	Trypsin	3.19 ± 0.74	-0.34	-2.82	0.03
2	Trypsin	5.26 ± 0.39	-0.29	-9.42	-4.5
3	Trypsin	3.74 ± 0.59	-0.42	-8.55	-5.23
5	Trypsin	-0.52 ± 1.20	-0.17	-5.76	-6.45
6	Trypsin	0.98 ± 0.00	-0.03	-2.61	-1.66
1	Thrombin	-1.83 ± 0.00	-0.34	-4.02	-6.19
5	Thrombin	3.73 ± 2.47	-0.17	-10.86	-7.3

Thermodynamische Daten nach Berücksichtigung der Korrekturterme

Unter der Voraussetzung, dass keine weiteren Prozesse, die Wärme freisetzen oder absorbieren, der eigentlichen Bindungsreaktion überlagert sind, ist die so erhaltene intrinsische Bindungsenthalpie $\Delta H^\circ_{\text{bind}}$ die Netto-Reaktionsenthalpie des Assoziationschrittes

zwischen Ligand und Protein bei 25°C. Ausgehend von dieser Enthalpie $\Delta H^{\circ}_{\text{bind}}$ kann der entropische Beitrag $-T\Delta S^{\circ}$ nach Gleichung 3.16 berechnet werden. Als Bindungskonstante K_A bzw. Freie Enthalpie ΔG° wurden die aus allen Puffern bestimmten Mittelwerte verwendet.

Tabelle 3.19 Thermodynamische Parameter K_A , ΔG° , $\Delta H^{\circ}_{\text{bind}}$ und $-T\Delta S^{\circ}$ der untersuchten Liganden für die Bindung an Trypsin bzw. Thrombin. Die Bindungskonstanten K_A sind Mittelwerte aus den Messungen in den verschiedenen Puffern.

Ligand	Enzym	K_A (10^4 M^{-1})	ΔG° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta H^{\circ}_{\text{bind}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$-T\Delta S^{\circ}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
1	Trypsin	16.8	-30.5	0.03	-30.5
2	Trypsin	3.2	-25.7	-4.5	-21.2
3	Trypsin	3.4	-25.7	-5.23	-20.5
5	Trypsin	22.6	-29.9	-6.45	-23.5
6	Trypsin	3.4	-25.8	-1.66	-24.1
1	Thrombin	2998	-42.3	-6.19	-36.1
5	Thrombin	46.8	-31.9	-7.3	-24.6

3.2.7 Bestimmung der Wärmekapazität

Zur Bestimmung der Änderung der Wärmekapazität wurden die Titrationsexperimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindungsenthalpien für die Bindung an Trypsin wesentlich weniger von der Messtemperatur abhängen als für die Bindung an Thrombin (bezogen auf Ligand 5).

Die Bindungsreaktionen wurden in TRIS-Puffer in einem Temperaturbereich von 20 bis 40°C gegenüber beiden Enzymen in Schritten von 5°C durchgeführt.

Im Normalfall würde es sich anbieten, die Messungen in Pyrophosphatpuffer durchzuführen, da hier aufgrund der geringen Ionisierungsenthalpie dieses Puffers die überlagernden Effekte klein sein sollten. Da aber einige Liganden eine Enthalpie $\Delta H^{\circ} \cong 0$ in diesem Puffer zeigten, wurde der TRIS-Puffer gewählt, mit der Annahme, dass die Puffereffekte für alle Liganden aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede annähernd gleich sind.

Mit steigender Temperatur wird die gemessene Enthalpie stärker negativ. Dies bedeutet, dass aufgrund der Komplexbildung eine negative Wärmekapazitätsänderung ΔC_p für das System Enzym-Ligand beobachtet werden kann. Da die Enthalpie in dem oben genannten Temperaturbereich in sehr guter Näherung linear von der Temperatur abhängt (sämtliche

Regressionskoeffizienten r^2 sind größer als 0.98), ist die Annahme einer konstanten Wärmekapazitätsänderung in dem beobachteten Messbereich gerechtfertigt. Da weiterhin eine nahezu temperaturunabhängige Freie Enthalpie ΔG° beobachtet wird, ergibt sich als Konsequenz der starken Temperaturabhängigkeit der Enthalpie auch eine Temperaturabhängigkeit des entropischen Beitrages $-T\Delta S^\circ$. D.h. wenn die Temperatur ansteigt, wird der Bindungsprozess exothermer und gleichzeitig entropisch ungünstiger.

In Tabelle 3.20 sind die gemessenen Wärmekapazitätsänderungen ΔC_p zusammen mit den während der Komplexbildung vergrabenen Oberflächen für die Reaktionen von den Liganden **1**, **2**, **3** und **5** gegenüber Trypsin sowie von Ligand **5** gegenüber Thrombin aufgeführt. Für die Bindung an Thrombin wurde dabei ein signifikant höherer Wert für die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p gemessen.

Bei den berechneten Oberflächen handelt es sich um die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen (Connolly-Oberfläche berechnet mit einem Sondenradius von 1.5 Å). Die Oberfläche, die bei der Komplexbildung vergraben wird, errechnet sich aus der Differenz der Summe der Oberflächen des freien Enzyms und Liganden einerseits und der Oberfläche des neu gebildeten Komplexes andererseits. Der polare Oberflächenanteil ist derjenige Anteil, der durch die polaren Atome wie Sauerstoff und Stickstoff gebildet wird. Die Differenz aus der Gesamtfläche und der polaren Oberfläche ist der apolare Oberflächenanteil.

Tabelle 3.20 Wärmekapazitätsänderungen und vergrabene lösungsmittelzugängliche Oberflächen (Connolly Oberflächen) aufgrund der Komplexbindung mit Trypsin bzw. mit Thrombin. Die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p (in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) wurde im TRIS-Puffer gemessen. Für **5** in Trypsin wurden die fehlende Reste vor der Berechnung ergänzt und für **5** in Thrombin wurde, da keine Kristallstruktur vorhanden ist, als Basis ein bekannte Struktur verwendet und strukturell verändert, so dass die Oberflächen berechnet werden konnten.

Ligand	Enzym	Vergrabene Oberfläche (\AA^2)			ΔC_p ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)
		gesamt	polar	apolar	
1	Trypsin	492	193	299	-0.10 ± 0.04
2	Trypsin	497	203	294	0.07 ± 0.00
3	Trypsin	485	204	281	-0.16 ± 0.03
5	Trypsin	404	165	239	-0.54 ± 0.06
5	Thrombin	629	183	446	-2.11 ± 0.14

3.3 Selektivitätsunterschiede

3.3.1 Hintergrund

Docking wird mittlerweile als Routinemethode zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt. Doch arbeiten die zur Zeit verwendeten Docking-Verfahren ausschließlich mit einem einzigen Rezeptormolekül. Soll die Bindung an mehrere Proteine gleichzeitig untersucht werden oder sollen Aussagen über die Selektivität eines Inhibitors getroffen werden, so muss für jedes Protein ein separates Docking durchgeführt und daraufhin vergleichend ausgewertet werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein neues Verfahren von Christoph Sotriffer entwickelt.²³ Diesem *in-situ* Cross-Docking liegt die Idee zugrunde, dass im Falle eines Gitter-basierten Docking-Programms Gitter für einzelne Bindetaschen zu einem gemeinsamen Gitter zusammengefügt werden können. Das anschließende Docking erlaubt dem verwendeten Liganden die direkte Auswahl des optimalen Zielmoleküls und führt somit zu einer erheblichen Zeitersparnis.

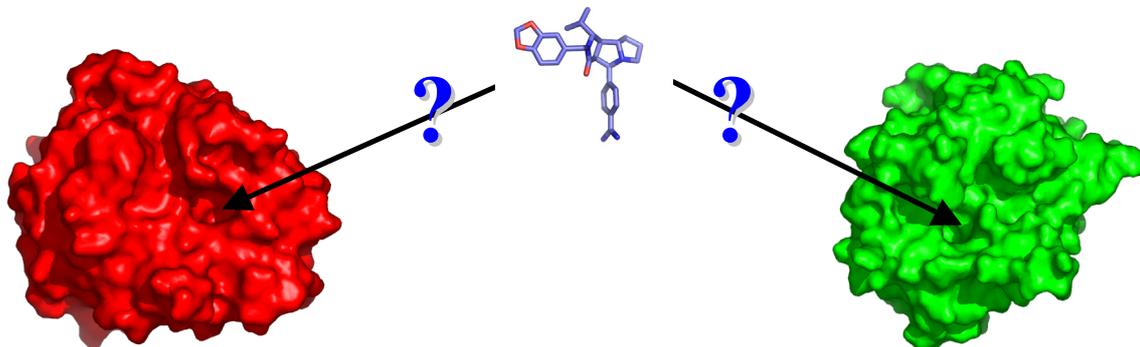


Abbildung 3.32 Methode des Cross-Docking zur Bestimmung der idealen Bindetasche für einen ausgewählten Liganden.

Da die Selektivitätsunterschiede zwischen Thrombin und Trypsin bei der Entwicklung selektiver Antikoagulantien eine wichtige Frage für das Wirkstoffdesign darstellt und viele experimentelle Daten für die verwendeten Liganden zu dieser Problematik in der vorliegenden Arbeit gesammelt wurden, sollte das Cross-Docking mit AutoDock getestet werden, um auf diesem Wege eine Aussage über die Selektivität der Liganden gegenüber Trypsin und Thrombin zu erhalten.

3.3.2 Methode des Cross-Docking

Zuerst mussten die Proteinstrukturen für das Docking vorbereitet werden. Es wurde der in dieser Arbeit bestimmte Komplex von Trypsin mit Ligand **1** sowie die Struktur des Thrombin-Komplexes aus der Arbeit von Obst *et al.*² jeweils ohne Wassermoleküle und ohne Liganden eingesetzt. Die Liganden wurden entweder aus einer der Kristallstrukturen entnommen oder anhand eines gegebenen Liganden durch Modellierung erzeugt. An die Proteinstrukturen wurden die polaren Wasserstoffatome addiert. Zusätzlich wurden die partiellen Atomladungen des AMBER Kraftfeldes sowie Solvationsparameter aus AutoDock 3.0²⁴ hinzugefügt.

Da AutoDock ein Gitter-basiertes Docking-Programm ist, wurden zuerst die separaten Standard-Gitter für jedes Protein erzeugt. Die Gitter wurden mit Hilfe von AutoGrid erzeugt, wobei jedes Gitter auf die entsprechende Bindetasche zentriert wurde. Anschließend wurden die Gitter der Proteine Thrombin und Trypsin zu einem gemeinsamen Gitter kombiniert, indem eine lineare Verschiebung entlang der x-Achse vorgenommen wurde. Die beiden Einzelgitter werden dabei durch eine 3 Å breite repulsive Zwischenschicht getrennt, um Artefakte während des Dockings zu vermeiden.

Die Koordinaten der Liganden wurden den Kristallstrukturen entnommen und im mol2-Format abgespeichert. Nachdem die Wasserstoffatome und Gasteiger-Marsili-Ladungen an den Liganden angefügt worden waren, wurden die frei drehbaren Bindungen des Liganden definiert.

Das Docking wurde mit dem Programm AutoDock unter Verwendung eines Standardprotokolls durchgeführt. Es wurden insgesamt 50 unabhängige Läufe durchgeführt und die erzielten Ergebnisse analysiert.

Alternativ zur Optimierung mit der in AutoDock implementierten Bewertungsfunktion, wurde das Docking analog unter Verwendung der *scoring*-Funktion DrugScore durchgeführt.²⁵ Dazu benötigen weder die Proteine noch die Liganden Wasserstoffatome oder Ladungen. Die wiederum auf die entsprechende Bindetasche zentrierten Gitter wurden in diesem Fall unmittelbar mit DrugScore erzeugt und in ein für AutoDock geeignetes Format umgewandelt. Ansonsten wurde das Zusammenfügen der einzelnen Gitter sowie das Docking analog durchgeführt.

3.3.3 Analyse der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm PyMOL²⁶ und einem von Ingo Dramburg hierzu entwickelten Zusatzmodul. Es wurde jeweils darauf geachtet, wie oft der jeweilige Ligand in einem der beiden Proteine platziert wurde und wie stark der aufgefundene Bindungsmodus von dem in der Referenzkristallstruktur abwich (siehe Abbildung 3.33). Der Bindungsmodus wurde danach beurteilt, ob der Benzamidinanker wie erwartet in die S₁-Tasche zeigt und das Fünfring-Grundgerüst wie in der Kristallstruktur bindet.

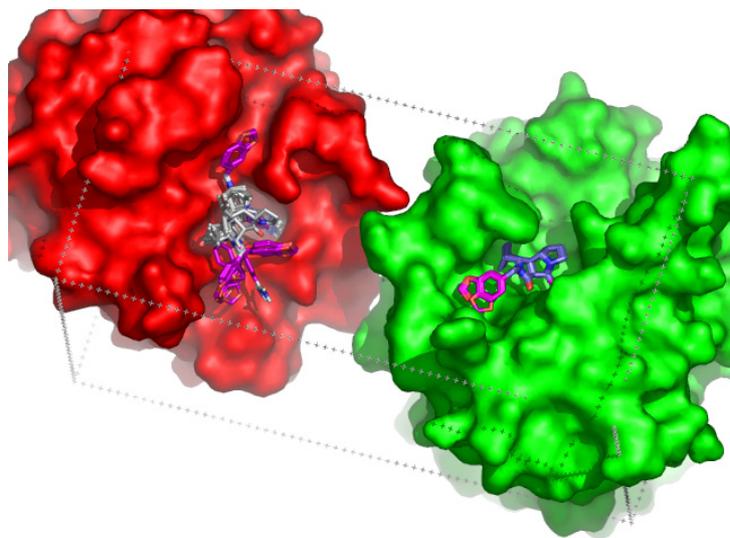


Abbildung 3.33 Beispiel für die Ergebnisse eines Dockingexperiments mit 50 unabhängigen Läufen. Von den 50 Lösungen wurde der Ligand 33 mal in Thrombin (grün) und 17 mal in Trypsin (rot) platziert.

In Tabelle 3.21 sind die mit DrugScore und der *scoring*-Funktion AutoDock erhaltenen Ergebnisse gegenübergestellt. Angegeben ist jeweils der *score* in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, anhand dessen die *scoring*-Funktionen die jeweilige Platzierung des Liganden bewerten, wobei immer die beste Lösung für den Liganden im entsprechenden Protein verwendet wurde. Darüber ist die Häufigkeit angeführt, mit der der entsprechende Ligand entweder in Thrombin oder in Trypsin platziert wurde (in Klammern steht die Anzahl der Lösungen, die nicht dem erwarteten Bindungsmodus entsprach). In der untersten Zeile der Tabelle 3.21 sind die experimentellen Selektivitätsquotienten der Bindung an Thrombin gegenüber Trypsin angegeben. Es fällt auf, dass für die Liganden, die einen hohen Selektivitätsunterschied aufweisen, auch eine größere Anzahl der Lösungen in Thrombin als in Trypsin gefunden wurde. Entsprechend dazu ist der Docking-*score* für diese Liganden auch um den erwarteten Betrag höher.

Tabelle 3.21 Vergleich der Docking-Ergebnisse unter Verwendung der DrugScore- (DS) und der AutoDock-Bewertungsfunktion (AD). Die obere Zahl steht für die Häufigkeit, mit der der Ligand in diesem Protein gefunden wurde. In Klammern steht die Anzahl der Lösungen, die nicht dem erwarteten Bindungsmodus entsprach. Darunter sind die Werte der gedockten Energie in $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für die jeweils beste Lösung angegeben.

	(+)-L1 ¹	(+)-L2	(-)-L2 ²	(+)-L3	(+)-L4	(+)-L5	(+)-L6	(+)-L7
Thr	47	34 (4)	(34)	43	2 (34)	(39)	46	(41)
DS	- 64.0	- 64.5	- 38.4	- 63.8	- 56.6	- 60.8	- 62.5	- 67.3
Try	1 (2)	3 (9)	(16)	(7)	13 (1)	7 (4)	3 (1)	(9)
DS	- 50.9	- 52.3	- 33.8	- 54.7	- 54.9	- 55.9	- 50.8	- 61.9
Thr	32	21 (10)	1 (16)	33	2 (12)	(22)	23	2 (15)
AD	- 61.5	- 62.4	- 32.0	- 61.7	- 53.1	- 55.3	- 59.5	- 51.5
Try	11 (7)	12 (7)	11 (22)	11 (6)	15 (21)	12 (16)	18 (9)	20 (13)
AD	- 51.5	- 52.0	- 29.7	- 51.4	- 55.0	- 53.6	- 49.5	- 53.0
$\frac{K_i(\text{Trypsin})}{K_i(\text{Thrombin})}$	800	230 ³	(230) ³	210 ³	2.6 ³	3.6 ³	77 ³	7 ³

¹ Die Stereochemie des höher affinen Enantiomers wurde aufgrund der bestimmten Geometrie in den Kristallstrukturen eingestellt.

² Verwendung des optischen Antipoden.

³Angabe für das Racemat.

Die Selektivitätsvergleiche $K_i(\text{Trypsin})/K_i(\text{Thrombin})$ sind in Tabelle 3.22 für die Ergebnisse des Dockings dargestellt. Es wurde der vom Programm berechnete K_i -Werte für die jeweils beste Lösung in jedem Enzym verwendet. Für die Liganden **1**, **2** und **7** liegen die Ergebnisse für die Bewertung mit DrugScore eher im erwarteten Bereich, wohingegen die Ergebnisse für die Bewertung mit AutoDock für die Liganden **4**, **5** und **6** näher an die Ergebnisse aus dem biologischen Test herankommen.

Tabelle 3.22 Selektivitätsvergleich des *scorings* mit DrugScore (DS) und mit AutoDock (AD).

	(+)-L1	(+)-L2	(-)-L2	(+)-L3	(+)-L4	(+)-L5	(+)-L6	(+)-L7
$\frac{K_{i,ber}(\text{Trypsin})}{K_{i,ber}(\text{Thrombin})}$								
für DS								
$\frac{K_{i,ber}(\text{Trypsin})}{K_{i,ber}(\text{Thrombin})}$	226	161	5	59	15	8	169	5
für AD								
$\frac{K_{i,ber}(\text{Trypsin})}{K_{i,ber}(\text{Thrombin})}$	54	83	2	89	5	3	61	0.6
$\frac{K_{i,exp}(\text{Trypsin})}{K_{i,exp}(\text{Thrombin})}$	800	230 ³	(230) ³	210 ³	2.6 ³	3.6 ³	77 ³	7 ³

³Angabe für das Racemat.

Beim Vergleich des rmsd-Wertes aus den Docking-Ergebnissen für die beste Lösung in Thrombin für Ligand **1** zeigt sich, dass für die Lösung mit der günstigsten Energie der Wert sowohl unter Verwendung der DrugScore- als auch der AutoDock-Bewertungsfunktion bei 0.42 Å liegt. Für alle anderen Liganden wurde visuell bewertet, wie gut der Bindungsmodus dem von Ligand **1** aus der Referenzstruktur entspricht. Dabei wurde, wie bereits erwähnt, darauf geachtet, dass der Benzamidinanker in die S₁-Tasche zeigt und das Fünfring-Grundgerüst analog zur Kristallstruktur bindet. Eine Überlagerung aller Lösungen für Thrombin, für die der Bindungsmodus als „der Kristallstruktur ähnlich“ definiert wurde, zeigt eine relativ gute Übereinstimmung (siehe Abbildung 3.34). Hierbei ist auch deutlich zu sehen, warum für Ligand **5** (orange) der Bindungsmodus als „nicht der Kristallstruktur entsprechend“ bewertet wurde.

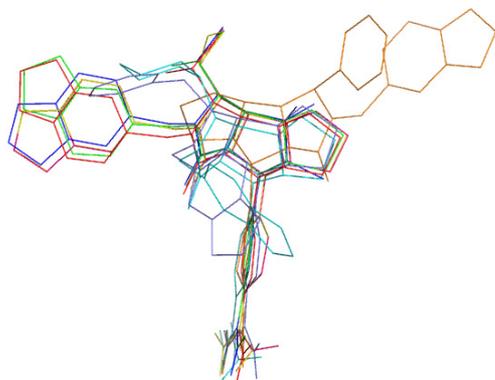


Abbildung 3.34 Grafische Darstellung der Überlagerung der jeweils besten Lösung für Thrombin mit der Kristallstruktur (rot).

3.4 Ergebnisse der Synthese

3.4.1 Synthese der Liganden

Die für die Studien verwendeten Liganden **1** - **6**, die bereits von Ulrike Obst im Rahmen ihrer Dissertation¹⁹ synthetisiert wurden (siehe auch Kapitel 2.8), konnten in dieser Arbeit mit den in Abbildung 3.35 angegebenen Ausbeuten synthetisiert werden. Der neu entworfenen Ligand **7** konnte mit einer Ausbeute von 140 mg synthetisiert werden.

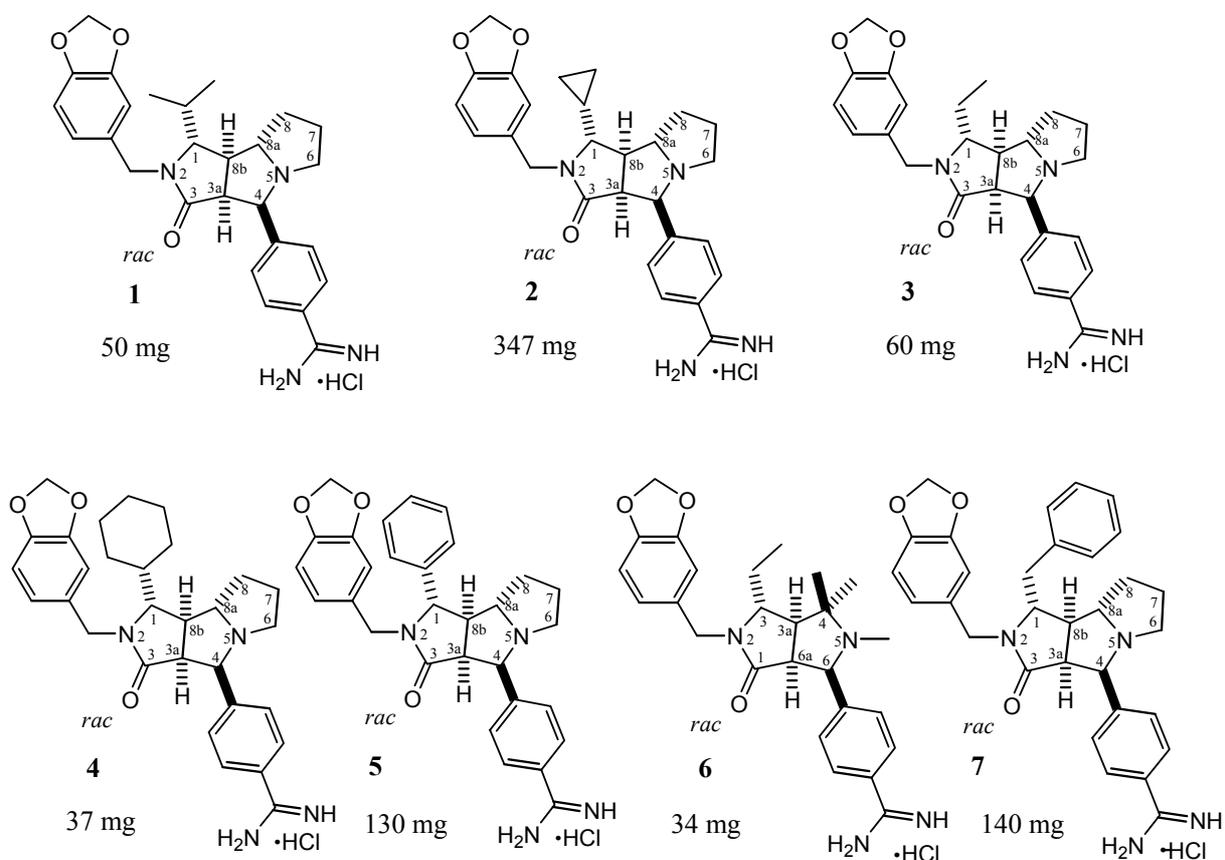


Abbildung 3.35 Die für diese Studie ausgewählten Thrombin-Inhibitoren und die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Gesamtausbeuten.

3.4.2 Trennung der Enantiomere

Zuerst wurde versucht, die Enantiomere mit Hilfe einer chiralen, analytischen HPLC-Säule zu trennen. Trotz der Verwendung verschiedener Lösungsmittelgradienten war es nicht möglich, die Enantiomere zu trennen.

Anschließend wurde versucht, die Enantiomere nach der gleichen Vorschrift über Diastereomere zu trennen wie es bereits von Ulrike Obst für den Ligand **1** beschrieben wurde. Dazu wurde die Toluolsulfinyl-Verbindung **30** mit D-(-)-Methylsäuremethylester umgesetzt (siehe Abbildung 3.36). Zuerst konnte keine Umsatz beobachtet werden. Erst nach der Erhöhung der Konzentration des Katalysators Pyridinium-toluene-4-sulfonat um das 100fache der von Ulrike Obst angegebenen Menge konnte, wie mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt wurde, ein fast vollständiger Umsatz erzielt werden. Die anschließende Trennung der Diastereomere durch eine normale Filtration über Kieselgel führte zur Zersetzung des Produktes. Aufgrund des sauren Charakters des Kieselgels wurde es vor der Filtration mit 10 % Wasser deaktiviert (dies entspricht der Aktivitätsstufe 5), um so eine Zersetzung zu verhindern. Wiederum konnten die Diastereomere nicht getrennt werden, es wurde jedoch keine Zersetzung mehr beobachtet. Zuletzt wurde eine Trennung dieser Diastereomere mit Hilfe einer präparativen HPLC-Säule versucht. Hierbei konnte auch nur Zersetzungsprodukt isoliert werden.

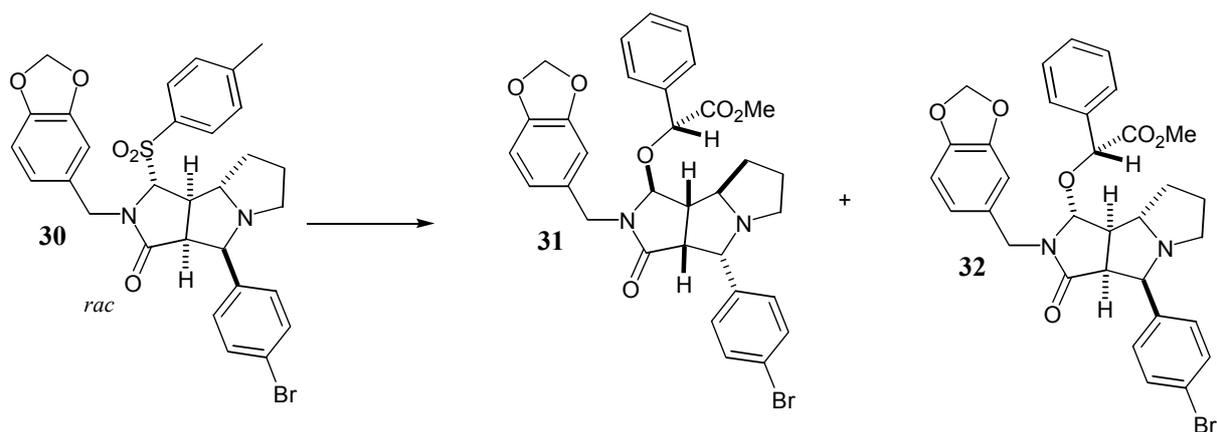


Abbildung 3.36 Synthese der Diastereomere **31** und **32** ausgehend von der Toluolsulfinyl-Verbindung **30**.

Als Alternative wurde von Hans-Dieter Gerber der Versuch gestartet, die Enantiomere über fraktionierte Kristallisation als diastereomere Salze zu trennen (siehe Abbildung 3.37). Hierzu musste zunächst aus dem Hydrochlorid die freie Base mit Kaliumcarbonat freigesetzt werden. Die freie Base, die als weißer Feststoff erhalten wurde, wurde mit Campher-10-(+)-(*IS*)-sulfonsäure in verschiedenen Lösungsmitteln umgesetzt und zur langsamen Kristallisation über mehrere Tage stehen gelassen. In Isopropanol und Ethylacetat bildeten sich keine Kristalle. Erst in Acetonitril entstand ein kristalliner Niederschlag. Der Niederschlag war jedoch so fein, dass es nicht möglich war, diesen nach der Filtration zu isolieren.

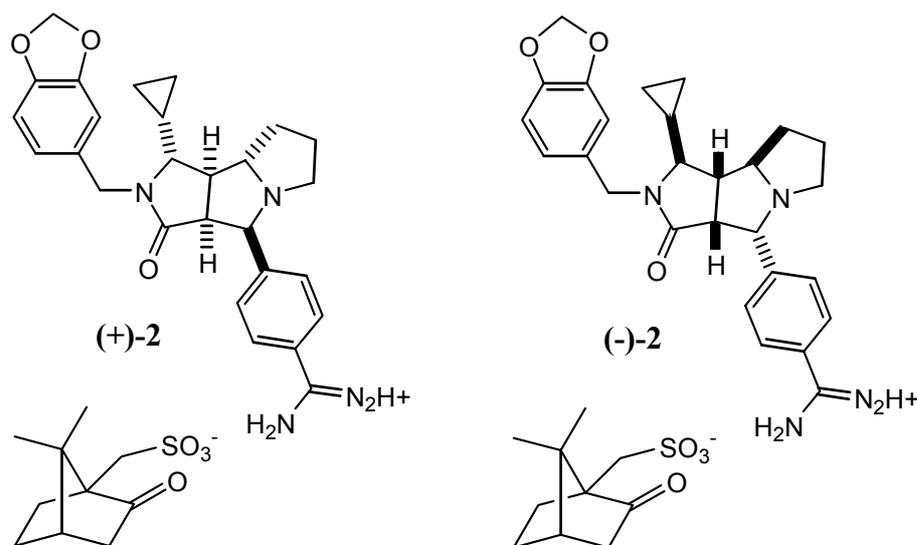


Abbildung 3.37 Kristallisation der Enantiomere des Liganden **2** mit Campher-10-(+)-(1*S*)-sulfonsäure.

3.5 Literatur

1. McLachlan, A. D. (1982). Rapid comparison of protein structures. *Acta Cryst. A* 38, 871-873.
2. Obst, U., Banner, D. W., Weber, L. & Diederich, F. (1997). Molecular recognition at the thrombin active site: structure-based design and synthesis of potent and selective thrombin inhibitors and the X-ray crystal structures of two thrombin-inhibitor complexes. *Chem. Biol.* 4, 287-95.
3. Dullweber, F., Stubbs, M. T., Musil, D., Stürzebecher, J. & Klebe, G. (2001). Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. *J. Mol. Biol.* 313, 593-614.
4. Reers, M., Koschinsky, R., Dickneite, G., Hoffmann, D., Czech, J. & Stüber, W. (1995). Synthesis and characterization of novel thrombin inhibitors based on 4-amidinophenylalanine. *J. Enzyme Inhib.* 9, 61-72.
5. Radau, G., Gebel, J. & Rauh, D. (2003). New cyanopeptide-derived low molecular weight thrombin inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 336, 372-80.
6. Radau, G., Schermuly, S. & Fritsche, A. (2003). New cyanopeptide-derived low molecular weight inhibitors of trypsin-like serine proteases. *Arch Pharm (Weinheim)* 336, 300-9.
7. Moore, R. E. (1996). Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16, 134-43.

8. Trimurtulu, G., Ohtani, I., Patterson, G. M. L., Moore, R. E., Corbett, T. H., Valeriote, F. A. & Demchik, L. (1994). Total Structures of Cryptophycins, Potent Antitumor Depsipeptides from the Blue-Green Alga *Nostoc* sp. Strain GSV 224. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4729-4737.
9. Moore, R. E., Bornemann, V., Niemczura, W. P., Gregson, J. M., Chen, J. L., Norton, T. R., Patterson, G. M. L. & Helms, G. L. (1989). Puwainaphycin C, a cardioactive cyclic peptide from the blue-green alga *Anabaena* BQ-16-1. Use of two-dimensional carbon-13-carbon-13 and carbon-13-nitrogen-15 correlation spectroscopy in sequencing the amino acid units. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 6128-6132.
10. Zhang, L. H., Longley, R. E. & Koehn, F. E. (1997). Antiproliferative and immunosuppressive properties of microcolin A, a marine-derived lipopeptide. *Life Sci.* 60, 751-62.
11. Radau, G. (2000). Serine proteases inhibiting cyanopeptides. *Pharmazie* 55, 555-60.
12. Holdgate, G. A. (2001). Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques* 31, 164-6, 168.
13. de Donder, T. (1920). *Leçons de Thermodynamique et de Chimie Physique* (van der Dungen, T. & van Lerberghe, G., Eds.), Gauthier-Villaers, Paris.
14. Indyk, L. & Fisher, H. F. (1998). Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol* 295, 350-64.
15. Chellani, M. (1999). *Application Note*.
16. Sigurskjold, B. W. (2000). Exact Analysis of Competition Ligand Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry. *Anal. Biochem.* 277, 260-266.
17. Liu, Y. & Sturtevant, J. M. (1995). Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. II. *Prot. Sci.* 4, 2559-2561.
18. Naghibi, H., Tamura, A. & Sturtevant, J. M. (1995). Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 5597-5599.
19. Obst, U. (1997). De-novo-Design und Synthese neuartiger, nichtpeptidischer Thrombin-Inhibitoren., ETH, Nr. 12037.
20. Lottenberg, R., Hall, J. A., Blinder, M., Binder, E. P. & Jackson, C. M. (1983). The Action of Thrombin on Peptide *p*-Nitroanilide Substrates. Substrate Selectivity and Examination of Hydrolyses under Different Reaction Conditions. *Biochimica et Biophysica Acta* 742, 539-557.
21. Czodrowsky, P. (2005). personal communication.

22. Di Cera, E., De Cristofaro, R., Albright, D. J. & Fenton, J. W., 2nd. (1991). Linkage between proton binding and amidase activity in human alpha-thrombin: effect of ions and temperature. *Biochemistry* 30, 7913-24.
23. Sotriffer, C. A. & Dramburg, I. (2005). "In-situ Cross-Docking" to Simultaneously Address Multiple Targets. *Med. Chem.*, in press.
24. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639-1662.
25. Sotriffer, C. A., Gohlke, H. & Klebe, G. (2002). Docking into knowledge-based potential fields: a comparative evaluation of DrugScore. *J. Med. Chem.* 45, 1967-70.
26. DeLano, W. L. (2004). PyMOL pymol-0_97-bin-win32 edit. DeLano Scientific LLC.

4 Diskussion

4.1 Zusammenhang zwischen Kristallstruktur und Selektivität

Die Überlagerung der Liganden **1** - **7** im Komplex mit Trypsin hat bereits gezeigt, dass die Liganden mit starrem Grundgerüst ohne große Unterschiede binden. Die einzigen deutlichen Abweichungen sind bei der Piperonylgruppe zu erkennen, für die teilweise mehrere Bindungsgeometrien beobachtet werden. Die Liganden unterscheiden sich in erster Linie nur in Bezug auf den Alkyl- bzw. Arylsubstituenten, der in die S_2 -Tasche zeigt. Hieraus begründen sich auch die sehr ähnlichen Affinitäten gegenüber Trypsin. Die S_2 -Tasche ist bei Trypsin nach oben hin nicht begrenzt und somit scheint es von untergeordneter Bedeutung zu sein, welche Substituenten die Liganden in dieser Position tragen. Die geringen Unterschiede in der Affinität der Liganden gegenüber Trypsin lassen sich nur schwer erklären, da alle Liganden die gleiche Anzahl an Wasserstoffbrücken zum Protein formen. Alle Liganden bilden zusätzlich Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen in der Bindetasche, wobei die Liganden **1**, **2**, **3** und **6** durch jeweils zwei Wassermoleküle stabilisiert werden, die verbleibenden Liganden jedoch nur durch ein Wassermolekül.

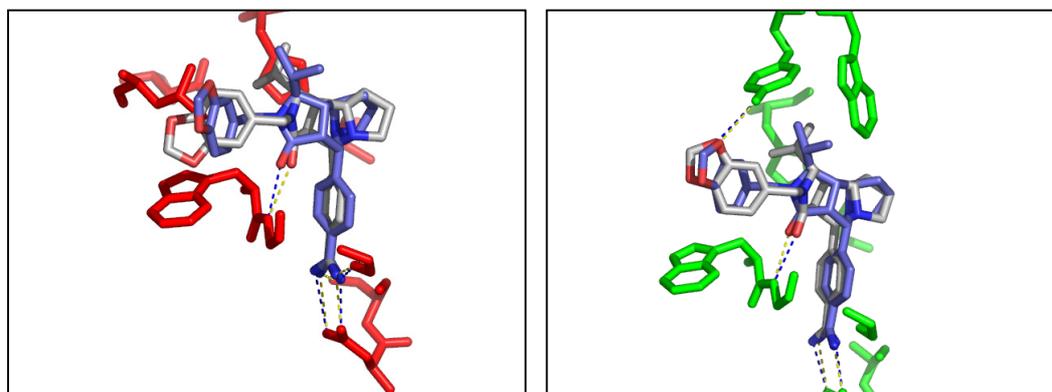


Abbildung 4.1 Überlagerung der beiden Enantiomere von **1** links in der Bindetasche von Trypsin (wichtige Aminosäuren in rot) und rechts in der Bindetasche von Thrombin (wichtige Aminosäuren in grün), das jeweils affinere Enantiomer ist in dem kristallographisch bestimmten Bindungsmodus gezeigt (Kohlenstoffatome weiß), die Geometrie des Spiegelbilds wurde rechnerisch mit MOLOC simuliert (Kohlenstoffatome blau).

Für **1** ist bekannt, dass sich beide Enantiomere bei der Bindung gegenüber Trypsin nur um den Faktor 22 in ihrer Affinität unterscheiden. Das lässt sich mit der nach oben offenen Bindetasche erklären. Die Kristallstruktur zeigt zwar trotz des geringen Affinitätsunterschieds nur das (1*R*,3*aS*,4*R*,8*aS*,8*bR*)-Enantiomer ((+)-**1**) in der Bindetasche, das das höher affine

Stereoisomer darstellt (siehe Tabelle 3.10). Prinzipiell kann aber auch bei dem (1*S*,3*aR*,4*S*,8*aR*,8*bS*)-Enantiomer ((-)-**1**) der Benzamidinanker in die S₁-Tasche binden und der verbleibende Teil des Liganden findet in der offenen Bindetasche ausreichend Platz (Abbildung 4.1).

Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass auch für die anderen Liganden der Affinitätsunterschied zwischen beiden Enantiomeren im gleichen Bereich liegt wie bei Ligand **1**. Auffallend ist aber, dass offensichtlich nur das besser bindende Enantiomer in allen Trypsin-Strukturen zu erkennen ist. Es war nicht möglich, das schwächer affine (1*S*,3*aR*,4*S*,8*aR*,8*bS*)-Enantiomer von Ligand **1** oder einem der anderen Liganden in die experimentell ermittelte Dichte einzubauen.

Die Überlagerung der drei Liganden im Komplex mit Thrombin zeigt noch geringere Unterschiede in deren Orientierung. Ein Grund dafür ist eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe des Tyr60A und der Piperonylgruppe, die dadurch in einer Bindungskonformation fixiert wird, die abweichend von der Situation im Trypsin ist. Diese konformative Fixierung sollte der Bindungsaffinität eigentlich durch den Verlust von Freiheitsgraden aus entropischen Gründen abträglich sein. Allerdings werden die Liganden bei der Bindung an Thrombin zu einem deutlich größeren Anteil in ihrer Oberfläche bei der Bindung an Thrombin vergraben als bei Trypsin (siehe Tabelle 3.20). Für Ligand **5** zum Beispiel liegen die Werte für die gesamte vergrabene Oberfläche im Komplex mit Trypsin mit 404 Å² wesentlich niedriger als gegenüber Thrombin mit 629 Å². Der Grad der vergrabenen Oberfläche korreliert mit dem Ausmaß, in dem ein Ligand Kontakte mit dem umgebenden Protein eingehen kann. Falls sich diese Kontakte als energiegünstig erweisen, resultiert daraus eine höhere Bindungsaffinität. Diese Kontakte scheinen somit im Falle von Thrombin tatsächlich energetisch günstig zu sein.

Bei Thrombin spielt weiterhin die Größe der Alkyl- bzw. Arylgruppe in 1-Position eine entscheidende Rolle für die erzielte Bindungsaffinität. Im Gegensatz zu Trypsin ist der zugängliche Raum der S₂-Tasche bei Thrombin durch den 60er-*Loop* begrenzt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die sterische Hinderung durch den Tyr60A-Trp60D-Teil des 60er-*Loops* einer der Gründe für die enge Substratspezifität von Thrombin ist.¹ Somit wirkt sich eine zu große Gruppe in dieser Position negativ auf die Affinität aus (siehe Abbildung 4.2).

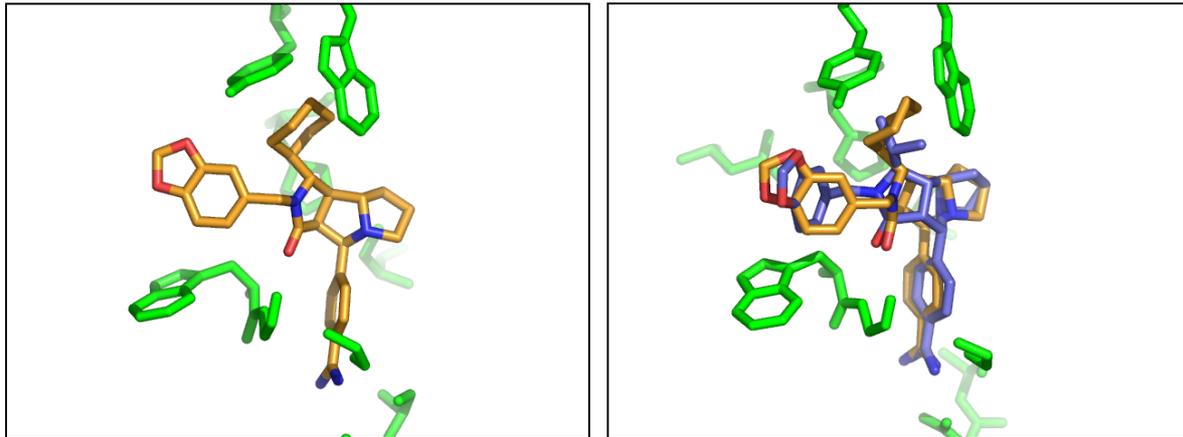


Abbildung 4.2 Ligand **4** (links) in der Bindetasche von Thrombin. Der Ligand wurde ausgehend von Ligand **1** in die Bindetasche eingebaut, da keine Kristallstruktur vorhanden war. Sein Cyclohexylsubstituent ist sterisch zu groß für die räumlich begrenzte S_2 -Tasche. Rechts sind die modellierten Komplexe von **4** und dem schlechter bindenden (-)-**1** überlagert. Die Isopropylgruppe in (-)-**1** kommt Trp60D vergleichbar mit **4** sehr nahe.

Entsprechend fallen die Affinitäten für die Liganden **4**, **5** und **7** gegenüber Thrombin um mehr als zwei Größenordnungen im Vergleich zu den Liganden **1**, **2** und **3** deutlich ab, da die Cyclohexyl-, Phenyl- und Benzylgruppe nicht optimal unter den *60er-Loop* passen. Die Liganden **1**, **2** und **3** unterscheiden sich nur gering in ihrer Affinität gegenüber Thrombin. Der *60er-Loop* und die somit begrenzte S_2 -Tasche ist auch der Grund für den großen Affinitätsunterschied zwischen den Enantiomeren des Liganden **1** (Abbildung 4.1 rechts). Die extrem hohe Selektivität dieses Liganden gegenüber Thrombin kann dadurch erklärt werden, dass das besser bindende Enantiomer mit seiner Isopropylgruppe absolut optimal in die S_2 -Tasche von Thrombin passt und zusätzlich zu der Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des Tyr60A auch noch zahlreiche Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Tyr60A und Trp60D beobachtet werden können. Dadurch erzielt das (+)-**1** Enantiomer eine Affinität von 7 nM, wohingegen das andere Stereoisomer mit 5600 nM noch schlechter als die Derivate **4**, **5** und **7** bindet. Wird dagegen der Bindungsmodus des schwächer bindenden Stereoisomers betrachtet, so fällt auf, dass aufgrund der anderen Bindungsgeometrie weniger günstige Van-der-Waals-Wechselwirkungen möglich sind und sich die Isopropylgruppe und das Trp60D relativ nahe kommen (Abb. 4.1 rechts). Die Werte für die Derivate **4**, **5** und **7** beziehen sich auf die Racemate, doch legen die im Folgenden zu diskutierenden Titrationskurven nahe, dass beide Enantiomere dieser drei Liganden mit sehr ähnlicher Affinität an Thrombin binden (Differenz um einen Faktor von 10 - 20). Somit erscheinen die aus sterischen Gründen ungünstigen Wechselwirkungen der großen Cyclohexyl-, Phenyl- bzw. Benzylgruppe in 1-Position in beiden Enantiomeren mit den Resten des *60er-Loop* vergleichbar. Für die Bindung an Trypsin erweist sich die Isopropylgruppe als nicht ideal, die

Bindungskonstante dieses Derivats liegt nur im mikromolaren Bereich. Auch für die Bindung der Enantiomere von **1** gegenüber Trypsin ist kein großer Selektivitätsunterschied (nur ein Faktor von 22) zu erkennen, was sich auch sehr schön an den Titrationskurven (siehe Abbildung 3.26) beobachten lässt. Befinden sich andere Reste als eine Isopropylgruppe an dem Ringsystem, so werden zwar geringfügig bessere Bindungsaffinitäten gegenüber Trypsin erzielt, wie die Titrationskurven aber nahe liegen sind für beide Stereoisomere aller Liganden ähnliche Bindungsaffinitäten gegen Trypsin anzunehmen. Dies lässt sich mit der wenig strukturierten weit offenen Bindetasche des Trypsins in diesem Bereich erklären. Somit scheint (+)-**1** seine Selektivität gegenüber Thrombin (Enantiomerenpräferenz von Faktor 800) in Folge seiner optimalen Passung der Isopropylgruppe zu gewinnen, wobei vor allem (-)-**1** durch seine schlechte Passform deutlich an Affinität einbüßt. Die zweistufigen Titrationskurven für **2**, **3** und **6** gegenüber Thrombin (siehe Kapitel 4.3) verweisen auf einen geringeren Selektivitätsunterschied für diese Liganden. Zunächst erreichen die kleinere Cyclopropyl- bzw. Ethylgruppe eine schlechtere Raumbfüllung in der S_2 -Tasche unter dem 60er-Loop für die (+)-Enantiomere im Vergleich zu (+)-**1**. Umgekehrt sollte aber für die spiegelbildlichen (-)-Isomere der sterische Konflikt mit den Resten dieses Loops geringer ausfallen, da die räumlich kleinere Cyclopropylgruppe bzw. der konformativ flexible Ethylrest den Aminosäuren im 60er-Loop besser ausweichen können. Dieser vermutlich geringere Affinitätsabfall der (-)-Derivate von **2**, **3** und **6** ist für die weniger ausgeprägte Enantioselektivität dieser Liganden verantwortlich.

4.2 Bindungskonstante, Vergleich mit K_i -Werten

Im Vergleich zu den enzymkinetisch bestimmten pK_i -Werten fällt für die pK_D -Werte für die Bindung an Trypsin auf, dass die meisten Werte zu niedrig liegen. Für die Liganden **5** und **7** sind der pK_D -Wert und der pK_i -Wert fast gleich und auch für Ligand **1** ist die Korrelation noch recht gut. Für die Bindung an Thrombin liegen alle pK_D -Wert etwas zu niedrig. In anderen Arbeiten konnte dagegen gezeigt werden, dass eine befriedigende Korrelation zwischen K_D und K_i besteht.

Diese Beobachtungen lassen sich vermutlich darauf zurückführen, dass alle Liganden bei den Messungen als Racemate vorlagen. Alles deutet darauf hin, dass die K_D/K_i -Korrelation für diejenigen Liganden recht gut ausfällt, für die der Unterschied in den Affinitäten zwischen beiden Enantiomeren relativ gering ist. Sind die Affinitäten nahezu gleich, so nimmt für beide

Enantiomere die Titrationskurve den gleichen Verlauf an und somit können bei den Messungen identisch überlagerte einstufige Titrationskurven beobachtet werden, die gut auszuwerten sind. Je größer der Affinitätsunterschied ist, desto mehr weicht die Titrationskurve von dem einstufigen sigmoidalen Verlauf ab bis sie schrittweise in eine zweistufige Titrationskurve übergeht. Diese zweistufige Titrationskurve ist gut zu erkennen, wenn sich die Enantiomere etwa um einen Faktor zwischen 70 und 200 in ihrer Affinität unterscheiden. Wird dieser Faktor deutlich größer, geht die Kurve wieder in eine nahezu sigmoidale Titrationskurve über, so dass eigentlich nur noch die Bindung des stärker affinen Enantiomers gemessen wird. Bei geringen Affinitätsdifferenzen deuten sich Abweichungen vom einfachen Verlauf am Ende einer Titration (weitgehende Sättigung des Proteins, siehe zum Beispiel Abbildung 3.26 rechts) an, dagegen machen sich starke Unterschiede in den Bindungsaffinitäten beider Liganden in Abweichungen vom sigmoidalen Kurvenverlauf zu Beginn der Titration (frühe Verdrängung des schwächer bindenden Liganden durch den hochaffinen Liganden) bemerkbar (siehe Abbildung 3.26 links).

4.3 Racemische Mischungen

Den Auswertungen der zweistufigen Titrationskurven liegt folgendes Bindungsmodell eines racemischen Gemischs zugrunde. Zunächst wird das racemische Gemisch in das Protein titriert. So lange keine stöchiometrische 1:1 Zugabe des Racemats zu dem Protein erreicht ist, findet jedes zugegebene Ligandenmolekül im Prinzip ein unkomplexiertes Proteinmolekül vor. Es stellen sich zwei überlagerte Gleichgewichte ein, wobei die Assoziations- und die Dissoziationsraten von den Affinitäten der beiden Enantiomere zum Protein abhängen. Das höher affine Enantiomer verbleibt im Mittel länger am Enzym als das schwächere und somit schneller austauschende Enantiomer. Die Kurvenform der ersten Titrationskurve wird somit von der gemittelten Assoziations-/Dissoziationskonstante des Racemats bestimmt. Der Bereich, in den diese Konstante fällt, bestimmt den Kurvenverlauf der Titrationskurve (siehe Abbildung 3.19). Nach stöchiometrischer 1:1 Zugabe des Racemats erfolgt nun die schrittweise Verdrängung des schwächer affinen Enantiomers durch das stärker affine Enantiomer bis die Titrationskurve in eine sigmoidale Sättigung hineinläuft, bei der das gesamte vorliegende Protein praktisch von dem stärker affinen Enantiomer gesättigt ist. Ist der Affinitätsunterschied zwischen beiden Enantiomeren nicht zu groß, muss sich der verdrängende Ligand erst in gewissem Grad in der Lösung anreichern, um zu einer messbaren

Verdrängung zu führen. Dies drückt sich in einer Abflachung der Titrationskurve aus. Der Kurvenverlauf des zweiten Teils der sigmoidalen Kurve wird somit von der Bindungskonstanten des stärker affinen Enantiomers geprägt, das das schwächer bindende Enantiomer verdrängt. Dabei ist aber nicht zu vernachlässigen, dass durch die Zugabe des Racemats auch die Konzentration des schwächer bindenden Enantiomers in der Lösung erhöht und das Assoziations-/Dissoziationsgleichgewicht beeinflusst wird. Insgesamt ergibt sich daraus ein sehr komplexes miteinander verwobenes Titrationsgleichgewicht.

Die zweistufigen Titrationskurven sind in der vorliegenden Arbeit für die Liganden **2**, **3** und **6** gegenüber Thrombin beobachtet worden. Für Ligand **1** deutet sich eine Aufspaltung am Anfang der Titration gegen Thrombin an. Die Titration aller Liganden gegen Trypsin bzw. die Titration von **4**, **5** und **7** gegen Thrombin weisen leichte Abweichungen vom sigmoidalen Verlauf am Ende der Titration auf. Hier ist somit zu vermuten, dass beide Enantiomere eine ähnliche Affinität gegen das Protein aufweisen.

Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurden zwei Modellsysteme untersucht. Zunächst wurden die separaten Enantiomere von D- und L-NAPAP gegen Trypsin titriert. Es ergeben sich sigmoidale Kurvenverläufe, aus denen sich K_A , ΔG° , ΔH° und $-\Delta S^\circ$ entnehmen lassen. Dann wurde das Racemat titriert. Es ergibt sich eine zweistufige Titrationskurve. Die Auswertung des unteren Kurvenverlaufs ergibt einen Wert für K_D , der sehr gut mit dem K_i des D,L-NAPAP-Racemats übereinstimmt. Die Bindung beider Enantiomere erfolgt bis zur Sättigung des Proteins (Stöchiometrie = 1). Danach beginnt die Verdrängung des schwächer bindenden Enantiomers (L-NAPAP) durch das affinere (D-NAPAP). Bei separater Auswertung des oberen Kurvenverlaufs ergibt sich ein Wert für die Bindungskonstante, der sehr gut mit dem K_D -Wert für die Bindungskonstante aus der Einzelmessung von D-NAPAP übereinstimmt.

Anschließend wurde gezielt ein 50:50 Gemisch zweier mit unterschiedlicher Bindungsaffinität bindender, stereochemisch reiner Liganden hergestellt. Dazu wurden CRC220 (**25**) und NapEt (**29**) ausgewählt, die mit einer Affinitätsdifferenz von Faktor 73 an Trypsin binden. Auch hier resultiert eine zweistufige Titrationskurve, die sich analog zu oben auswerten lässt. Die untere Kurve deutet wiederum die Bindungskonstante des Gemischs, die obere die des stärker affinen CRC220 an.

4.4 Änderung der Protonierungszustände bei der Bindung

Die Liganden besitzen alle jeweils zwei ionisierbare funktionelle Gruppen: eine stark basische Amidgruppe ($pK_a > 11$) und ein tertiäres Amin ($pK_a \cong 5 - 6.5$), dessen Stickstoff außer bei Ligand **6** in einem der Fünfring eingebettet ist. Wie in Kapitel 3.2.6 erwähnt, werden bei der Bindung sowohl an Thrombin wie auch an Trypsin im stöchiometrischen Verhältnis zwischen 0.09 und 0.38 mol Protonen an den Puffer abgegeben. Grundsätzlich unterscheiden sich die Liganden somit untereinander nicht in ihrem Verhalten während der Bindung. Der einzige Unterschied liegt in der Anzahl der übertragenen Protonen. Aufgrund der geringen strukturellen Unterschiede der Liganden ist ein ähnliches Verhalten in diesem Fall zu erwarten.

Legt man die Henderson-Hasselbalch-Gleichung zugrunde, können die Liganden aufgrund ihres pK_a -Wertes nicht so viele Protonen abgeben wie bei der gesamten thermodynamischen Messung an den Puffer übertragen werden. Dies lässt darauf schließen, dass zusätzlich eine der Aminosäuren in der Bindetasche ebenfalls Protonen abgibt. Wie pK_a -Berechnungen an diesem und vergleichbaren Komplexen nahe legen, wird der pK_a -Wert von His57 zu kleineren Werten verschoben, so dass dieser Rest während der Bindung unter den Pufferbedingungen bei pH 7.8 Protonen abgeben könnte.² Betrachtet man die Bindungsgeometrie der Liganden, so fällt auf, dass die Liganden mit einem hydrophoben Rest in der Nähe des His57 binden. Wird eine basische Gruppe in eine zunehmend hydrophobe Umgebung überführt, zeigt sie einen abnehmend basischen Charakter, was mit der beobachteten Protonenabgabe im Einklang stehen würde. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die in der Bilanz fehlenden Protonen vom His57 abgegeben werden. Die Berechnungen zeigen auch, dass His57 in Gegenwart von Ligand **6** weniger stark im pK_a -Wert verschoben wird als in Gegenwart von Ligand **1**. Das gleiche Verhalten wird von den thermodynamischen Messungen widerspiegelt. Der Grund dafür liegt höchstwahrscheinlich im Unterschied der hydrophoben Eigenschaften der beiden Liganden in der Nachbarschaft des His57. Durch den größeren hydrophoben Fünfring im Fall von Ligand **1** wird hier der pK_a -Wert des His57 stärker verschoben als es durch die kleineren und somit weniger hydrophoben Methylgruppen am Stickstoff und am α -C-Atom der Fall ist. Die geringe Gesamtzahl an abgegebenen Protonen zeigt auch, dass dieser Effekt in beiden Fällen gering ist, für Ligand **6** tritt fast keine Protonenabgabe durch das His57 auf.

Viele Enzyme erreichen ihre katalytische Aktivität erst durch präzise Einstellung der pK_a -Werte und der Protonierungszustände der Aminosäureseitenketten, die im katalytischen

Zentrum involviert sind. So wird der katalytische Mechanismus der Peptidspaltung bei Aspartylproteasen erst plausibel, wenn eines der katalytischen Aspartate protoniert ist und sich deshalb im neutralen Zustand befindet.³ Somit ist es nicht weiter verwunderlich, dass ebenfalls eine Protonenabgabe durch das Protein bei der Bindung eines Liganden stattfindet.

4.5 Enthalpische und Entropische Beiträge

Wie schon Eingangs erläutert wurde, sind im unkomplexierten Zustand sowohl die Liganden als auch die Bindetasche des Proteins durch Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen in ihrer Umgebung abgesättigt. Bei der Komplexbildung gehen die enthalpischen Wechselwirkungen zu diesen Wassermolekülen verloren. Sie werden durch direkte Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein ersetzt (vergleiche Abbildung 1.1).⁴ Bei der Beschreibung der Energetik einer Bindungsreaktion sind daher sowohl der Zustand vor der Bindung als auch der Zustand nach der Bindung in Betracht zu ziehen und relativ miteinander zu vergleichen.

Das größte Problem, genaue Werte für die Bindungsenergien von biophysikalischen Assoziationsreaktionen vorherzusagen, liegt darin, dass diese Bindungsenergien aus Energiedifferenzen entstehen, die zwischen dem Zustand, in dem Ligand und Protein getrennt in Lösung vorliegen und mit Wassermolekülen solvatisiert sind und dem Zustand nach der Bindung, wo beide im Komplex miteinander wechselwirken, bestehen. Somit trägt eine aufgrund der Komplexbildung neu ausgebildete Wasserstoffbrücke nur dann konstruktiv zur Bindung bei, wenn die Desolvatisierungsenthalpie der polaren Gruppe durch die Enthalpie der neu gebildeten intermolekularen Wasserstoffbrücken überkompensiert wird. Andererseits kann sich eine polare Gruppe, die vor der Bindungsreaktion vollständig solvatisiert war, als enthalpisch ungünstig für die Bindungsreaktion erweisen, wenn sich im Komplex kein geeigneter Wechselwirkungspartner findet, der die aufgebrauchte Desolvatisierungsenergie kompensieren kann. Dass der Beitrag einer Wasserstoffbrücke entscheidend von der mikroskopischen Umgebung im Protein-Ligand-Komplex abhängt und einen wichtigen Beitrag zum K_i -Wert liefert, konnte bereits an verschiedenen Beispielen gezeigt werden. Ein besonders anschauliches Beispiel ist die Bindung von Thermolysin-Inhibitoren, die eine Phosphonamid-, Phosphonat- oder eine Phosphinatgruppe enthalten, an die Metalloprotease Thermolysin.⁵

Zusätzlich besitzt der Ligand eine Translations- und Rotationsentropie und ist meist konformativ flexibel, so dass er verschiedene Konformationen einnehmen kann. Die

Translations- und Rotationsfreiheitsgrade, die bei der Bindung eingefroren werden, gehen verloren und führen somit zu ungünstigen entropischen Beiträgen zur Freien Bindungsenthalpie ΔG° , d.h. die Entropie nimmt ab und ist deshalb negativ (vergleiche Abbildung 1.1).⁴ Auch das Protein kann während der Bindung in einem definierter Teil seiner Struktur die Konformation verändern und dadurch in sich fester gefaltet werden, was zu einer Verschiebung von Vibrationsfreiheitsgraden zu höheren Frequenzen führt, die dann durch ihre geringere energetische Anregung weniger zum Entropiegehalt des Systems beitragen. Die Reduzierung der Energieverteilung über interne Freiheitsgrade ist somit ein entropisch ungünstiger Beitrag zur Bindung. Andererseits kann eine Region des Biomoleküls nach der eigentlichen Bindungsreaktion auch flexibler werden. Das wiederum führt zu einem positiven ΔS° -Wert und begünstigt deshalb entropisch die Bindungsreaktion.⁴

Aber nicht nur die Wasserstoffbrücken leisten einen Beitrag zur gemessenen Enthalpie, sondern auch das Wasser selbst trägt dazu bei. Wassermoleküle organisieren sich in einer geordneten Struktur an der hydrophoben Oberfläche von Proteinen. Es wird angenommen, dass diese geordneten Wassermoleküle untereinander stärkere Wasserstoffbrücken ausbilden, als sie in hochgradig ungeordneten Wasserstrukturen gefunden wurden. Somit trägt bei der Assoziation zweier Moleküle dieses Freisetzen von Wassermolekülen zur Freien Enthalpie des gesamten Prozesses bei, da das Wasserstoffbrückennetzwerk neu geordnet werden muss. Zuletzt dürfen auch die Oberflächenanteile, die bei einer Bindung vergraben werden und dadurch zu einer Umverteilung von an der Oberfläche fixierten Wassermolekülen und freien Wassermolekülen führen, nicht vernachlässigt werden. Bei den meisten Bindungsreaktionen ist es diese Änderung der Solvenswechselwirkungen, die den entropischen Term dominiert. Wenn Wasser während der eigentlichen Bindung freigesetzt wird, das vorher mit hydrophoben Oberflächen wechselwirkte, kann außerdem eine günstige Entropieänderung für diese Reaktion beobachtet werden. Dieses gilt vor allem auch für solche Wassermoleküle, die vor der Ligandenbindung die Bindetasche des Proteins ausfüllen.⁶

Wie oben beschrieben, treten bei der Ligandenbindung überlagerte Deprotonierungsschritte auf. Nachdem für diese Effekte korrigiert wurde, ist für die Liganden, für die sich aus dem einstufigen sigmoidalen Verlauf der Titrationskurven annehmen lässt, dass beide Enantiomere ähnlich affin binden (alle Liganden gegen Trypsin, Ligand **5** gegen Thrombin) bzw. ein Stereoisomer deutlich besser bindet (**1** gegen Thrombin), eine Faktorisierung in enthalpischen und entropischen Bindungsbeiträgen vorgenommen worden. Der Korrektur der Deprotonierungsschritte liegt die Annahmen zugrunde, dass für beide Enantiomere ein vergleichbarer Betrag angenommen werden kann. Dies gilt sicher für die Liganden selbst, die

Deprotonierung von His57 kann aufgrund einer unterschiedlichen Bindungsgeometrie der Enantiomere verschieden stark ausfallen.

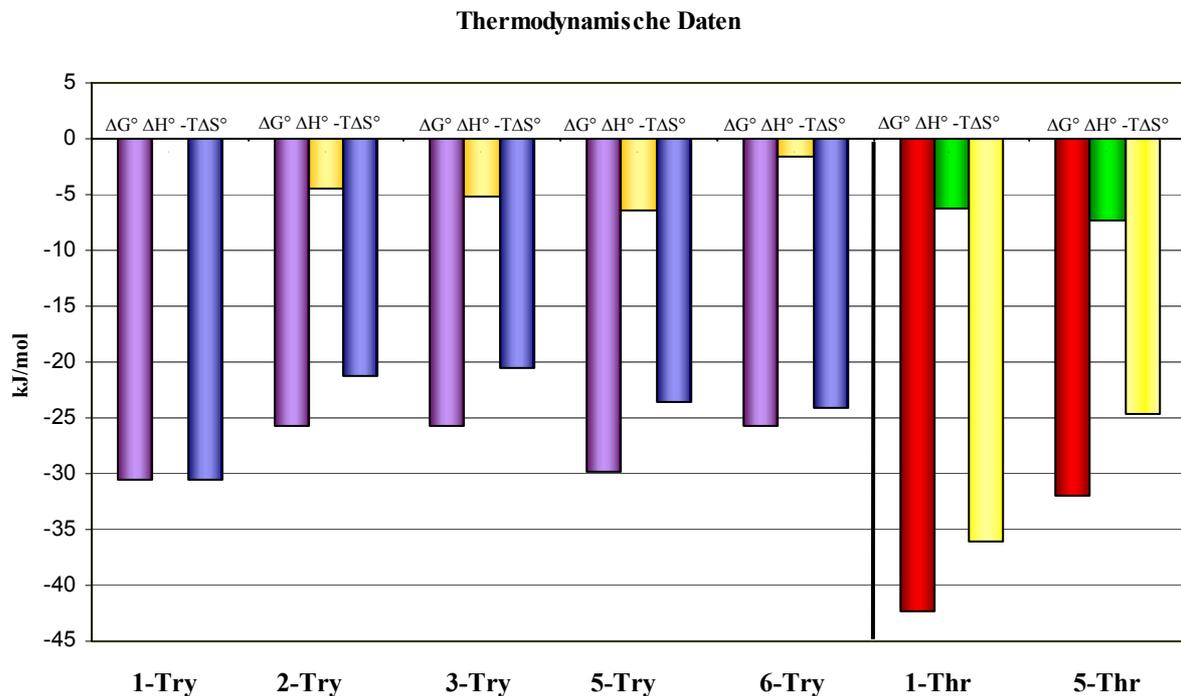


Abbildung 4.3 Grafische Darstellung der thermodynamischen Daten. Links sind die Daten für die Bindung an Trypsin angegeben (ΔG° in lila, $\Delta H^\circ_{\text{bind}}$ in orange und $-T\Delta S^\circ$ in blau) und rechts für die Bindung an Thrombin (ΔG° in rot, $\Delta H^\circ_{\text{bind}}$ in grün und $-T\Delta S^\circ$ in gelb).

Alle Liganden zeigen ein recht ähnliches Verhalten. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Liganden ist der enthalpische Beitrag wesentlich niedriger als der entropische. Für die Bindung von Ligand **1** gegenüber Trypsin fällt auf, dass die Enthalpie nahezu gleich null ist und somit der entropische Beitrag die Bindung vollständig bestimmt. Für den gleichen Liganden ist der enthalpische Beitrag zur Bindung gegenüber Thrombin exothermer. Da ein wesentlicher Unterschied bei der Bindung der Liganden an Thrombin im Vergleich mit der Bindung an Trypsin die Fixierung der Piperonylgruppe darstellt, scheint es, als sei die Mobilität dieser Gruppe entropisch günstig und dafür enthalpisch etwas ungünstiger (vergleiche **1** gegen Trypsin und gegen Thrombin).

In allen Fällen wird die Bindung durch einen hohen günstigen entropischen Bindungsbeitrag bestimmt, der enthalpische Beitrag ist eher gering. Dies wird durch die optimierte Passform der insgesamt sehr starren Liganden verständlich. Die höhere Affinität gegen Thrombin resultiert aus einem noch günstigeren entropischen Beitrag, der enthalpische Anteil ist vergleichbar wie im Falle der Trypsinbindung. Dies unterstreicht um so mehr die aus

entropischen Gründen optimierte Komplementarität der Gestalt der vorliegenden sehr starren Liganden.³

4.6 Bestimmung der Wärmekapazität

Die Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter gibt eine detailliertere Einsicht in den Bindungsprozess. So haben direkte thermodynamische Messungen bereits gezeigt, dass die meisten Bindungsprozesse, an denen Enzyme beteiligt sind, mit negativen Wärmekapazitätsänderung einhergehen. Argumente, die auf den thermodynamischen Daten für den Transfer von verschiedenen Verbindungen von einer apolaren Phase in Wasser basieren^{7; 8; 9}, sowie auf Daten der Proteinfaltung^{8; 9; 10; 11} und der Bindung von diversen Liganden in die entsprechenden Proteine^{10; 12; 13}, schlagen vor, dass der hauptsächlichste Beitrag zu einer negativen Wärmekapazitätsänderung vom Anteil der durch Wasser vergrabenen apolaren Oberfläche abhängt. Im Gegensatz dazu führt das Entfernen von polarer Oberfläche aus der wässrigen Phase zu einer Erhöhung von ΔC_p . Obwohl der Ursprung des hydrophoben Effekts immer noch heftig diskutiert wird, ist eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen, dass durch die Bindung der Zugang vom umgebenden Wasser zu den polaren und apolaren funktionellen Gruppen verändert wird. Dieser Vorgang geht einher mit der Freisetzung von Wassermolekülen und der Reorganisation der Solvatationshülle.^{14; 15} Es wurde vorgeschlagen, dass dabei eine Änderung von zwei verschiedenen Arten von Wasserstoffbrücken stattfindet, wobei es sich einerseits um kürzere und eher lineare Wasserstoffbrücken handelt und andererseits um längere, die eher gewinkelt sind. Die erste Art wird im Falle von apolaren funktionellen Gruppen bevorzugt, die andere im Falle von polaren funktionellen Gruppen, was den gegenteiligen Effekt von polaren und apolaren Oberflächen auf ΔC_p erklären kann.

Ein erstes allgemeines Verständnis dieser energetischen Kräfte entwickelt sich aus der Beziehung zwischen der Wärmekapazitätsänderung ΔC_p und dem vergrabenen Anteil der Oberflächen der wechselwirkenden Moleküle. Der Beitrag des hydrophoben Oberflächenanteils hat dabei einen größeren Einfluss als der polare Oberflächenanteil, der aufgrund einer Faltungsreaktion oder einer Assoziationsreaktion zwischen zwei Spezies vergraben und so vom umgebenden Wasser entfernt wird. Zahlreiche Gruppen haben Algorithmen entwickelt, um aus der gemessenen Wärmekapazitätsänderung auf die beim Bindungsprozess vergrabene Oberfläche zu schließen.

In diesem Zusammenhang wurde eine Beziehung für ΔC_p (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) etabliert, die darauf beruht, dass die Wärmekapazitätsänderungen sowohl für den Transfer von Kohlenwasserstoffen oder Amiden aus Wasser in deren reine flüssige Phase als auch für die Proteinfaltung von den Veränderungen der lösungsmittelzugänglichen apolaren (ΔA_{ap}) und polaren (ΔA_p) Oberflächenanteile (in Å^2) abhängig sind¹³:

$$\Delta C_p = (1.34 \pm 0.17) \Delta A_{ap} - (0.59 \pm 0.17) \Delta A_p \quad \text{(Gleichung 4.1)}$$

Für die Entfaltung einer Reihe von Proteinen, für die Wärmekapazitätsänderungen gemessen wurden und deren Strukturen kristallographisch aufgeklärt wurden, konnte eine lineare empirische Beziehung zwischen ΔC_p (in $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) und den vergrabenen lösungsmittelzugänglichen Oberflächen formuliert werden¹⁶:

$$\Delta C_p = 1.88 \Delta A_{ap} - 1.09 \Delta A_p \quad \text{(Gleichung 4.2)}$$

Es gibt zahlreiche thermodynamische Bindungsstudien, die weitere Hinweise für die Korrelation zwischen ΔC_p und vergrabener Oberfläche liefern und den beschriebenen Wert für die Freisetzung von Kohlenwasserstoffen aus Wasser in die Reinphase bestätigen^{13; 17; 18} sowie ähnliche Werte für die Hydratationswärmekapazitäten der aromatischen und aliphatischen Anteile von Aminosäure beobachteten.¹⁹ Aus diesen Studien ergibt sich auch der folgende Wert für die flächennormierte Wärmekapazitätsänderung, die aus den vergrabenen unpolaren Oberflächen berechnet werden kann, und beträgt in diesem Falle $-1.67 \pm 0.08 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$.¹⁷

Es wird vermutet, dass die negative Wärmekapazitätsänderung für den Bindungsprozess quantitativ mit der Änderung der lösungsmittelzugänglichen unpolaren und polaren Oberfläche korreliert ist.¹⁹

Weitere Effekte wie Veränderungen der Vibrationsmodi oder andere Phänomene scheinen von untergeordneter Bedeutung für ΔC_p zu sein.

Andere Untersuchungen wiederum hegen Zweifel an der Tatsache, dass die einfache Korrelation zwischen der Wärmekapazitätsänderung und der Änderung der hydrophoben Oberfläche allgemeingültig ist.^{20; 21; 22}

Für die Bindungsstudien der Liganden **1**, **2**, **3** und **5** an Trypsin kann eine einfache lineare Korrelation zwischen ΔC_p und der hydrophoben Oberfläche, die aufgrund des

Bindungsprozesses vergraben wird, beobachtet werden (Abbildung 4.4). Wird die oben beschriebene Beziehung für die flächennormierte Wärmekapazitätsänderung auf die Trypsin-Inhibitoren **1**, **2** und **3** angewendet, so würden sich für die Trypsinbindung von **1**, **2** und **3** anhand der aus den Kristallstrukturen berechneten Oberflächenanteilen (ca. 281 Å² bis 299 Å², siehe Tabelle 3.20) eine Wärmekapazitätsänderungen ΔC_p zwischen -0.47 und -0.52 kJ·mol⁻¹·K⁻¹ ergeben. Tatsächlich wird im Experiment ein dem Betrag nach kleinerer Wert (weniger negativ) gefunden. Das heißt, dass für einige Liganden die gemessenen Wärmekapazitäten von 0.07 bis -0.16 kJ·mol⁻¹·K⁻¹ (Tabelle 3.20) nicht allein durch das Vergraben hydrophober Oberflächen erklärt werden können, die Werte sogar durch diese Berechnungen unterschätzt werden. Bei Ligand **5** stimmt der berechnete Wert von -0.42 kJ·mol⁻¹·K⁻¹ jedoch über 70 % mit dem gemessenen von -0.54 kJ·mol⁻¹·K⁻¹ überein. Allerdings muss angemerkt werden, dass die der Betrachtung zugrundeliegenden Oberflächenanteile für **5** aus einer simulierten Rechnung stammen, die Werte für **1**, **2** und **3** aus Kristallstrukturen entnommen wurden.

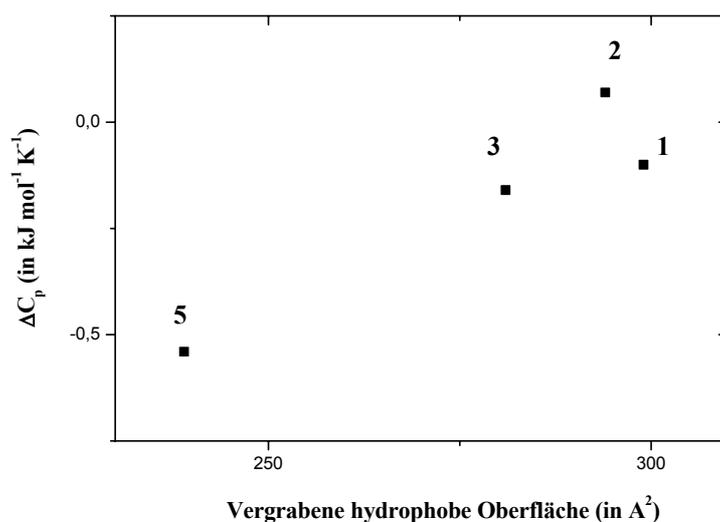


Abbildung 4.4 Wärmekapazitätsänderung ΔC_p in Abhängigkeit von der vergrabenen hydrophoben Oberfläche (in Å²) für die Bindung gegenüber Trypsin.

Für die Thrombinbindungsstudien in Bezug auf die Bindung von Ligand **5** ergibt sich bei einer vergrabenen hydrophoben Oberfläche von 446 Å² (Tabelle 3.20) eine Wärmekapazitätsänderungen von -0.78 kJ·mol⁻¹·K⁻¹. Somit verbleibt ein großer Differenzbetrag zu dem gemessenen Wert von -2.11 kJ·mol⁻¹·K⁻¹ und nur 37 % der Wärmekapazitätsänderung kann durch das Vergraben hydrophober Oberflächen erklärt werden. Die Wärmekapazitätsänderungen sind hier somit deutlich stärker negativ als durch die Oberflächenbetrachtungen vorausgesagt.

Bei Einbeziehung der vergrabenen polaren Oberfläche nach den Gleichungen 4.1 und 4.2 würden sich noch größere Differenzen zu den berechneten Werten als die oben betrachteten ergeben.

Es stellt sich natürlich die Frage, was der Grund für die Diskrepanzen zwischen den berechneten und gemessenen Wärmekapazitätsänderungen bei der Thrombin- und Trypsinbindung sein kann. Scheinbar kann ein so einfaches Konzept, die Wärmekapazitätsänderungen durch eine simple lineare Korrelationen für eine Substanzklasse beschreiben zu wollen, nicht ohne weiteres auf andere Substanzklassen übertragen werden. Entsprechendes gilt für unterschiedliche molekulare Vorgänge wie zum Beispiel die Proteinfaltung bzw. die Bindung von niedermolekularen oder von hochmolekularen Inhibitoren an Enzyme.

Ein grober quantitativer Trend scheint für die Bindung von **5** an Trypsin gegeben zu sein, was allerdings für diesen einzelnen Datenpunkt auch ein zufälliges Ergebnis darstellen könnte. Offensichtlich sind für die anderen Liganden **1**, **2** und **3** zusätzliche Beiträge zu berücksichtigen, die die Wärmekapazitätsänderung hier weniger stark negativ ausfallen lassen als sich aus der Rechnung ergibt. Im Falle des Thrombin-Komplexes mit **5** gilt das Umgekehrte, hier fällt die Wärmekapazitätsänderung stärker negativ aus als berechnet. Sehr wahrscheinlich ist die alleinige Betrachtung von Oberflächenbeiträgen viel zu einfach, Effekte wie die Freisetzung oder Fixierung von Wassermolekülen, die Absorption oder Anregung von niederfrequenten Translations- und Vibrationszuständen¹⁰ oder die unterschiedliche Immobilisierung von konformativen Freiheitsgraden der Liganden spielen eine wichtige Rolle.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die betrachteten Bindungsreaktionen in wässriger Lösung stattfinden. Eine Erhöhung der Temperatur hat auch Konsequenzen für die ordnenden Parameter des umgebenden Wassers und die konformativen Zustände der beteiligten Moleküle. Die angesprochenen Eigenschaften tragen alle zu den entropischen Anteilen an der Bindungsreaktion bei, d.h. dass sie mit einem Verlust oder Gewinn an Entropie einhergehen.

Bei Thrombin sollte nicht vergessen werden, dass in früheren Studien⁶ ein Abhängigkeit der Bindungsenthalpie und somit auch der Wärmekapazitätsänderung von der Art der zugesetzten Kationen besteht. Dieser Effekt geht vermutlich darauf zurück, dass ein Austausch von Natriumionen gegen andere Alkaliionen zu einer Veränderung des Wassernetzwerkes führt. Die Messungen in dieser Arbeit wurden jeweils in Gegenwart von Natriumionen gemessen und können somit wiederum nur mit Werten verglichen werden, die unter den gleichen Bedingungen erhalten wurden. Daraus resultiert aber auch, dass die Änderung der

Wärmekapazität nicht einfach nur durch die Vergrabenheit der Oberfläche erklärt werden kann.

4.7 Vergleich verschiedener Thrombin-Inhibitoren

Wegen der Beziehung der Freien Enthalpie, die in Gleichung 3.16 beschrieben wird, sollte ein flexibler Ligand wegen seiner höheren Zahl an konformativen Freiheitsgraden einen entropisch ungünstigeren Beitrag zur Freie Enthalpie besitzen als ein starrer Ligand. Da die Freie Enthalpie mit der Affinität durch die Beziehung in Gleichung 3.15 verknüpft ist, folgt daraus, dass ein starrer Ligand einen entropischen Vorteil bei der Bindung erzielen sollte im Vergleich mit einem flexibleren Liganden. Dies gilt so aber nur, wenn alle anderen Beiträge zur Bindung für diese Liganden gleich wären.²³ Trotzdem soll hier ein Vergleich der Liganden mit unterschiedlicher Flexibilität in Hinblick auf ihren entopischen Bindungsbeitrag durchgeführt werden.

Die sehr starren Liganden aus dieser Arbeit sollen an dieser Stelle mit flexibleren Liganden verglichen werden, deren thermodynamischen Daten schon in einer früheren Arbeit bestimmt wurden.⁶ Sehr flexible Liganden sind zum Beispiel der für die Testmessungen verwendete Inhibitor CRC220 (**25**) und Napsagatran, das im Gegensatz zu NapEt (**29**) eine Säuregruppe anstatt des Ethylesters besitzt. Außer diesen sehr flexiblen Liganden wurden von Frank Dullweber auch noch die thermodynamischen Daten für eine Ligandenserie mit *N*-(2-Naphthylsulfonyl)-*S*-3-amidinophenylalaninstruktur **33a** - **33dAc**, die an ihrem C-terminalen Ende durch verschiedene Sechsringsysteme substituiert sind und eine etwas geringere, mäßige Flexibilität aufweisen und somit lange nicht so starr wie die Liganden **1** - **7** sind.

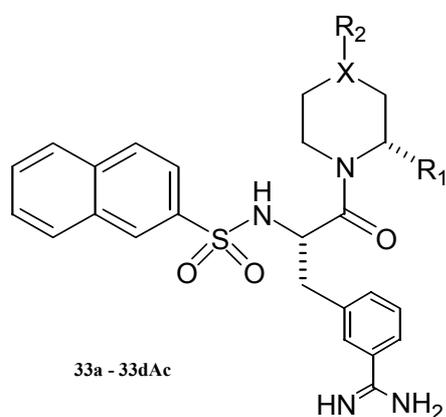


Abbildung 4.5 Die Ligandenserie **33a** - **33dAc** mit *N*-(2-Naphthylsulfonyl)-*S*-3-amidinophenylalaninstruktur.

Der Rest R₁ kann entweder für ein Proton oder eine Carbonsäuregruppe bzw. deren Methylester stehen, der Rest R₂ kann zusätzlich noch eine Methyl- oder Acetylgruppe repräsentieren. Das X steht in **33a** - **33cMe** für ein Kohlenstoffatom, bei **33d** und **33dAc** handelt es sich jeweils um ein Stickstoffatom.

Tabelle 4.1 Vergleich der thermodynamischen Daten von Liganden mit unterschiedlicher Flexibilität für die Bindung gegenüber Trypsin.

Ligand	Enzym	K _A (10 ⁶ M ⁻¹)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	ΔH° _{bind} (kJ·mol ⁻¹)	-TΔS° (kJ·mol ⁻¹)	ΔC _p (kJmol ⁻¹ K ⁻¹)
1	Trypsin	0.17	-30.5	0.03	-30.5	-0.10
2	Trypsin	0.03	-25.7	-4.5	-21.2	0.07
3	Trypsin	0.03	-25.7	-5.23	-20.5	-0.16
5	Trypsin	0.23	-29.9	-6.45	-23.5	-0.54
33dAc	Trypsin	30.3	-42.7	-34.5	-8.2	-2.56
Napsagatran	Trypsin	0.4	-32.0	-2.2*	-29.8*	-0.91
CRC220	Trypsin	5.22	-38.3	-27.7	-10.6	-1.20

* Andre Faktorisierung als bei Frank Dullweber.

In Tabelle 4.1 ist sehr schön zu sehen, dass der entropische Beitrag wesentlich geringer für die Bindung eines flexibleren Liganden ausfällt als für einen der starren Liganden. In der Reihe bindet der mittelmäßig flexible Ligand (**33dAc**) am besten an Trypsin. Dies wird durch einen hohen enthalpischen Beitrag verursacht. Der entropische Beitrag ist aber dem Beitrag nach deutlich geringer als bei **1**, **2**, **3** und **5**. Auch der hochflexible Ligand CRC220 weist niedrigere entropische Beiträge auf. Weiterhin stellt Napsagatran einen hochflexiblen Liganden dar. Während der Bindung dieses Inhibitors an Trypsin werden 0.93 ± 0.12 Protonen aufgenommen, die vermutlich auf das His57 übertragen werden. Im Vergleich zu der Arbeit von Dullweber wurden in Tabelle 4.1 eine Faktorisierung von ΔH° und -TΔS vorgenommen, die von einem vollen Übertrag des Protons auf das His und nicht die Carboxylatgruppe des Liganden ausgeht. Entsprechend wurde für die Ionisierungsenergie korrigiert. Mit dieser Aufspaltung fällt dieser Ligand bei der Bindung an Trypsin aus der Reihe heraus, obwohl er für die Bindung an Thrombin relativ gut in die Reihe passt. Da die Übertragung des Protons nicht sicher geklärt ist, soll Napsagatran nicht weiter in der Diskussion berücksichtigt werden. Bei einem Vergleich der Wärmekapazität scheint für Trypsin eine deutlich größere Varianz auftreten als für Thrombin. Es stellt sich die Frage, ob

dies mit der deutlich stärkeren Exposition des Liganden bei der Trypsinbindung zum umgebenden Lösungsmittel im Zusammenhang steht, die eine geringere Vergrabung der Liganden zulässt und eine deutliche Restmobilität ermöglicht.

Tabelle 4.2 Vergleich der thermodynamischen Daten von Liganden mit unterschiedlicher Flexibilität für die Bindung gegenüber Thrombin.

Ligand	Enzym	K_A (10^6 M^{-1})	ΔG° ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta H^\circ_{\text{bind}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$-T\Delta S^\circ$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔC_p ($\text{kJmol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
5	Thrombin	0.47	-31.9	-7.3	-24.6	-2.11
33dAc	Thrombin	83.3	-45.2	-16.0	-29.2	-2.24
Napsagatran	Thrombin	1428.6	-52.2	-43.6*	-8.4*	-2.31
CRC220	Thrombin	434.8	-49.2	-48.5	-0.7	-2.77

* Andre Faktorisierung als bei Frank Dullweber.

In Tabelle 4.2 ist der Unterschied des entropischen Beitrags für den starren Liganden **5** und **33dAc** nicht sehr groß, dafür zeigen die beiden anderen, sehr flexiblen Liganden einen wesentlich ungünstigeren entropischen Beitrag. Interessant ist für die Bindung der Liganden gegenüber Thrombin, dass für alle die Wärmekapazitäten sehr ähnlich sind, obwohl die Bindungskonstanten extrem große Unterschiede aufweisen.

4.8 Cross-Docking

Die Ergebnisse des Cross-Docking geben die experimentell ermittelte Selektivität relativ gut wieder. Sowohl bei der Verwendung von AutoDock als auch von DrugScore lässt sich eine korrekte Aussage treffen, welche der Liganden eine höhere Selektivität bei der Bindung an Thrombin als an Trypsin zeigen und welche keinen Selektivitätsunterschied aufweisen. Für die Optimierung mit DrugScore spiegeln die Werte für den Selektivitätsvergleich die experimentellen Werte sogar noch etwas besser wider (vergleiche Tabelle 3.22). Es ist zu berücksichtigen, dass der Ansatz bei den verwendeten Einstellungen vor allem lokale Minima findet, offensichtlich mit einer Wahrscheinlichkeit, die mit dem Selektivitätsunterschied zwischen Trypsin und Thrombin korreliert. Somit erscheint das Verfahren für die beabsichtigte Anwendung praktikabel. Es bleibt aber zu bedenken, dass das Programm AutoDock nach einem genetischen Algorithmus optimiert, der bei ausreichend langer

Zykluszeit (die allerdings sehr lange sein kann) stets das globale Optimum finden sollte. Mit einer solchen Einstellung wäre der Ansatz für Selektivitätsbetrachtungen nicht anwendbar.

Generell lassen sich die Energien aus dem Docking unter Verwendung der DrugScore- und der AutoDock-Bewertungsfunktion nicht vergleichen, aber trotzdem geben die Affinitätsabschätzungen der gedockten Geometrien in beiden Fällen den Trend in der Affinität der Liganden gegenüber Thrombin recht gut wieder. Wichtig ist zu beachten, dass die Werte in Klammern, die für die Anzahl der Lösungen, die nicht dem erwarteten Bindungsmodus entsprechen, stehen, nicht direkt mit den Werten für einen korrekten Bindungsmodus verglichen werden können (siehe Tabelle 3.21). Der korrekte Bindungsmodus wurde dabei visuell danach beurteilt, ob der Benzamidinanker in die S_1 -Tasche zeigt und das Fünfringgrundgerüst in der gleichen Orientierung wie in der Kristallstruktur bindet. In den meisten Fällen wird der aus den Kristallstrukturen bekannte Bindungsmodus beim Docking gefunden. Im Falle von Ligand **1** wird dies durch den niedrigen rmsd-Wert von 0.42 Å belegt.

Für das höchst wahrscheinlich schwächer bindende Enantiomer des Liganden **2** werden im Falle von DrugScore keine sinnvollen Lösungen gefunden, im Falle von AutoDock wurde (-)-L2 einige Male mit dem Benzamidinanker in der S_1 -Tasche platziert. Durch die experimentellen Daten war zu erwarten, dass dieses Enantiomer auch beim Docking eine schlechtere Bindung zeigt als das gespiegelte Enantiomer. Dies ist auch deutlich an den im Vergleich zu den anderen Liganden wesentlich niedrigeren Energien zu erkennen. Bei Verwendung von DrugScore werden auch die Liganden **5** und **7** nicht optimal in der Bindetasche von Thrombin platziert. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die beide Gruppen sehr große Reste (Phenyl- und Benzylrest) besitzen, die nicht optimal in der S_2 -Tasche platziert werden können. Außerdem kommt noch hinzu, dass für das Docking eine starre Enzymstruktur angenommen wurde, aber wie besonders die Kristallstrukturen der Inhibitoren RA-1008 und RA-1014 zeigen, weist der 60er-*Loop*, der die S_2 -Tasche nach oben hin begrenzt, eine gewisse Flexibilität auf. Ein weiterer Grund könnte darin bestehen, dass für alle Liganden das gleiche Standardprotokoll verwendet wurde. Es besteht somit die Möglichkeit, dass nach 50 Läufen noch nicht das optimale Minimum für die Liganden gefunden wurde. Für den Ligand **5** zeigte ein Docking mit der doppelten Anzahl an unabhängigen Läufen jedoch die gleichen Ergebnisse wie das Docking mit dem Standardprotokoll.

4.9 Literatur

1. Bode, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S. R. & Hofsteenge, J. (1989). The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.* 8, 3467-75.
2. Czodrowsky, P. (2005). personal communication.
3. Gomez, J. & Freire, E. (1995). Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin. *J. Mol. Biol.* 252, 337-50.
4. Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H. (1996). *Wirkstoffdesign*, Spektrum-Verlag, Heidelberg.
5. Morgan, B. P., Scholtz, J. M., Ballinger, M. D., Zipkin, I. D. & Bartlett, P. A. (1991). Detailed evaluation of the influence of hydrogen-bonding and hydrophobic groups on the inhibition of thermolysin by phosphorus-containing inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 297-307.
6. Dullweber, F., Stubbs, M. T., Musil, D., Stürzebecher, J. & Klebe, G. (2001). Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. *J. Mol. Biol.* 313, 593-614.
7. Baldwin, R. L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8069-72.
8. Murphy, K. P., Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1990). Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science* 247, 559-61.
9. Spolar, R. S., Livingstone, J. R. & Record, M. T., Jr. (1992). Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* 31, 3947-55.
10. Sturtevant, J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2236-40.
11. Spolar, R. S., Ha, J. H. & Record, M. T., Jr. (1989). Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8382-5.
12. Ha, J. H., Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. (1989). Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *J. Mol. Biol.* 209, 801-16.

13. Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* 263, 777-84.
14. Lee, B. (1994). Enthalpy-entropy compensation in the thermodynamics of hydrophobicity. *Biophys. Chem.* 51, 271-7; discussion 277-8.
15. Southall, N. T. & Dill, K. A. (2002). Potential of mean force between two hydrophobic solutes in water. *Biophys. Chem.* 101-102, 295-307.
16. Murphy, K. P. & Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* 43, 313-61.
17. Connelly, P. R. & Thomson, J. A. (1992). Heat capacity changes and hydrophobic interactions in the binding of FK506 and rapamycin to the FK506 binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4781-5.
18. Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1988). Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Protein Chem.* 39, 191-234.
19. Privalov, P. L. & Makhatadze, G. I. (1990). Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects. *J. Mol. Biol.* 213, 385-91.
20. Connelly, P. R., Varadarajan, R., Sturtevant, J. M. & Richards, F. M. (1990). Thermodynamics of protein-peptide interactions in the ribonuclease S system studied by titration calorimetry. *Biochemistry* 29, 6108-14.
21. Ladbury, J. E. & Chowdhry, B. Z. (1996). Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem. Biol.* 3, 791-801.
22. Varadarajan, R., Connelly, P. R., Sturtevant, J. M. & Richards, F. M. (1992). Heat capacity changes for protein-peptide interactions in the ribonuclease S system. *Biochemistry* 31, 1421-6.
23. Homans, S. W. (2004). NMR spectroscopy tools for structure-aided drug design. *Angew. Chem.* 116, 292-303.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Genauere Kenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind essentiell für das Design neuer Leitstrukturen und deren Optimierung. Mittlerweile wird vielfach versucht, eine Leitstruktur unter zu Hilfenahme der Kristallstruktur des Zielproteins, das gehemmt werden soll, zu finden und zu verbessern. Dabei wird häufig vergessen, dass die Affinität nicht allein auf strukturellen Aspekten beruht, sondern eine komplexe Kombination aus Struktur und Dynamik und eine Wechselwirkungsbilanz zwischen Solvenz und Protein ist. Die einfachste Methode, um einen Überblick über alle thermodynamischen Daten zu bekommen, stellt die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) dar. ITC ist die einzige Methode, mit der die Enthalpie, die Entropie, die Freie Energie und die Bindungskonstante mit einem Experiment bestimmt werden können, wobei die Entropie als Differenz berechnet wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Liganden für genauere strukturelle und thermodynamische Studien in Bezug auf ihre Bindung sowohl gegenüber Thrombin als auch gegenüber Trypsin ausgewählt.

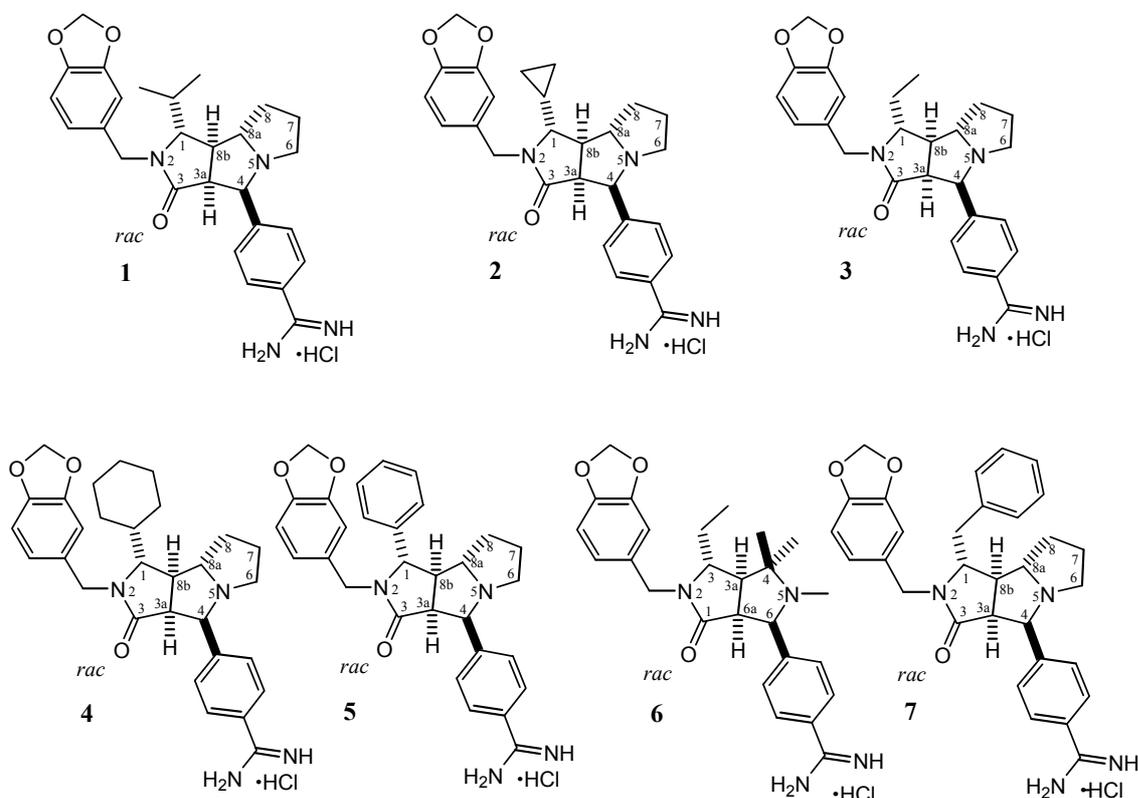


Abbildung 5.1 Die für diese Studie ausgewählten Thrombin-Inhibitoren.

Von den ausgewählten Liganden konnten sechs Strukturen kristallographisch im Komplex mit Trypsin und drei Strukturen im Komplex mit Thrombin gelöst werden. Zusätzlich wurden die Strukturen von drei weiteren Thrombin-Inhibitor-Komplexen bestimmt.

Anhand der Kristallstrukturen der Liganden **1** bis **7** lässt sich abschätzen, dass jeweils eines der Enantiomere auf jeden Fall etwas besser bindet als das andere, da in allen Strukturen nur das (+)-Enantiomer in die Elektronendichte eingebaut werden konnte, obwohl immer das Racemat für die Kristallisation verwendet wurde. Scheinbar reicht schon der vermutlich in einigen Beispielen gegebene geringere Affinitätsunterschied aus, damit nur das stärker bindende Enantiomere in der Kristallstruktur zu erkennen ist.

Die Überlagerung der Liganden **1** - **7** im Komplex mit Trypsin zeigt bei den Liganden keine Unterschiede bei der Bindung im Bereich des starren Grundgerüsts, es sind aber deutliche Abweichungen bei der Piperonylgruppe zu verzeichnen. Die Liganden unterscheiden sich in erster Linie nur in Bezug auf den Alkyl- bzw. Arylsubstituenten, der in die S₂-Tasche zeigt. Hierin begründen sich auch die sehr ähnlichen Affinitäten gegenüber Trypsin. Die S₂-Tasche ist bei Trypsin nach oben hin nicht begrenzt und somit scheint es von untergeordneter Bedeutung zu sein, welche Substituenten die Liganden in dieser Position tragen. Für **1** ist bekannt, dass sich beide Enantiomere bei der Bindung gegenüber Trypsin nur um den Faktor 22 in ihrer Affinität unterscheiden. Das lässt sich ebenfalls mit der nach oben offenen Bindetasche erklären.

Ebenso kann davon ausgegangen werden, dass auch für die anderen Liganden der Affinitätsunterschied zwischen beiden Enantiomeren im gleichen Bereich liegt wie bei Ligand **1**. Die Titrationskurven deuten ein solches Verhalten an.

Die Überlagerung der drei Liganden im Komplex mit Thrombin zeigt noch geringere Unterschiede in deren Orientierung. Ein Grund dafür ist eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe des Tyr60A und der Piperonylgruppe, die dadurch in einer Bindungskonformation fixiert wird abweichend von der Situation im Trypsin.

Bei Thrombin spielt die Größe der Alkyl- bzw. Arylgruppe eine entscheidende Rolle für die erzielte Bindungsaffinität. Im Gegensatz zu Trypsin ist der zugängliche Raum der S₂-Tasche bei Thrombin durch den 60er-Loop begrenzt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die sterische Hinderung durch den Tyr60A-Trp60D-Teil des 60er-Loops einer der Gründe für die enge Substratspezifität von Thrombin ist. Somit wirkt sich eine zu große Gruppe in dieser Position negativ auf die Affinität aus. Entsprechend fallen die Affinitäten für die Liganden **4**, **5** und **7** gegenüber Thrombin im Vergleich zu den Liganden **1**, **2** und **3** deutlich ab. Der 60er-Loop und die somit begrenzte S₂-Tasche ist auch der Grund für den großen

Affinitätsunterschied zwischen den Enantiomeren des Liganden **1**. Die extrem hohe Selektivität dieses Liganden gegenüber Thrombin kann dadurch erklärt werden, dass das besser bindende Enantiomer mit seiner Isopropylgruppe absolut optimal in die S_2 -Tasche von Thrombin passt. Dadurch erzielt das (+)-**1** Enantiomer eine Affinität von 7 nM, wohingegen das andere Stereoisomer mit 5600 nM noch schlechter als die Derivate **4**, **5** und **7** bindet. Letztere Werte beziehen sich auf die Racemate, doch legen die Titrationskurven nahe, dass beide Enantiomere dieser drei Liganden mit sehr ähnlicher Affinität an Thrombin binden (Differenz um einen Faktor von 10 - 20).

Die Liganden wurden jeweils als Racemat eingesetzt. Es zeigte sich, dass es mit der ITC möglich ist, Aussagen darüber zu treffen, ob die Enantiomere etwa gleich gut an ein Enzym binden oder ob die beiden Enantiomere sich um einen bestimmten Faktor unterscheiden. Weichen die Enantiomere in ihrer Affinität nur gering voneinander ab, so sind bei den Titrationskurven nur leichte Differenzen zum normalen sigmoidalen Kurvenverlauf zu erkennen. Unterscheiden sich die Affinitäten etwas stärker, zum Beispiel mehr als um den Faktor 70 - 200, so werden anstatt der üblichen einstufigen Titrationskurven zweistufige Titrationskurven erhalten. Nach Messungen mit verschiedenen Testsystemen kann davon ausgegangen werden, dass für ein racemisches Gemisch im Falle einer zweistufigen Titrationskurven folgendes Bindungsmodell zugrundegelegt werden kann. Zunächst wird das racemische Gemisch in das Protein titriert. So lange keine stöchiometrische 1:1 Zugabe des Racemats zu dem Protein erreicht ist, findet jedes zugegebene Ligandenmolekül im Prinzip ein unkomplexiertes Proteinmolekül vor. Es stellen sich zwei überlagerte Gleichgewichte ein, wobei die Assoziations- und die Dissoziationsraten von den Affinitäten der beiden Enantiomere zum Protein abhängen. Das höher affine Enantiomer verbleibt im Mittel länger am Enzym als das schwächere und somit schneller austauschende Enantiomer. Die Kurvenform der ersten Titrationskurve wird somit von der gemittelten Assoziations-/Dissoziationskonstante des Racemats bestimmt. Ist ein Enantiomer deutlich schwächer affin als sein Spiegelisomer, bestimmt es im Wesentlichen den Kurvenverlauf, der einen sehr flachen Anstieg zeigt. Nach stöchiometrischer 1:1 Zugabe des Racemats erfolgt nun die schrittweise Verdrängung des schwächer affinen Enantiomers durch das stärker affine Enantiomer bis die Titrationskurve in eine sigmoidale Sättigung hineinläuft, bei der das gesamte vorliegende Protein praktisch von dem stärker affinen Enantiomer gesättigt ist. Ist der Affinitätsunterschied zwischen beiden Enantiomeren nicht zu groß, muss sich der verdrängende Ligand erst in gewissem Grad in der Lösung anreichern, um zu einer messbaren Verdrängung zu führen. Dies drückt sich in einer Abflachung der Titrationskurve aus. Der

Kurvenverlauf des zweiten Teils der sigmoidalen Kurve wird somit von der Bindungskonstanten des stärker affinen Enantiomers geprägt, das das schwächer bindende Enantiomer verdrängt. Dabei ist aber nicht zu vernachlässigen, dass durch die Zugabe des Racemats auch die Konzentration des schwächer bindenden Enantiomers in der Lösung erhöht und das Assoziations-/Dissoziationsgleichgewicht beeinflusst wird. Insgesamt ergibt sich daraus ein sehr komplexes miteinander verwobenes Titrationsgleichgewicht.

Für alle Liganden, deren Enantiomere ähnliche Affinitäten aufwiesen und somit die sigmoidalen Titrationskurven gut auszuwerten waren, konnten sämtliche thermodynamische Daten bestimmt werden. Messungen in verschiedenen Puffern zeigten eine deutliche Pufferabhängigkeit und somit war eine Korrektur der thermodynamischen Daten um überlagerte Protonierungsgleichgewichte nötig. Anhand der pK_a -Werte der Liganden konnte mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ermittelt werden, dass während der Bindung nicht nur Protonen von den Liganden an den Puffer übertragen wurden, sondern dass höchstwahrscheinlich auch His57 Protonen abgegeben hat. Eine Betrachtung der thermodynamischen Daten nach der Korrektur zeigt sehr deutlich, dass in allen Fällen die Bindung durch einen hohen entropischen Bindungsbeitrag bestimmt wird, der enthalpische Beitrag ist eher gering. Dies wird durch die optimierte Passform der insgesamt sehr starren Liganden verständlich. Die höhere Affinität gegen Thrombin resultiert aus einem noch geringeren entropischen Beitrag, der enthalpische Anteil ist nahezu identisch wie im Falle der Trypsinbindung. Dies unterstreicht um so mehr die aus entropischen Gründen optimierte Komplementarität der vorliegenden sehr starren Liganden.

Zusätzlich wurden Dockingstudien mit Hilfe der Programme AutoDock und DrugScore durchgeführt, um mit Hilfe des neuen Cross-Docking genannten Verfahrens Vorhersagen über die Selektivität von Liganden gegenüber verschiedenen Enzymen treffen zu können. Die Ergebnisse des Cross-Docking geben die experimentell ermittelte Selektivität relativ gut wieder. Sowohl bei der Verwendung der Bewertungsfunktion AutoDock als auch von DrugScore lässt sich eine Aussage treffen, welche der Liganden eine höhere Selektivität bei der Bindung an Thrombin als bei der Bindung an Trypsin zeigen und welche keinen Selektivitätsunterschied aufweisen. Für die Optimierung mit DrugScore spiegeln die Werte für den Selektivitätsvergleich die experimentellen Werte sogar noch etwas besser wieder.

5.2 Ausblick

Um die hier aufgeführten Studien noch zusätzlich zu untermauern, ist es wichtig, ausführlichere ITC-Messungen an den Racematen durchzuführen. Dazu werden zum einen weitere Testsysteme (Racemate und gezielt ausgewählte Mischungen unterschiedlich affiner Liganden) benötigt und zum anderen ist es auch wichtig den Kurvenverlauf einer zweistufigen Titrationskurve zu studieren. Eine Möglichkeit besteht zum Beispiel darin, nicht nur 50:50 Gemische zu verwenden, sondern einen ganzen Mischungsbereich zu vermessen. Anhand der so erhaltenen Daten lassen sich genauere Aussagen über die zweite Kurve treffen. Je kleiner der Anteil des schwächer binden Enantiomers ist, desto mehr sollte die zweistufige Titrationskurve in eine normale sigmoidale Titrationskurve übergehen. Als Testsysteme bieten sich vor allem sehr leicht zu trennende Enantiomere an. Ebenso bieten sich Mischungen von Inhibitoren an, deren Affinität sich um den gewünschten Faktor unterscheidet. Es sollte dabei darauf geachtet werden, dass es sich um vergleichbare Liganden handelt. Interessant wäre es mit Sicherheit auch, die Studie vom Verhalten unterschiedlicher Racemate auf andere Enzymklassen auszuweiten.

Wie die Daten der starren Liganden in Vergleich mit flexibleren zeigen, ist ein sehr starres Grundgerüst mit optimierter Passform aus entropischen Gründen sehr günstig. Da die für den Vergleich verwendeten flexiblen Liganden aber trotz allem gleich gut oder sogar wesentlich besser binden als die in dieser Arbeit verwendeten Liganden, wäre es sicherlich interessant, diese flexiblen Liganden hinsichtlich ihres entropischen Beitrags zu optimieren und vielleicht auch noch zu berücksichtigen, dass die Isopropylgruppe des Liganden **1** optimal in die S₂-Tasche passt.

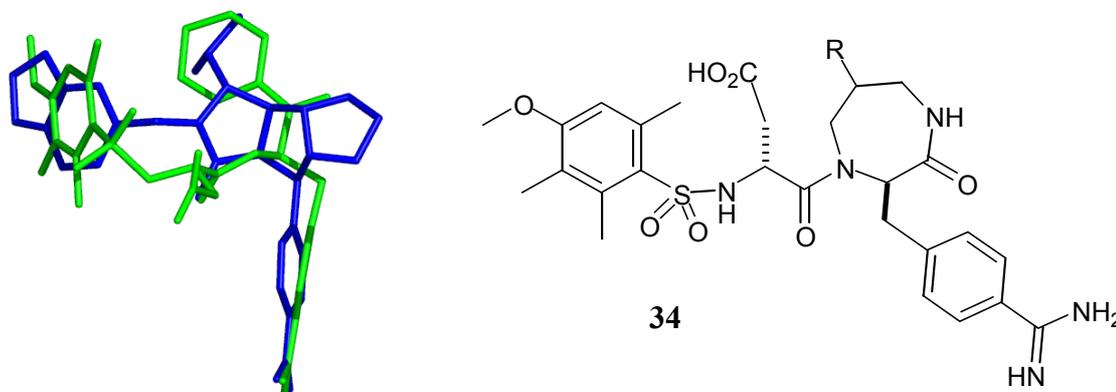


Abbildung 5.2 Links ist die Überlagerung von CRC220 mit dem starren Ligand **1** zu sehen. Rechts ist ein Vorschlag für eine mögliche entropische Optimierung dargestellt, wobei als R verschiedene kleine Alkylreste eingesetzt werden sollten.

Mit Hilfe der Überlagerung des starren Liganden **1** mit CRC220 wurde eine mögliche entropische Optimierung des Liganden vorgeschlagen (siehe Abbildung 5.2). Ein Siebenring ist energetisch ungünstiger als ein Fünf- oder Sechsring, aber eine genaue Betrachtung von CRC220 in der Kristallstruktur zeigt, dass ein kleinerer Ring als der vorgeschlagenen, die Geometrie des Liganden deutlich verändern würde.

Wie andere Studien schon zeigten, scheint die entropische Optimierung von Inhibitoren ein erfolgsversprechender Weg zu sein, um höher affine Inhibitoren zu erhalten, die eine optimale, starre Passform für ein bestimmtes Zielmolekül besitzen. Ein Problem stellt allerdings die meist größere resultierende Struktur des Liganden dar. Zusätzlich können flexiblere Moleküle viel besser auf Mutationen in den Zielmolekülen reagieren als extrem starre Systeme.¹ Somit sollte bei einer entropischen Optimierung darauf geachtet werden, ob häufig Mutationen im Zielmolekül auftreten können, wie zum Beispiel bei der HIV-1 Protease, und daraus im Zusammenhang mit starren Medikamenten Resistenzen entstehen können. Da im Falle des humanem Thrombins Mutationen als eher unwahrscheinlich gelten dürften, muss hierauf bei der Optimierung keine Rücksicht genommen werden.

5.3 Literatur

1. Ohtaka, H., Velazquez-Campoy, A., Xie, D. & Freire, E. (2002). Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: The binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of HIV-1 protease. *Prot. Sci.* 11, 1908-1916.

6 Material und Methoden

6.1 Allgemeine Arbeitsmethoden und Materialien

Chemikalien. Kommerziell erhältlichen Feinchemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Fluka Chemie (Seelze), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Seelze) bezogen. Die Feinchemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe ohne weitere Reinigung verwendet. Das verwendete Säulenmaterial Hitrap Benzamidin FF (high sub) wurde von Amersham Pharmacia Bioscience (Uppsala, Schweden) geliefert. Das Acetyl-Hirudin (54-65) (sulfatiert) stammte von der Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz).

Lösungsmittel. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach literaturbeschriebenen Methoden getrocknet.¹ Das verwendete Wasser wurde nach Entionisierung über einen Ionenaustauscher mit einer Reinstwasseranlage (Purelab TM Plus, ELGA ESF Deutschland GmbH) aufbereitet.

Dünnschichtchromatographie. Es wurden Fertigplatten des Typs Alugram SIL G/UV254 von Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht (254 nm).

Säulenchromatographie. Es wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.063 – 0.02 mm) von Merck verwendet. Die Laufmittelgemische und R_F -Werte sind bei den Versuchsvorschriften angegeben.

Enzyme. Das bovine Rohthrombin wurde freundlicherweise vom Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin der Universität Jena zur Verfügung gestellt. Es stammte ursprünglich von den Arzneimittelwerken Dresden, wo es aus Rinderblut isoliert worden war. Trypsin aus der Rinderpankreas (Typ I ~ 10,000 BAEE unit/mg Protein) wurde bei Sigma-Aldrich (Seelze) bestellt. Für die Kristallisation wurde humanes α -Thrombin von Haemochrom (Essen) verwendet (3174.00 NIH u/mg in folgendem Puffer: 50 mM Natriumcitrat, 0.2 M NaCl, 0.1 % PEG 8000, pH 6.5).

6.2 Analytik

Schmelzpunkte wurden auf Deckgläschen mit einer HM-LUX Schmelzpunktbestimmungsapparatur von Leitz (Wetzlar) gemessen und unkorrigiert angegeben.

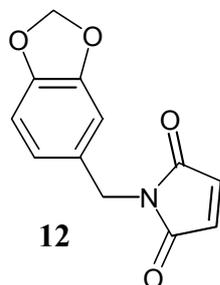
NMR-Spektren (^1H , ^{13}C) wurden von der NMR-Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg bei Raumtemperatur und in den angegebenen Lösungsmitteln auf folgendem Geräten gemessen: DRX 400 und DRX 500 der Firma Joel. Die chemischen Verschiebungen sind in parts per million (ppm) auf der δ -Skala bezüglich Trimethylsilan (0.00 ppm) und die Spinmultiplizität durch *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplet) und *m* (Multipllett) angegeben. Breite Signale werden mit *br* bezeichnet. Die Kopplungskonstanten (*J*) sind in Hertz (Hz) angegeben und in Bezug auf die Kopplungspartner ermittelt. Die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte unter Protonen-Breitband-Entkopplung. Die Zuordnung der ^{13}C -NMR-Signale und deren Multiplizitäten wurden über die 2D-korrelierten ^1H - ^{13}C -COSY- und APT-Spektren gewonnen. Die Nummerierung der Atome in den Abbildungen wurde z.T. willkürlich festgelegt, um eine eindeutige Zuordnung der ^1H -NMR-Signale zu ermöglichen.

Massenspektren (MS und HR-MS) wurden von der MS-Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg auf einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer vom Typ VG 7070 H der Firma Vacuum Generators oder einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer mit EBE-Geometrie vom Typ VG-Autospec der Firma Micromass gemessen. Die Datenaquisition erfolgte mit dem Datensystem „Vector 1“ der Firma Teknivent Corp. Es sind in Klammern die Messmethode und die Messtemperatur angegeben. Als weitere Daten sind die Summenformel, die berechnete Masse und die gemessene Masse angeführt. Angegeben sind die Masse/Ladungsverhältnis-Werte (*m/z*) sowie die relative Intensität in Prozent.

Elementaranalysen wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Marburg mit einem CH-Analyzer nach Dr. Salzer der Firma Labormatic/Wösthoff und mit einem CHN-Autoanalyzer 185 der Firma Hewlett-Packert durchgeführt. Die Werte sind als Prozentzahlen angegeben.

6.3 Synthesevorschriften

1-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl-pyrrol-2,5-dion ²



Zunächst werden 23.6 g (241 mmol) Maleinsäureanhydrid in 800 mL Dichlormethan suspendiert und auf 0°C gekühlt. Danach werden 36.4 g (30.0 mL, 241 mmol) Piperonylamin tropfenweise über eine Periode von 5 min hinzugegeben. Das Eisbad wird entfernt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird anschließend wieder auf 0°C gekühlt und es werden einige Tropfen DMF hinzugefügt. Es folgt eine langsame, vorsichtige Zugabe von 32.0 g (21.6 mL, 253 mmol) Oxalylchlorid über einen Zeitraum von 30 bis 45 min. Nach dem Entfernen des Eisbades wird weitere 8 h gerührt. Nun wird das Lösungsmittel vollständig unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in 300 mL Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 29.2 g (40.6 mL, 289 mmol) Triethylamin wird noch einmal 1 h gerührt. Die organische Phase wird mit 250 mL 1 M HCl gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach der Behandlung mit 7.50 g Aktivkohle wird über Zeolith filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Gereinigt wird durch Filtration über Kieselgel 60 mit *n*-Hexan/Ethylacetat 1:1.

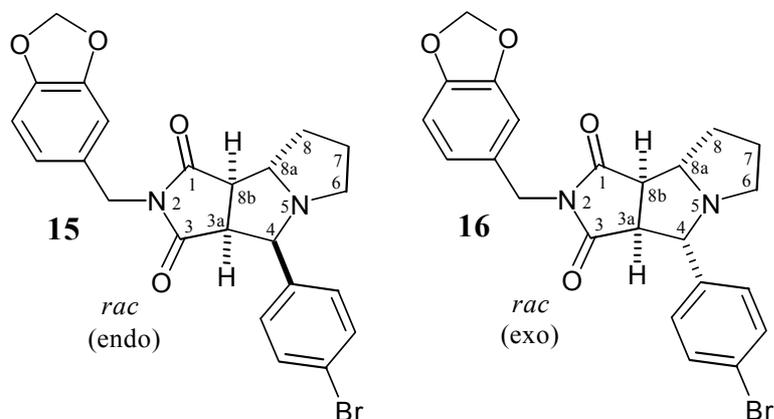
Ausbeute: 28.0 g (121 mol, 50 %). Gelbliche Nadeln.

Smp.: 103°C.

R_F: 0.53 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 4.57 (*s*, 2 H, CH₂-N); 5.92 (*s*, 2 H, OCH₂O); 6.67 - 6.75 (*m*, 3 H, CH Aromat - Piperonylamin); 6.81 - 6.85 (*m*, 2 H, CH Doppelbindung).

(3a*SR*,4*RS*,8a*SR*,8b*RS*)-2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(4bromphenyl)perhydro-pyrrolo[3,4-a]pyrrolizin-1,3-dion²



Eine Suspension aus 23.8 g (103 mmol) 1-Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl-pyrrol-2,5-dion, 12.5 g (108 mmol) L-Prolin und 20.0 g (108 mmol) 4-Brombenzaldehyd in 120 mL Acetonitril wird 18 h unter Rückfluss gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung 16 h bei 4°C stehen gelassen, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird chromatographisch über Kieselgel 60 gereinigt (Dichlormethan).

Ausbeute Endo: 12.1 mg (25.8 mmol, 25 %). Hellgelbe Kristalle. Bei analogen Verbindungen entstehen Endo und Exo etwa im Verhältnis 1:1 bis 1:1.5.

Smp.: 135°C.

R_F: Endo (gewünschtes Produkt) 0.31, Exo 0.15 (Dichlormethan/Ethylacetat 10:1).

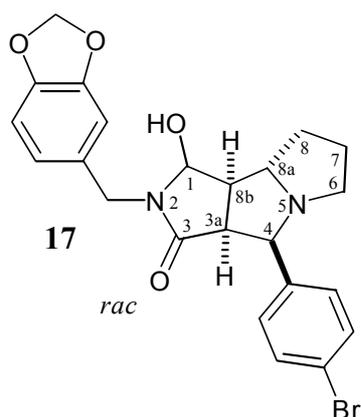
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃):

Endo: 1.60 - 1.80 (*m*, 2 H, **H-C(7)** und **H-C(8)**); 1.97 - 2.15 (*m*, 2 H, **H-C(7)** und **H-C(8)**); 2.60 - 2.65 (*m*, 1 H, **H-C(6)**); 2.80 - 2.86 (*m*, 1 H, **H-C(6)**); 3.25 (*d*, *J* = 8.02 Hz, 1 H, **H-C(8b)**); 3.45 (*dd*, *J* = 8.25 Hz, *J* = 8.48 Hz, 1 H, **H-C(3a)**); 3.73 - 3.76 (*m*, 1 H, **H-C(8a)**); 4.00 (*d*, *J* = 8.71 Hz, 1 H, **H-C(4)**); 4.43 (*s*, 2 H, **CH₂-N**); 5.93 - 5.95 (*m*, 2 H, **OCH₂O**); 6.71 (*d*, *J* = 8.48 Hz, 1 H, **CH Aromat - Piperonylamin**); 6.79 (*d*, *J* = 6.87 Hz, 2 H, **CH Aromat - Piperonylamin**); 7.08, 7.37 (*dd*, *J* = 8.25 Hz, *J* = 8.48 Hz, 4 H, **CH Aromat - BrPhenyl**).

Exo: 1.48 - 1.72 (*m*, 2 H, **H-C(7)** und **H-C(8)**); 1.88 - 1.95 (*m*, 2 H, **H-C(7)** und **H-C(8)**); 2.38 - 2.43 (*m*, 1 H, **H-C(6)**); 2.87 - 2.92 (*m*, 1 H, **H-C(6)**); 3.24 (*dd*, *J* = 9.20 Hz, *J* = 9.20 Hz, 1 H, **H-C(8b)**); 3.48 (*dd*, *J* = 9.00 Hz, *J* = 9.10 Hz, 1 H, **H-C(3a)**); 3.81 - 3.85 (*m*, 1 H, **H-C(8a)**); 4.01 (*d*, *J* = 5.80 Hz, 1 H, **H-C(4)**); 4.51 (*s*, 2 H, **CH₂-N**); 5.90 - 5.92 (*m*, 2 H,

OCH₂O); 6.70 (*d*, *J* = 7.70 Hz, 1 H, CH Aromat - Piperonylamin); 6.85 - 6.88 (*m*, 2 H, CH Aromat - Piperonylamin); 7.32 - 7.33 (*m*, 4 H, CH Aromat - BrPhenyl); 7.42 - 7.45 (*m*, 4 H, CH Aromat - BrPhenyl).

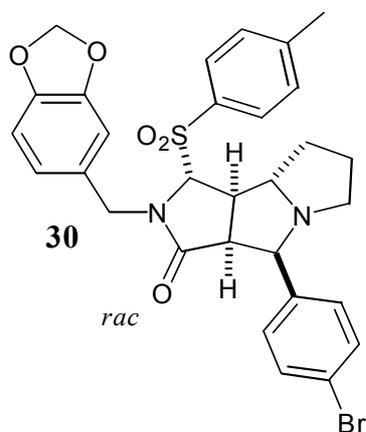
(3a*SR*,4*RS*,8a*SR*,8b*RS*)-2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(4bromphenyl)-1-hydroxy-octahydro-pyrrolo[3,4-a]pyrrolizin-3-on²



Zu einer Lösung von 1.80 g (3.84 mmol) (3a*SR*,4*RS*,8a*SR*,8b*RS*)-2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(4bromphenyl)perhydro-pyrrolo[3,4-a]pyrrolizin-1,3-dion in 10 mL absolutem THF werden bei -78°C unter Argon 7.3 mL (7.30 mmol) einer 1 M Lösung von Lithiumtriethylborhydrid (Superhydrid) in THF zugegeben. Nach 30 min Rühren bei -78°C wird das gelbe Reaktionsgemisch auf 0°C erwärmt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Das Gemisch wird mit Dichlormethan extrahiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Charakterisierung weiterverwendet.

Ausbeute: Quantitativ. Gelbes Öl.

(3aSR,4RS,8aSR,8bRS)-2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-4-(4bromphenyl)-1-[(4-methylphenyl)sulfonyl]perhydro-pyrrolo[3,4-a]pyrrolizin-3-on²



Um aus dem Natrium-*p*-toluolsulfinat die freie 4-Toluolsulfinsäure herzustellen werden 5.35 g (30.0 mmol) des 4-Toluolsulfinats in 45 mL Wasser gelöst und bei 60°C kräftig gerührt. Nach Zugabe von 3.3 mL (33.0 mmol) konzentrierter HCl wird weiter 30 min gerührt und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird filtriert und der weiße Feststoff wird getrocknet.

Das rohe Hydroxylactam wird mit 1.85 g (10.4 mmol) der, wie oben beschrieben dargestellten, 4-Toluolsulfinsäure und 1.15 g (10.4 mmol) wasserfreiem Calciumchlorid in 15 mL trockenem Dichlormethan suspendiert. Dann wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Es werden noch einmal 1.78 g (9.97 mmol) 4-Toluolsulfinsäure und 1.06 g (9.59 mmol) wasserfreies Calciumchlorid zugegeben und weitere 3 d gerührt. Der Rückstand wird chromatographisch über Kieselgel 60 gereinigt (*n*-Hexan/Ethylacetat 2:1).

Ausbeute: 2.50 g (4.1 mmol, 39 %). Weißer Feststoff.

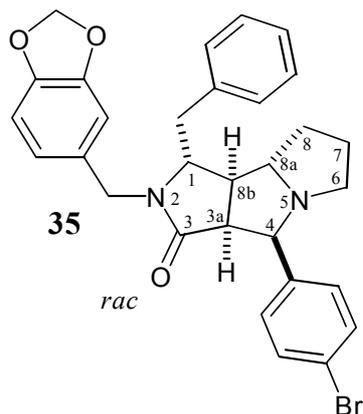
Smp.: 200°C.

R_F: 0.65 (*n*-Hexan/Ethylacetat 2:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.52 - 1.73 (*m*, 2 H, **H-C(7)** und **H-C(8)**); 1.82 - 2.05 (*m*, 2 H, **H-C(7)** und **H-C(8)**); 2.42 - 2.55 (*m*, 2 H); 2.48 (*s*, 3 H, **CH₃-PhenylSO₂**); 2.85 - 2.87 (*m*, 1 H); 2.96 - 3.08 (*m*, 2 H); 3.90 (*d*, *J* = 6.19 Hz, 1 H, **H-C(4)**); 3.98, 5.03 (*d*, *J* = 14.66 Hz, *J* = 14.89 Hz, 2 H, **CH₂-N**); 4.33 (*s*, 1 H, **H-C(1)**); 5.98 (*d*, *J* = 6.64 Hz, 2 H, **OCH₂O**); 6.68 (*d*, *J* = 7.79 Hz, 1 H, **CH Aromat - Piperonylamin**); 6.73 (*s*, 1 H, **CH Aromat - Piperonylamin**); 6.78 (*d*, *J* = 8.02 Hz, 1 H, **CH Aromat - Piperonylamin**); 7.16, 7.41 (*dd*, *J* = 8.02 Hz, *J* = 8.48

Hz, 4 H, CH Aromat - BrPhenyl); 7.29, 7.71 (*dd*, $J = 8.02$ Hz, $J = 8.02$ Hz, 4 H, CH Aromat - CH₃-PhenylSO₂).

(1*RS*,3*aSR*,4*RS*,8*aSR*,8*bRS*)-2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-1-benzyl-4-(4-bromophenyl)-octahydro-pyrrolo[3,4-*a*]pyrrolizin-3-on



Zu einer Lösung von 3.6 mL (3.6 mmol) Zinkchlorid (1 M Lösung in Diethylether) in 17 mL absolutem Dichlormethan werden 6.5 mL (6.56 mmol) Benzylmagnesiumbromid (1 M Lösung in Diethylether) zugegeben und das Gemisch für 30 min unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 2.00 g (3.28 mmol) der Toluolsulfinyl-Verbindung 30 in 17 mL absolutem Dichlormethan unter Eiskühlung langsam addiert und das Reaktionsgemisch für 20 h rühren gelassen. Danach werden 20 mL 1 M HCl zugegeben, nach 10 min mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und das Gemisch mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand chromatographisch über Kieselgel 60 gereinigt (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 1.63 g (2.99 mmol, 83 %). Oranges, zähflüssiges Öl.

R_F: 0.31 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.23 - 1.31 (*m*, 1 H, CH₂-Benzyl); 1.57 - 1.65 (*m*, 2 H, H-C(7) und H-C(8)); 1.78 - 1.83 (*m*, 2 H, H-C(7) und H-C(8)); 2.46 - 2.54 (*m*, 3 H); 2.79 - 2.83 (*m*, 1 H); 2.89 - 2.92 (*m*, 1 H); 3.05 - 3.11 (*m*, 2 H); 3.48 - 3.51 (*m*, 1 H, H-C(1)); 3.80, 4.86 (*d*, $J = 14.89$ Hz, $J = 14.89$ Hz, 2 H, CH₂-N); 3.96 (*d*, $J = 7.79$ Hz, 1 H, H-C(4)); 5.98 (*d*, $J = 6.64$

Hz, 2 H, OCH₂O); 6.61 (*d*, *J* = 7.79 Hz, 1 H, CH Aromat - Piperonylamin); 6.67 (*s*, 1 H, CH Aromat - Piperonylamin); 6.76 (*d*, *J* = 8.02 Hz, 1 H, CH Aromat - Piperonylamin); 7.07, 7.43 (*dd*, *J* = 8.02 Hz, *J* = 8.25 Hz, 4 H, CH Aromat - BrPhenyl); 7.23 - 7.37 (*m*, 5 H, CH Aromat - Benzyl).

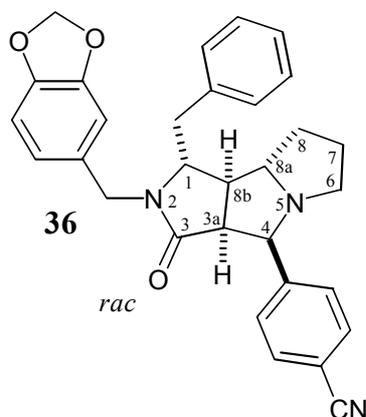
¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) 24.51 (CH₂ Grundgerüst); 31.19 (CH₂ Grundgerüst); 39.51 (CH₂ Benzyl); 43.99 (CH₂ Grundgerüst); 51.57 (CH Grundgerüst); 51.70 (CH Grundgerüst); 52.38 (CH₂ Grundgerüst); 62.88 (CH Grundgerüst); 71.76 (-N-CH₂-Piperonyl); 76.75 (CH Grundgerüst); 101.04 (OCH₂O); 108.09 (CH Aromat - Piperonylamin); 108.67 (CH Aromat - Piperonylamin); 120.95 (CH Aromat - Piperonylamin); 121.98 (CH Aromat - Piperonylamin); 126.80 (CH Aromat); 128.41 (CH Aromat); 128.67 (CH Aromat); 129.25 (CH Aromat); 129.59 (CH Aromat); 130.86 (CH Aromat); 136.72 (C Aromat); 137.22 (C Aromat - Benzyl); 146.96 (C Aromat - Piperonylamin); 147.98 (C Aromat - Piperonylamin); 172.24 (C=O).

MS (HR-EL, 120°C): C₃₀H₂₉BrN₂O₃ ber.: 544.1362 gef.: 544.1372 ± 0.0050.

(m/z (%)): 544 (30.6) [M(Br⁷⁹)⁺], 533 (68.2) [M(Br⁸¹)⁺ -CH₂], 485 (14.5) [M(Br⁷⁹)⁺ -OCH₂, -C=O], 455 (32.6) [M(Br⁸¹)⁺ -Benzyl], 441 (15.7) [M(Br⁷⁹)⁺ -Benzyl, -CH₂], 250 (11.0) [Bruchstück mit Piperonyl und Benzyl], 237 (54.4) [Grundgerüst mit Phenyl], 135 (74.5) [Piperonyl-Rest], 121 (15.4) [Piperonyl -CH₂], 91 (60.2) [Benzyl].

EA C₃₀H₂₉BrN₂O₃ (544.14) ber.: C 67.81 %, H 6.79 %, Cl 6.46 %, N 10.20 %, O 8.74 %;
gef.: C 66.10 %, H 6.16 %, Cl 6.68 %, N 9.41 %, O 11.65 %.

(1*RS*,3*aSR*,4*RS*,8*aSR*,8*bRS*)-4-{2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-1-benzyl-3-oxo-decahydro-pyrrolo[3,4-*a*]pyrrolizin-4-yl}-benzonnitril



Eine Suspension von 1.63 g (2.99 mmol) der Bromid-Verbindung **35** und 1.06 g (12.0 mmol) Kupfer(I)cyanid in 15 mL absolutem DMF wird für 20 h unter Rückfluss gerührt (Argonatmosphäre). Danach wird ein Teil DMF (ca. 12 mL) destillativ entfernt. Anschließend werden 30 mL Dichlormethan und 15 mL konzentrierte, wässrige Ammoniak-Lösung zugegeben. Das Gemisch wird für eine Stunde bei Raumtemperatur stark gerührt. Die blaue wässrige Phase wird abgetrennt und die organische Phase noch zweimal mit Ammoniak-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden noch einmal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird chromatographisch über Kieselgel 60 gereinigt (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 1.23 g (2.50 mmol, 83 %). Braunes Öl.

R_F: 0.12 (*n*-Hexan/Ethylacetat 1:1).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 1.26 - 1.34 (*m*, 1 H, CH₂-Benzyl); 1.60 - 1.63 (*m*, 2 H, H-C(7) und H-C(8)); 1.70 - 1.85 (*m*, 2 H, H-C(7) und H-C(8)); 2.47 - 2.57 (*m*, 3 H); 2.85 - 2.87 (*m*, 1 H); 2.88 - 2.96 (*m*, 1 H); 3.04 - 3.14 (*m*, 2 H); 3.48 - 3.51 (*m*, 1 H, H-C(1)); 3.77, 4.86 (*d*, *J* = 14.89 Hz, *J* = 14.89 Hz, 2 H, CH₂-N); 4.06 (*d*, *J* = 7.33 Hz, 1 H, H-C(4)); 6.01 (*d*, *J* = 7.56 Hz, 2 H, OCH₂O); 6.61 - 6.65 (*m*, 2 H, CH Aromat - Piperonylamin); 6.77 (*d*, *J* = 7.79 Hz, 1 H, CH Aromat - Piperonylamin); 7.09, 7.61 (*dd*, *J* = 7.10 Hz, *J* = 8.02 Hz, 4 H, CH Aromat - BrPhenyl); 7.25 - 7.33 (*m*, 3 H, CH Aromat - Benzyl) ; 7.49 (*t*, *J* = 4.35 Hz, 2 H, CH Aromat - Benzyl).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) 24.59 (CH₂ Grundgerüst); 31.25 (CH₂ Grundgerüst); 39.21 (CH₂ Benzyl); 43.88 (CH₂ Grundgerüst); 51.42 (CH Grundgerüst); 51.80 (CH Grundgerüst); 52.47 (CH₂ Grundgerüst); 62.60 (CH Grundgerüst); 71.77 (-N-CH₂-Piperonyl); 76.75 (CH Grundgerüst); 100.98 (OCH₂O); 107.97 (CH Aromat - Piperonylamin); 108.42 (CH Aromat - Piperonylamin); 110.44 (CH Aromat); 119.21 (CN); 121.73 (CH Aromat - Piperonylamin); 126.75 (CH Aromat); 128.60 (CH Aromat); 128.72 (CH Aromat); 129.13 (CH Aromat); 129.47 (CH Aromat); 131.44 (CH Aromat); 136.51 (C Aromat); 136.95 (C Aromat - Benzyl); 146.89 (C Aromat - Piperonylamin); 147.94 (C Aromat - Piperonylamin); 172.18 (C=O).

MS (HR-EL, 250°C): C₃₁H₂₉N₃O₃ ber.: 491.2209 gef.: 491.2213 ± 0.0050.

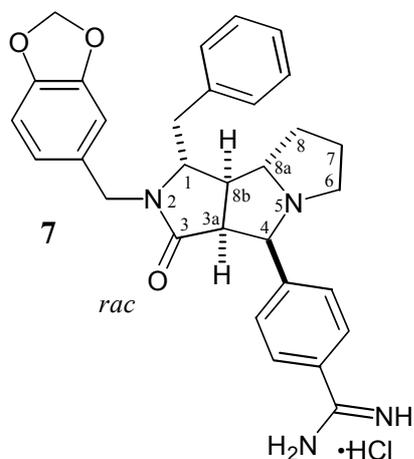
(m/z (%)): 491 (7.0) [M⁺], 478 (100) [M⁺ -CH₂], 400 (9.4) [M⁺ -Benzyl], 135 (74.5) [Piperonyl-Rest].

EA C₃₁H₂₉N₃O₃ (491.22)

ber.: C 75.74 %, H 5.95 %, N 8.55 %, O 9.76 %;

gef.: C 73.52 %, H 5.84 %, N 10.59 %, O 10.05 %.

(1*RS*,3*aSR*,4*RS*,8*aSR*,8*bRS*)-4-{2-(Benzo[1,3]dioxol-5-ylmethyl)-1-benzyl-3-oxo-decahydro-pyrrolo[3,4-*a*]pyrrolizin-4-yl}-benzamidin-hydrochlorid



Unter Absolutbedingungen werden 7.0 mL absolutes Dichlormethan und 5.0 mL absolutes Methanol auf 0°C gekühlt. Danach folgt die tropfenweise Addition von 5.0 mL Acetylchlorid. Nach 5 min werden 1.23 g (2.5 mmol) der Cyano-Verbindung **36** in einer Portion zugegeben und die Reaktionsmischung ruht für 3 d bei 4°C.

Das Intermediat wird durch Zugabe von 40 mL trockenem Diethylether ausgefällt. Der Feststoff wird zweimal mit 40 mL trockenem Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zu dem Intermediat werden 5.0 mL (10.0 mmol) methanolische Ammoniak-Lösung zugegeben und 3.5 h bei 68°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Ammoniumchlorid mit 40 mL trockenem Aceton ausgefällt und abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 2.0 mL absolutem Ethanol oder Methanol gelöst und mit 40 mL trockenem Diethylether ausgefällt.

Ausbeute: 140 mg (0.28 mol, 11 %). Gelblicher Feststoff.

Smp.: 200°C.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 1.31 - 1.36 (*m*, 1 H, CH₂-Benzyl); 1.50 - 1.64 (*m*, 2 H, H-C(7) und H-C(8)); 1.76 - 1.80 (*m*, 2 H, H-C(7) und H-C(8)); 2.35 - 2.40 (*m*, 3 H); 2.71 - 2.76 (*m*, 1 H); 2.90 - 2.96 (*m*, 1 H); 3.03 - 3.10 (*m*, 1 H); 3.40 - 3.45 (*m*, 1 H, H-C(1)); 3.95, 4.60 (*d*, *J* = 14.89 Hz, *J* = 14.89 Hz, 2 H, CH₂-N); 4.09 - 4.13 (*m*, 1 H, H-C(4)); 6.03 (*d*, *J* = 7.56 Hz, 2 H, OCH₂O); 6.73 - 6.75 (*m*, 2 H, CH Aromat - Piperonylamin); 6.91 (*d*, *J* = 7.79 Hz, 1 H, CH Aromat - Piperonylamin); 7.18, 7.75 (*dd*, *J* = 8.25 Hz, *J* = 8.25 Hz, 4 H, CH Aromat -

BrPhenyl); 7.23 - 7.33 (*m*, 3 H, **CH** Aromat - Benzyl) ; 7.49 (*d*, $J = 8.02$ Hz, 2 H, **CH** Aromat - Benzyl); 9.20 (*s br*, 2 H, **NH** Amidin); 9.35 (*s br*, 2 H, **NH** Amidin).

^{13}C -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 24.23 (**CH₂** Grundgerüst); 30.82 (**CH₂** Benzyl); 38.13 (**CH₂** Grundgerüst); 42.87 (**CH₂** Grundgerüst); 45.85 (**CH** Grundgerüst); 51.21 (**CH** Grundgerüst); 52.03 (**CH₂** Benzyl); 62.36 (**CH** Grundgerüst); 64.74 (-N-**CH₂**-Piperonyl); 69.63 (**CH** Grundgerüst); 71.63 (**CH** Grundgerüst); 100.82 (**OCH₂O**); 107.94 (**CH** Aromat - Piperonylamin); 108.02 (**CH** Aromat - Piperonylamin); 120.92 (**CH** Aromat - Piperonylamin); 125.57 (**C** Aromat); 126.32 (**CH** Aromat); 126.93 (**CH** Aromat); 128.24 (**CH** Aromat); 128.45 (**CH** Aromat); 129.23 (**CH** Aromat); 130.84 (**C** Aromat); 137.20 (**C** Aromat - Benzyl); 146.27 (**C** Aromat - Piperonylamin); 147.23 (**C** Aromat - Piperonylamin); 147.32 (**C** Aromat - Piperonylamin); 165.54 (**C(NH₂)₂**); 171.31 (**C=O**).

MS (HR-El, 280°C): $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3$ ber.: 508.2474 gef.: 508.2438 ± 0.0050 .

(*m/z* (%)): 508 (9.6) [M^+], 491 (100) [$\text{M}^+ - \text{NH}_3$], 400 (99.6) [$\text{M}^+ - \text{NH}_3, -\text{Benzyl}$], 356 (23.3) [$\text{M}^+ - \text{NH}_3, -\text{Piperonyl}$], 184 (60.9) [Grundgerüst mit Phenyl], 135 (74.5) [Piperonyl-Rest].

EA $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ (508·36) ber.: C 68.31 %, H 6.10 %, Cl 6.50 %, N 10.28 %, O 8.81 %;
gef.: C 68.10 %, H 6.16 %, Cl 6.68 %, N 9.41 %, O 9.65 %.

6.4 Arbeiten mit Proteinen

6.4.1 Aufreinigung von Trypsin

Benötigte Lösungen:

TRIS-Puffer

- A 0.05 M TRIS auf pH 6.5 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure).
B 0.05 M TRIS auf pH 6.5 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure),
0.5 M NaCl.

Ameisensäure, verdünnt

0.1 M Ameisensäure in bidestilliertem Wasser.

Trypsin-Lösung

Bis zu 200 mg Sigma-Trypsin in 50 mL TRIS-Puffer A.

Dialyse-Lösung

1 mM HCl, 10 mM CaCl₂.

Geräte

FPLC-Anlage (ÄKTA™ FPLC) der Firma Amersham Biosciences.

Durchführung

Zuerst wird die Säule mit dem TRIS-Puffer A äquilibriert. Dann wird die Trypsin-Lösung auf die Affinitätssäule aufgetragen und nochmals mit TRIS-Puffer B nachgespült. Das Trypsin wird mit Hilfe der verdünnten Ameisensäure eluiert. Anschließend wird wieder der TRIS-Puffer A als Laufmittel verwendet. Die Elution des Trypsins wird durch einen UV-Vis - Detektor bei 254 nm Wellenlänge verfolgt. Die Trypsin enthaltenden Fraktionen werden 16 h bei 0°C gegen die Dialyse-Lösung dialysiert und zuletzt gefriergetrocknet.

6.4.2 Herstellung der Affinitätssäule zur Aufreinigung von Thrombin

Zuerst werden 10 g CH Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) in 100 mL 0.5 M Natriumchlorid-Lösung quellen gelassen. Anschließend wird mit einer G2-Glasfritte gründlichst mit 3 Liter 0.5 M Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit 6 L Wasser entsalzt. Dann werden 750 mg *p*-Aminobenzamidin in 4 mL Wasser gelöst und mit der Suspension aus CH Sepharose vermischt. Nach dem Zusatz von 98 mL 0.1 M 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) (pH 4.75) wird langsam mit einem Flügelrührer gerührt und der pH-Wert mit verdünnter

Natronlauge auf 5.0 gehalten. Mit 3.71 g *N*-Cyclohexyl-*N'*-[β -(*N*-methylnmorpholino)-ethyl-]carbodiimid-*p*-toluolsulfonat wird eine 0.1 M Lösung in Wasser hergestellt. Diese wird langsam und portionsweise zu der Sepharose-Aufschlammung hinzugegeben und der pH-Wert eine Stunde lang zwischen 4 und 6 gehalten. Anschließend wird der Ansatz 16 h bei 4°C geschüttelt.

Danach wird die gelartige Substanz mit 500 mL 1 M MES pH 6.0, 500 mL 1 M *N*-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) pH 8.0 und 6 L Wasser gewaschen. Zum Schluss wird das Säulenmaterial mit folgendem Puffer äquilibriert:

0.05 M TRIS auf pH 7.5 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure),
0.75 M NaCl.

Das fertige Säulenmaterial wird in eine Säule (1.5 cm x 16 cm) gefüllt und bei 4°C aufbewahrt.

6.4.3 Aufreinigung von Thrombin

Benötigte Lösungen:

TRIS-Puffer

0.05 M TRIS auf pH 7.5 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure),
0.75 M NaCl.

Benzamidin-Lösung

30 mL 1 M Benzamidiniumhydrochlorid im TRIS-Puffer.

Thrombin-Lösung

130 - 160 mg Rohthrombin, isoliert aus Rinderblut³, in 30 mL TRIS-Puffer.

Geräte

GradiFrac System der Firma Amersham Pharmacia Biotech mit Peristaltikpumpe, Durchflusszelle mit Detektor bei 254 nm Wellenlänge, automatischem Schreiber und automatischem Fraktionssammler bzw. eine FPLC-Anlage (ÄKTA™ FPLC) der Firma Amersham Biosciences.

Durchführung

Nach dem Äquilibrieren der Affinitätssäule mit TRIS-Puffer wird die Thrombin-Lösung bei einer Aufgabegeschwindigkeit von 0.7 mL/min (Fluss: 40 x 1 x 0.1 min) aufgetragen und nochmals mit 30 mL TRIS-Puffer nachgespült. Im Abstand von 4 min wird mit dem Sammeln einer neuen Fraktion begonnen. Dies entspricht jeweils einem Volumen von 2.5 mL Lösung.

Nach dem Äquilibrieren wird das Thrombin durch einen linearen Laufmittelgradienten aus 30 mL Benzamidin-Lösung und 30 mL TRIS-Puffer eluiert. Anschließend wird wieder der TRIS-Puffer als Laufmittel verwendet. Die Elution des Thrombins wird durch einen UV-Vis – Detektor bei 254 nm Wellenlänge verfolgt. Die Thrombin enthaltenden Fraktionen werden mit Hilfe von PD-10 Entsalzungssäulen (Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt, vereinigt und 16 h gefriergetrocknet.

6.4.4 Aktivitätsbestimmung der Proteine

Verwendete Lösungen:

Veronalpuffer

0.1 M 5,5-Dimethylbarbitursäure auf pH 8.3 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure).

*p*NPGB-Lösung

0.01 M *p*-Nitrophenylguanidinobenzoat (*p*NPGB) in DMF (haltbar bis zur Gelbfärbung).

Thrombin-Lösung

0.1 M bovines α -Thrombin in 0.9 %iger Natriumchlorid-Lösung.

Trypsin-Lösung

0.1 M bovines β -Trypsin in 0.9 %iger Natriumchlorid-Lösung.

Messung

Zunächst wird eine Referenzmessung mit 1 mL Veronalpuffer durchgeführt. Anschließend werden in zwei 1 cm Küvetten jeweils 200 μ L Thrombin- bzw. Trypsin-Lösung mit 800 μ L Veronalpuffer gemischt. Danach werden 10 μ L *p*NPGB-Lösung (Substrat-Lösung, die zu *p*-Nitrobenzol gespalten wird) in die Probenküvette gegeben, der Inhalt gut durchmischt und die Probenküvette schnell in ein Zweistrahlenspektrophotometer (Bio-Rad Smart-SpecTM 3000) gebracht. Bei 410 nm wird nun die Absorptionsänderung in der Probenküvette solange gemessen, bis die Absorptionsänderung geradlinig verläuft. Dies bedeutet, dass kein weiteres Substrat mehr gespalten wird. Der Extinktionssprung ΔE (*initial burst*) wird durch Interpolation auf den Zeitpunkt der Zugabe der *p*NPGB-Lösung bestimmt. Die Konzentration *c* (in mol/L) des aktiven Enzyms ergibt sich aus dem *Lambert-Beerschen* Gesetz:

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} \quad \text{(Gleichung 6.1),}$$

wobei ε der Extinktionskoeffizient (*p*NPGB $\varepsilon = 17300$) und *d* die Länge des Strahlungsweges durch die Küvette (*d* = 1 cm) ist.⁴

Ergebnisse

Folgende Konzentrationen an aktivem Enzym konnten auf diese Weise bestimmt werden:

Trypsin: 24.0 - 27.0 nmol / mg Einwaage (56 - 63 % Aktivität).

Thrombin: 16.0 - 21.1 nmol / mg Einwaage (60 - 79 % Aktivität).

Die unterschiedlichen Aktivitäten von Thrombin ergaben sich aus der variierenden Qualität der verschiedenen Aufreinigungen. Die unterschiedlichen Aktivitäten von Trypsin hängen von der Qualität der Chargen von Sigma ab.

6.4.5 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung mit BIOQUANT[®] (nach der Bradford-Methode,⁵)

Die Eichung wurde mit Rinderserumalbumin durchgeführt, indem eine Eichgerade mit zehn Proteinkonzentrationen zwischen 0 und 100 µg/mL erstellt wurde. Die entsprechende Verdünnung wurde mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Zu 250 µL der jeweiligen Probe wurden 2.5 mL des Bradford-Reagenzes gegeben, der Ansatz gründlich durchmischt und nach drei Minuten die Absorption photometrisch bei 595 nm (Bio-Rad Smart-Spec[™] 3000) bestimmt. Als Referenz diente nur bidestilliertes Wasser und Bradford-Reagenz. Die Proteinbestimmungen wurden entsprechend dieser Vorschrift durchgeführt. Bei zu hoher Proteinkonzentration wurde die Lösung mit dem Probenpuffer weiterverdünnt.

Extinktionsmessung bei 280 nm

Die Absorption einer Proteinlösung wurde photometrisch bei 280 nm (Bio-Rad Smart-Spec[™] 3000) in Quarzküvetten (d = 1 cm) bestimmt. Der Probenpuffer diente als Referenz.

6.5 Mikrokalorimetrische Messungen

6.5.1 Standardpuffer

HEPES-Puffer

50 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES) auf pH 7.8 eingestellt (mit verdünnter Natronlauge),

0.1 % PEG 8000,

100 mM Natriumchlorid.

Pyrophosphat-Puffer

50 mM tetra-Natriumpyrophosphat Decahydrat auf pH 7.8 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure),

0.1 % PEG 8000,

100 mM Natriumchlorid.

TRICINE-Puffer

50 mM *N*-(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin (TRICINE) auf pH 7.8 eingestellt (mit verdünnter Natronlauge),

0.1 % PEG 8000,

100 mM Natriumchlorid.

TRIS-Puffer

50 mM TRIS auf pH 7.8 eingestellt (mit verdünnter Salzsäure),

0.1 % PEG 8000,

100 mM Natriumchlorid.

6.5.2 Messgerät

Die Messungen wurden mit den isothermalen Titrationskalorimetern MCS-ITC und VP-ITC von MicroCal (Northampton, USA) durchgeführt.⁶ Gesteuert wird das Gerät mit der WINDOWSTM-Software MicroCal OBSERVER bzw. VPViewer. Die für die Messung verwendeten Spritzen (100 und 250 μ L) sind eine Spezialanfertigung der Firma MicroCal (Northampton, USA). Am unteren Ende der langen Nadel gehen die Spritzen in einen kleinen Rührer über, um durch die Drehung der Spritze die Durchmischung der Lösung in der Messzelle zu gewährleisten. Das Volumen der Messzelle beträgt 1.3513 mL. Am einfachsten

lässt sich die Messzelle mit einer Hamilton-Spritzen mit entsprechend langer Kanüle befüllen. Die Spritzen für das Messgerät werden mit Hilfe eines kleinen Schlauches und einer weiteren Spritze manuell befüllt bzw. bei dem VP-ITC Kalorimeter auf ähnliche Weise, nur wird hier die Spritze über das Programm gesteuert.

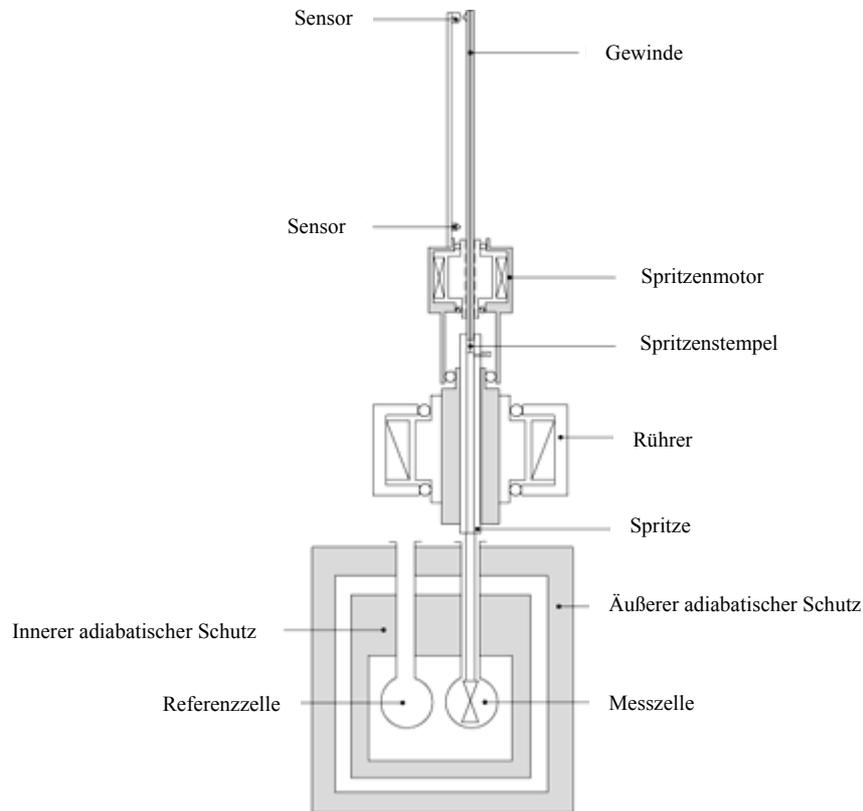


Abbildung 6.1 Schematischer Aufbau eines ITC-Gerätes.⁷

6.5.3 Reinigung

Die Messzelle muss regelmäßig zuerst mit 200 mL Triton[®]X100-Lösung (1 : 100 verdünnt) und anschließend mit 1 L Wasser gespült werden. Bei stärkeren Verschmutzungen (wie z. B. ausgefallenes Protein oder nach längeren Messzeiten) kann eine Reinigung mit 500 mL 2 %iger SDS-Lösung und anschließend 1.5 L Wasser eventuell auftretende Probleme beheben. Ausgefallenes Protein ist häufig daran zu erkennen, dass die Abweichung der Basislinie vom vorgegebenen Wert wesentlich größer ist als üblich und dass das Gerät während der Messung ohne Grund anfängt zu heizen. Die Spritzen für die Messungen müssen immer gründlich mit Wasser gespült werden. Für die Hamilton-Spritzen empfiehlt es sich noch zusätzlich mit Ethanol zu spülen und anschließend zu trocknen.

6.5.4 Kalibrierung des Messgerätes

Das Kalorimeter muss halbjährlich kalibriert werden, wobei die Kalibrierung mittels einer Reihe elektrischer Standardpulse erfolgt. Die beiden Zellen müssen dazu mit Wasser gefüllt sein. Zur Anpassung der Kalibrierungskonstanten dient ein Mittelwert, der aus den Verhältnissen von gemessener Wärmemenge zu theoretisch zu erwartender Wärmemenge über alle Wärmeimpulse gebildet wird. Die neue Kalibrierungskonstante $\text{const}_{\text{neu}}$ wird dabei durch Multiplikation der alten Konstante $\text{const}_{\text{alt}}$ mit dem durchschnittlichen Verhältnis von erwarteter zu gemessener Wärmemenge erhalten.

$$\text{const}_{\text{neu}} = \text{const}_{\text{alt}} \cdot \frac{\sum \frac{W_{\text{erwartet}}}{W_{\text{gemessen}}}}{\text{Anzahl der Pulse}} \quad (\text{Gleichung 6.2})$$

Diese Anpassung der Kalibrierungskonstante ist allerdings nur notwendig, falls die gemessenen Wärmemengen um mehr als 1 % von den erwarteten Wärmemengen abweichen. Eine Abweichung wurde bisher noch nicht gefunden.

6.5.5 Durchführung der Messungen

Außer den Messungen zur Wärmekapazitätsänderung ΔC_p , wurden alle Messungen bei 25°C durchgeführt. Dazu wurde der Thermostat des Kalorimeters auf 25°C eingestellt. Damit die gemessenen Reaktionswärmen nicht von Verdünnungseffekten des Puffers überlagert werden, ist es sehr wichtig sowohl das Protein wie auch die Liganden in den gleichen Puffer-Lösungen zu lösen. Dafür wurde einer der oben beschriebenen Standardpuffer verwendet. Die verwendeten Mengen an Protein und Ligand sowie die entsprechenden Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle angegeben und beziehen sich jeweils auf 2 mL eines der Standardpuffer.

Tabelle 6.1 Für die ITC-Messungen verwendete Mengen und Konzentrationen.

Ligand	Konzentration [mM]	Masse [mg]	Protein	Konzentration [mM]	Masse [mg]
1	0.0975	0.095	Thrombin	0.0065	0.645
2	1.00	0.987	Thrombin	0.05	3.750
3	0.75	0.725	Thrombin	0.05	3.750
4	1.00	1.072	Thrombin	0.08	6.000
5	1.00	1.060	Thrombin	0.08	6.000
6	0.75	0.725	Thrombin	0.05	3.750
7	2.00	2.178	Thrombin	0.15	11.250
1	2.00	1.984	Trypsin	0.16	13.329
2	3.60	3.560	Trypsin	0.30	24.990
3	2.40	2.314	Trypsin	0.2	16.660
4	2.40	2.573	Trypsin	0.2	16.660
5	1.20	1.272	Trypsin	0.1	8.330
6	3.60	3.474	Trypsin	0.30	24.990
7	2.00	2.178	Trypsin	0.16	13.329

Bevor die Lösungen in die Messzelle bzw. in die Spritze gefüllt werden können, muss unter vermindertem Druck und Rühren entgast werden. Mit einer Hamiltonspritze wird die Protein-Lösung langsam und ohne Luftblasen in die Messzelle gefüllt, die vorher mit dem gleichen Puffer vorgespült wurde. Beim Befüllen der Speziälspritze mit der Liganden-Lösung ist ebenfalls darauf zu achten, keine Luftblasen in die Spritze zu bekommen. Da sich durch Luftblasenbildung störende Effekt, die sich in Form von zu kleinen Signalen zu Beginn der Messung bemerkbar machen, ergeben können, empfiehlt es sich, bei der ersten Einspritzung nur 1.5 µL zu verwenden und erst danach mit der eigentlichen Messung zu beginnen.

Nach dem Start der Messung dauert es ca. 20 Minuten bis das Gerät die Lösungen in der Zelle vollständig thermostatisiert hat und die eigentliche Messung beginnen kann. Diese besteht aus 22 bis 25 Einspritzungen eines Aliquots von 10 µL Volumen. Die Wartezeit zwischen zwei Einspritzungen hängt hauptsächlich davon ab, wie lange das System braucht, um nach einer Einspritzung die Basislinie wieder zu stabilisieren, d.h. die Temperaturdifferenz zwischen Mess- und Referenzzelle auszugleichen. Im Normalfall liegt dieser Zeitraum bei einer Rührgeschwindigkeit von 240 Umdrehungen pro Minute bei etwa 300 bis 360 s. Das verwendete Volumen pro Einspritzung hängt von einigen unterschiedlichen Faktoren ab, wie

z.B. Inhibitor- und Proteinkonzentration, Größe der Spritze, erwarteter Wärmetönung und Bindungskonstante K . Bei einer 1:1 Bindung müssen die Konzentrationen so gewählt werden, dass die Gesamtkonzentration des Liganden in der Messzelle am Ende der Messung zweimal so groß ist wie die Gesamtkonzentration an Protein. Damit sollten die letzten Signale, die beträchtlich hinter dem Äquivalenzpunkt liegen nur noch aufgrund von Verdünnungswärme des Liganden oder unspezifischen Bindungsvorgängen zustande kommen, da das Protein zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig gesättigt ist. Diese Verdünnungswärme muss daher von der eigentlichen Bindungsisothermen subtrahiert werden. Jedes Experiment sollte mindestens dreimal durchgeführt werden. Einmal nur mit Ligand, der in den Puffer titriert wird, einmal mit Puffer und Protein-Lösung und einmal die eigentliche Titration von der Ligand-Lösung in die Protein-Lösung.

Die Anpassung der Bindungsisothermen an die Messpunkte erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*least squares fit*). Dabei wurde jede Messung mehrmals durchgeführt, bis mindestens zwei exakt gleiche Kurven erhalten wurden. Für die endgültige Bestimmung der thermodynamischen Parameter des Protein-Inhibitor-Komplexes wurde der Durchschnitt dieser Messungen verwendet. Die Abweichung zwischen den Messungen betrug maximal 10 % bei den einfachen Kurven. Bei den Kurven der Racemate lag die Abweichung deutlich höher.

6.5.6 Messung der Wärmekapazitätsänderungen

Zur Bestimmung der Wärmekapazitätsänderung ΔC_p durch Komplexbildung wurden die Enthalpiewerte wie oben beschrieben bei folgenden Temperaturen gemessen:

20°C, 25°C, 30°C, 35°C und 40°C.

Das MCS-ITC Kalorimeter muss für Messungen bei 20°C mit Hilfe eines Wasserbads auf 15°C gekühlt werden, bei Messungen über 25°C ist es notwendig, dass Kalorimeter entsprechend zu heizen. Das VP-ITC Kalorimeter reguliert die Temperaturen selbstständig.

Durch eine Auftragung der gemessenen Enthalpie gegen die Temperatur und anschließende lineare Regression lassen sich die ΔC_p -Werte bestimmen.

6.5.7 Messungen zur Pufferabhängigkeit

Kalorimetrische Untersuchungen von biologischen Systemen werden in gepufferten Lösungen durchgeführt, um den pH-Wert konstant zu halten und um ein Umgebung für die Proteine zu schaffen, in der sie stabil sind und gleichzeitig eine möglichst hohe Aktivität besitzen. Werden während der Bindung Protonen vom beobachteten System aufgenommen oder abgegeben, so ist ein Teil der beobachteten Enthalpie ΔH_{beob} auf diese Protonierungsreaktion zurückzuführen.

Als Beispiel sei hier eine Reaktion zwischen einem Protein P und dem Liganden L angeführt, die zusammen den Komplex PL bilden, wobei n für die Anzahl der ausgetauschten Protonen und ΔH für die Enthalpie der Komplexbildung stehen:



Es sind mehrere Protonierungsvorgänge bei der Komplexbildung denkbar. Es werden in der Nettobilanz keine Protonen ausgetauscht ($n = 0$), vom System können aber auch n Protonen aufgenommen ($n > 0$) oder abgegeben ($n < 0$) werden. Dabei wird in erster Näherung angenommen, dass die ionisierbaren funktionellen Gruppen in P und L keine von Null verschiedene Ionisierungsenergie aufweisen, da ansonsten eine weitere Korrektur notwendig wäre (siehe 6.5.8).

Findet diese Reaktion in einer gepufferten Lösung statt, so spielt die Aufnahme oder Abgabe von Protonen durch den Puffer ebenfalls eine Rolle. Die dabei abgegebene oder aufgenommene Enthalpie ΔH_{ion} entspricht der Ionisierungsenthalpie des jeweiligen Puffers. Diese sind der Tabelle 6.2 zu entnehmen.



Somit ergibt sich folgende Beziehung für die in den Messungen beobachtete Enthalpie $\Delta H_{\text{obs}}^\circ$.

$$\Delta H_{\text{obs}}^\circ = \Delta H^\circ + n \cdot \Delta H_{\text{ion}}^\circ \quad \text{(Gleichung 6.5)}$$

Um mehr über die Pufferabhängigkeit der Komplexbildung zu erfahren, müssen die Messungen in verschiedenen Standardpuffern (zum Beispiel HEPES-, Pyrophosphat-, TRICINE- und TRIS-Puffer) bei konstantem pH-Wert durchgeführt werden.

Die korrigierte Enthalpie der Komplexbildung ΔH° kann aus dem Achsenabschnitt der Ordinate bestimmt werden, indem die gemessenen Enthalpien $\Delta H_{\text{beob}}^\circ$ gegen die Ionisierungsenthalpien der Puffersubstanzen $\Delta H_{\text{ion}}^\circ$ aufgetragen werden und anschließend

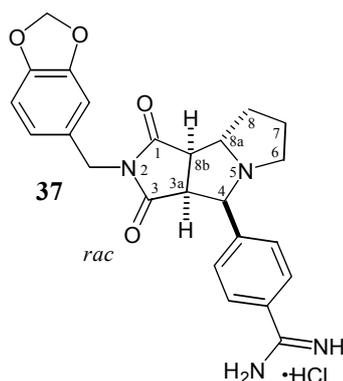
eine linearer Regression durchgeführt wird. Die Steigung der resultierenden Gerade gibt Auskunft über die Anzahl n der Protonen, die aufgenommen bzw. abgegeben werden.

Tabelle 6.2 Übersicht über die verwendeten Ionisierungsenthalpien der unterschiedlichen Puffersubstanzen. Werte entsprechend der angegebenen Literatur .

	Ionisierungsenthalpie $\Delta H_{\text{ion}}^{\circ}$	Literatur
Pyrophosphat	$5.12 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	8
HEPES	$21.07 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	8
TRICINE	$31.97 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	8
TRIS	$48.07 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	9

6.5.8 Bestimmung von Ionisierungsenthalpien

Besitzt eine ionisierbare funktionelle Gruppe des Proteins oder des Liganden eine von Null verschiedene Ionisierungsenthalpie, so muss zusätzlich noch ein Korrekturterm für diesen Beitrag berücksichtigt werden. Für die Korrektur der gemessenen Enthalpie wurde die Ionisierungsenthalpie einer ähnlichen Verbindung bestimmt. Dazu wurden eine 50 mM Lösung der Modellverbindung **37** auf pH 6.4 eingestellt, entsprechend dem pK_a -Wert dieser Verbindung. Die entgaste Lösung wird in der Messzelle des ITC-Gerätes vorgelegt. Anschließend wurden bei 25°C mit der 100 μL Spritze 10 Aliquote mit je 10 μL Volumen einer 1 mM Salzsäure injiziert. Entsprechend wurde zur Bestimmung der Verdünnungsenthalpie 1 mM Salzsäure nach dem gleichen Protokoll in eine mit Wasser gefüllte Zelle eingespritzt. Die gemessene Ionisierungsenthalpie musste danach um den Betrag der Verdünnungsenthalpie korrigiert werden und der Mittelwert aus den gemessenen Enthalpien gebildet werden. Folgende Modellverbindung wurde für diese Messung verwendet:



6.6 Kristallographische Methoden

6.6.1 Kristallisation von Trypsinkomplexen durch „Soaking“

Verwendete Lösungen:

Kristallisationspuffer

1.9 M Ammoniumsulfat und 50 mM MES auf pH 6.0 eingestellt (mit verdünntem Ammoniak).

Trypsin-Lösung

60 mg bovines Trypsin (frisch aufgereinigt) in 1 mL einer wässrigen Lösung aus 10 mM Calciumchlorid und 1 mM Salzsäure lösen.

Benzamidin-Lösung

100 mM Benzamidiniumhydrochlorid in Wasser.

Azid-Lösung

0.2 %-ige Natriumazid-Lösung.

Reservoir-Lösung

2 Volumenanteile des Kristallisationspuffers und 1 Volumenanteil Azid-Lösung.

Durchführung

Zu Beginn wurden 100 μ L Trypsin-Lösung mit 100 μ L Benzamidin-Lösung gemischt und mindestens 30 min inkubiert. Danach wurde diese Lösung zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. In Kristallisationsplatten mit 24 Vertiefungen (Hampton Research, USA) für die Methode des *hanging drop* wurden 500 μ L der Reservoirlösung vorgelegt. Auf einem Deckgläschen wurden je 5 μ L der Kristallisations-Lösung und der Reservoir-Lösung vermischt und das Gefäß mit dem Deckgläschen abgeschlossen, wobei zum Abdichten Silikonpaste (Bayer-Silikon, Roth) verwendet wurde. Somit hängt der Tropfen mit der Protein-Inhibitor-Lösung über der Reservoirlösung. Bei 18°C wurde nun 16 h äquilibriert. Anschließend wurde die Reservoirlösung gegen 500 μ L des Kristallisationspuffers ausgetauscht und eine weitere Stunde äquilibriert. Danach wurde der Tropfen der Protein-Inhibitor-Lösung mit einem Impfkristall angeimpft. Etwa 7 d später zeigten sich erste Kristalle. Größere Kristalle wurden durch *seeding* erhalten. Für das anschließende *soaking* wurden Kristalle verwendet, die keine sichtbaren Baufehler zeigten.

Lösungen für das *soaking* mit Glutaraldehyd:**Erntepuffer**

2.5 M Ammoniumsulfat und 100 mM MES auf pH 6.0 eingestellt (mit verdünntem Ammoniak),
gesättigt mit CaCl₂.

Glutaraldehyd-Lösung

25 % Glutaraldehyd in Wasser.

Soaking-Puffer

100 mM MES auf pH 6.0 eingestellt (mit verdünntem Ammoniak),
30 % PEG 8000.

Durchführung

Im ersten Schritt muss der Kristall mit Hilfe von Glutaraldehyd-Lösung quervernetzt werden, um dessen Stabilität zu erhöhen. Danach kann der Kristall problemlos in einen anderen Puffer überführt werden, in dem sich der Ligand besser lösen lässt. Dafür wurden 500 µL des Erntepuffers mit 5 µL Glutaraldehyd-Lösung gut vermischt und in das Reservoir einer Kristallisationsplatte mit 24 Vertiefungen (Hampton Research, USA) gefüllt. Von dieser Lösung wurden 5 µL auf ein Deckgläschen gegeben und dann ein Kristall für maximal 30 min in diesem Tropfen belassen. Wichtig ist, dass der Kristall gut mit *soaking*-Puffer ohne Ligand gewaschen wurde bevor er in den *soaking*-Puffer mit dem Liganden überführt wird, da durch das Ammoniumsulfat im Erntepuffer der Inhibitor auf der Oberfläche des Kristalls auskristallisieren kann. Die Konzentration des Inhibitors im *soaking*-Puffer sollte mindestens 1 mg/mL betragen. Der Kristall wurde für 2 - 4 h im *soaking*-Puffer gelassen. Sollte der äußere Habitus des Kristalls sich verschlechtern, dann muss die *soaking*-Zeit entsprechend verkürzt werden.

6.6.2 Kokristallisation von Trypsinkomplexen

Der Trypsinkomplex der Verbindungen **5** wurde durch Kokristallisation des Inhibitors mit Trypsin erhalten.

Verwendete Lösungen:**Kristallisationspuffer**

0.1 M Imidazol mit verdünntem Ammoniak auf pH 7.0 (8.0) eingestellt,

0.1 M bzw. 0.2 M bzw. 0.3 M Ammoniumsulfat,

20 % bzw. 30 % PEG 8000

0.1 % Natriumazid.

Trypsin-Lösung

20 mg Trypsin (frisch aufgereinigt) wurde in 1 mL einer wässrigen Lösung aus 10 mM Calciumchlorid und 1 mM Salzsäure gelöst.

Inhibitor-Lösungen

Jeweils 1 mg des Inhibitors wurde in 1 mL Wasser gelöst.

Kristallisations-Lösung

Es wurden 50 μL Trypsinlösung und 10 μL Inhibitorlösung gemischt und mit Wasser auf 100 μL Lösungsvolumen aufgefüllt.

Durchführung

Um die optimalen Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden ein Screening bei jeweils zwei verschiedenen pH-Werten, drei verschiedenen Ammoniumsulfat-Konzentrationen und zwei verschiedenen PEG 8000-Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurde in Kristallisationsplatten mit 24 Vertiefungen (Hampton Research, USA) für die Methode des *hanging drop* jeweils 500 μL der entsprechenden Reservoirlösung vorgelegt. Auf einem Deckgläschen wurden je 5 μL der Kristallisations-Lösung und der Reservoir-Lösung vermischt und das Gefäß mit dem Deckgläschen abgeschlossen, wobei zum Abdichten Silikonpaste (Bayer-Silikon, Roth) verwendet wurde. Somit hängt der Tropfen mit der Protein-Inhibitor-Lösung über der Reservoirlösung.

Nach einer Woche zeigte sich bei beiden pH-Werten Kristallwachstum. Während bei 20 % PEG 8000 keine Kristalle wuchsen, zeigten sich bei den Lösungen mit 30 % PEG einige wenige Kristalle, die keine sichtbaren Baufehler hatten und für die anschließende Röntgenstrukturanalyse geeignet waren.

6.6.3 Kokristallisation von Thrombinkomplexen

Verwendete Lösungen:

Kristallisationspuffer

100 mM Phosphatpuffer,

350 mM NaCl,

10 mM Benzamidin-Lösung.

Thrombin-Lösung

Humanes Thrombin (Haemochrom, Essen) gelöst im Kristallisationspuffer (mit einer Konzentration von 4 - 5 mg/mL).

Hirudin(54-65)-Lösung

1 mg Acetyl-Hirudin (54-65) (sulfatiert) in 20 μ L Kristallisationspuffer (für 1 mg Thrombin).

Inhibitor-Lösungen

Jeweils 2 - 3 mg des Inhibitors (abhängig von dessen Löslichkeit) wurden in 1 mL Wasser gelöst.

Phosphatpufferpuffer

1 M NaH_2PO_4 und 1 M Na_2HPO_4 auf pH 7.5 eingestellt.

Reservoir-Lösung

50 μ L Phosphatpuffer (Endkonzentration 100 mM),

22 – 27 % PEG 8000 (40 %iger Lösung),

mit Wasser auf 500 μ L auffüllen.

Durchführung

Zu Beginn wurde die Thrombin-Lösung mit der Hirudin-Lösung gemischt und 16 h inkubiert. Danach wurde diese Lösung zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. In Kristallisationsplatten mit 24 Vertiefungen (Hampton Research, USA) für die Methode des *hanging drop* wurden 500 μ L der Reservoirlösung vorgelegt. Auf einem Deckgläschen wurden jeweils 1.5 μ L der Kristallisations-Lösung, der Reservoir-Lösung und der Ligand-Lösung vermischt. Anschließend wurde das Gefäß mit Deckgläschen abgeschlossen, wobei zum Abdichten Silikonpaste (Bayer-Silikon, Roth) verwendet wurde. Somit hängt der Tropfen mit der Protein-Inhibitor-Lösung über der Reservoirlösung. Bei 4°C wurde nun 16 h äquilibriert. Anschließend wurde der Tropfen der Protein-Inhibitor-Lösung mit einem Impfkristall angeimpft. Etwa 7 d später zeigten sich erste Kristalle. Größere Kristalle wurden durch mehrmalig aufeinanderfolgendes *seeding* erhalten.

Für die Röntgenstrukturanalyse wurden nur Kristalle verwendet, die keine sichtbaren Baufehler zeigten.

6.6.4 Kristallmontage

Der zu vermessende Kristall wurde mit einem *loop* (Hampton Research, USA) aus der Lösung gefischt, kurz in einen *cryo*-Puffer getaucht und in flüssigen Stickstoff bei 100 K

eingefroren. Als *cryo*-Puffer diente entweder für Trypsin eine 22 %ige Lösung aus Glycerin im *soaking*-Puffer bzw. für Thrombin die Reservoir-Lösung.

6.6.5 Datensammlung

Die Beugungsbilder wurden auf einem Messplatz der Firma MCS/RIGAKU (Texas, USA) aufgenommen. Der *loop* mit dem tiefgefrorenen Kristall wurde auf einem Goniometerkopf im Stickstoffstrom montiert und so im Röntgenstrahl justiert, dass der Kristall bei allen Aufnahmewinkeln (d.h. bei der Drehung um die Achse des Goniometerkopfes) im Röntgenstrahl zentriert blieb.

Als Strahlungsquelle wurde eine RIGAKU RU-300 Drehanode mit Kupfer als Anodenmaterial verwendet. Die Spannung der Röntgenröhre betrug 50 kV bei 100 mA. Die Cu-K α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) wurde durch Osmic-Spiegel fokussiert. Zur Aufnahme der Beugungsbilder wurde ein RAXIS-IV bzw. RAXIS-IV++ Flächendetektorsystem (*image plate*) mit zwei Bildplatten verwendet. Der Abstand zwischen Kristall und Flächendetektor betrug bei den Messungen zwischen 100 und 120 mm, abhängig von der Streukraft des Kristalls.

Das Röntgengerät wurde durch die Software RIGAKU CrystalClear Version 1.3.0 und 1.3.6 angesteuert. Die Aufnahmezeiten für ein Beugungsbild betragen zwischen 5 und 10 min. Dabei wurde der Kristall für eine Aufnahme jeweils um 0.5° gedreht.

6.6.6 Datenauswertung

Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm XDISP visualisiert. Die Prozessierung der Daten erfolgte mittels des HKL2000 Paketes, das die Programme DENZO und SCALEPACK beinhaltet.¹⁰ Dabei wurde die Indizierung und Integration der einzelnen Beugungsbilder mit DENZO durchgeführt, während die Skalierung und Zusammenführung (*global refinement*) der mit DENZO erzeugten Dateien mittels SCALEPACK erfolgte.

6.6.7 Modellbau und Verfeinerung

Die Kristallstrukturen wurden unter Verwendung von bekannten Strukturen durch die Methode des Molekularen Ersatzes¹¹ gelöst. Hierbei wurden für die Trypsinkomplexe als Startmodelle folgende veröffentlichten Strukturen verwendet: 1MTS (für die Raumgruppe $P2_12_12_1$) und 1K1N (für die Raumgruppe $P3_121$). Für die Thrombinkomplexe diente eine Struktur aus der Arbeit von Ulrike Obst als Startmodell.² Für den Molekularen Ersatz wurde das Programm AMoRe (enthalten im CCP4-Paket)¹² verwendet.

Für die Strukturverfeinerung der Atomkoordinaten und Temperaturfaktoren wurden die Programme CNS¹³ und SHELXL¹⁴ verwendet. Das Strukturmodell wurde mit dem Programm O, Version 8.0.11¹⁵, aufgebaut und sukzessive mit SHELXL verfeinert. Nach jedem Verfeinerungszyklus wurden die Elektronendichten ($3F_o-2F_c$, F_o-F_c) berechnet und mit dem Programm MAPMAN in ein für O lesbares Format konvertiert.¹⁶ Die Inhibitorstrukturen wurden in SYBYL, Version 6.9.2 (Tripos Inc., St. Louis, USA), aufgebaut und minimiert. Die Strukturen wurden so lange verfeinert, bis in der F_o-F_c -Differenzelektronendichte keine signifikanten Restelextronendichtepeaks mehr vorhanden waren, die Lösungsmittelmolekülen oder Ligandenatomen zugeordnet werden konnten.

Für die Verfeinerung der Strukturen wurden die Parameter von Engh und Huber verwendet.¹⁷

6.6.8 Analyse des Modells

Nach der Verfeinerung wurde die Qualität der Modelle mit dem Programm PROCHECK kontrolliert, in dem der Ramachandran Plot und andere statistische Parameter berechnet wurden.¹⁸ Falls in den ausgegebenen Statistiken und Grafiken für eine bestimmte Aminosäure ungewöhnliche ϕ/ψ -Winkel, Torsionswinkel χ_n der Seitenkette oder sonstige geometrische Auffälligkeiten auftraten, so wurden diese noch einmal überprüft. Überlagerungen mit anderen Proteinen wurden mit dem Programm ProFit 2.3¹⁹ durchgeführt.

6.6.9 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Molekülmodelle wurde das Programm PyMOL²⁰ verwendet. Damit können sowohl Oberflächen als auch Dichten erzeugt und dargestellt werden.

6.7 Berechnung der Oberflächen

Die Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen (*Connolly surfaces, solvent accessible surfaces*) wurden mit dem Programm MS²¹ mit Hilfe eines Zusatzes von Holger Gohlke berechnet. Dabei wurde ein Sondenradius von 1.5 Å benutzt.

Der Anteil der polaren Oberfläche enthält alle Sauerstoff- und Stickstoffatome einschließlich der daran gebundenen Wasserstoffatome. Der nicht-polare Oberflächenanteil ergibt sich dagegen aus der Differenz von Gesamtoberfläche und polarem Oberflächenanteil. Die bei der Ligandenbindung vergrabene Oberfläche ist die Differenz aus der Summe der Oberflächen des freien Liganden und Enzyms einerseits und der Oberfläche der Komplexes andererseits. Die verwendeten Atomradien wurden der Literatur²² entnommen.

6.8 Cross-Docking

Zuerst mussten die Proteinstrukturen für das Docking vorbereitet werden. Es wurden die in dieser Arbeit bestimmten Komplexe mit Trypsin sowie die Struktur des Thrombinkomplexes aus der Arbeit von Obst *et al.* jeweils ohne Wassermoleküle und ohne Liganden verwendet. Zu den Proteinen wurden mit Hilfe von PROTONATE, einem AMBER Tool²³, die polaren Wasserstoffatome addiert. Zusätzlich wurden die partiellen Atomladungen des AMBER Kraftfeldes sowie die Solvationsparameter mit ADDSOL aus AutoDock 3.0²⁴ hinzugefügt.

Da AutoDock ein Gitter-basiertes Docking-Programm ist, wurden zuerst die separaten Standard-Gitter für jedes Protein erzeugt. Die Gitter wurden mit Hilfe von AutoGrid erzeugt, wobei ein Abstand von 1 Å für die Gitterpunkte verwendet wurde. Jedes Gitter wurde auf die entsprechende Bindetasche zentriert und umfasste eine Größe von 30 Å × 30 Å × 30 Å. Anschließend wurden die Gitter der Proteine Thrombin und Trypsin zu einem gemeinsamen Gitter kombiniert, indem eine lineare Verschiebung entlang der x-Achse vorgenommen

wurde. Die beiden Einzelgitter werden dabei durch eine 3 Å breite repulsive Zwischenschicht getrennt, um Artefakte während des Dockings zu vermeiden.²⁵

Die Koordinaten der Liganden wurden den Kristallstrukturen entnommen und im mol2-Format abgespeichert. Nachdem mit dem Programm Sybyl²⁶ Wasserstoffatome und Gasteiger-Marsili-Ladungen an den Liganden angefügt worden waren, wurden im Programm AutoTors die frei drehbaren Bindungen des Liganden definiert.

Das Docking wurde mit dem Programm AutoDock durchgeführt, indem die empirische Energiefunktion und der Lamarck'sche genetische Algorithmus (LGA) verwendet wurden. Für das Docking wurde ein Standardprotokoll angewendet, mit einer Anfangspopulation von 50 zufällig platzierten Liganden, einer maximalen Anzahl von 1.5×10^6 Energie-Evaluierungen, einer Mutationsrate von 0.02, einer *crossover*-Rate von 0.80 und einem Elitismus-Wert von 1. In jeder Generation wurde für einen gewissen Teil der Population sowohl die Konformation als auch die Position des Liganden in der Bindetasche einer lokalen Energieoptimierung unterzogen. Dabei betrug die Iterationsrate maximal 300. Es wurden insgesamt 50 unabhängige Läufe durchgeführt und alle Ergebnisse analysiert.

Alternativ zur Optimierung mit der in AutoDock implementierten Bewertungsfunktion, wurde das Docking analog unter Verwendung der *scoring*-Funktion DrugScore durchgeführt.²⁷ Dazu benötigen weder die Proteine noch die Liganden Wasserstoffatome oder Ladungen. Die Gitter wurden in diesem Fall unmittelbar mit DrugScore erzeugt, wobei ebenfalls wie mit AutoGrid ein Abstand von 1 Å für die Gitterpunkte verwendet wurde. Jedes Gitter wurde auf die entsprechende Bindetasche zentriert und hatte eine Größe von 30 Å × 30 Å × 30 Å. Ansonsten wurde das Zusammenfügen der einzelnen Gitter zu einem einzigen sowie das Docking analog zu dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm PyMOL²⁰ und einem hierzu von Ingo Dramburg entwickelten Zusatzmodul. Es wurde jeweils darauf geachtet, wie oft der jeweilige Ligand in einem der beiden Proteine platziert wurde und wie stark der gefundene Bindungsmodus von dem der Referenzkristallstruktur abwich.

6.9 Literatur

1. Becker, H. G. O. (1996). *Organikum*, J. A. Barth Verlag, Heidelberg.
2. Obst, U., Betschmann, P., Lerner, C., Seiler, P., Diederich, F., Gramlich, V., Weber, L., Banner, D. W. & Schönholzer, P. (2000). Synthesis of Novel Nonpeptidic Thrombin Inhibitors. *Helv. Chim. Acta* 83, 855-909.
3. Furton, J. (1972). Human thrombins: production, evaluation and peptide of a-thrombin. *J. Biol. Chem.* 252, 2587-3598.
4. Kézdy, F. J. & Kaiser, E. T. (1970). Principles of active site titration of proteolytic enzymes. *Methods Enzymol.* 19, 3-27.
5. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
6. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-7.
7. Chellani, M. (1999). *Application Note*.
8. Fukada, H. & Takahashi, K. (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins* 33, 159-66.
9. Christensen, J. J., Hansen, L. D. & Izatt, R. M. (1976). *Handbook of proton ionization heats and related thermodynamic quantities*, John Wiley and Sons, New York, USA.
10. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307-326.
11. Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst. A* 15, 24-51.
12. Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* 50, 760-763.
13. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Gross-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* 54 (Pt 5), 905-21.

14. Sheldrick, G. M. & Schneider, T. R. (1997). SHELXL: High resolution refinement. *Methods Enzymol.* 277b, 319-343.
15. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* 47 (Pt 2), 110-9.
16. Kleywegt, G. J. (1996). xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - Programs for Reformatting, Analysis and Manipulation of Biomacromolecular Electron-Density Maps and Reflection Data Sets. *Acta Cryst. D* 52, 826-8.
17. Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray proteinstructure-refinement. *Acta Cryst. A* 47, 392-400.
18. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
19. McLachlan, A. D. (1982). Rapid comparison of protein structures. *Acta Cryst. A* 38, 871-873.
20. DeLano, W. L. (2004). PyMOL pymol-0_97-bin-win32 edit. DeLano Scientific LLC.
21. Connolly, M. L. (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* 221, 709-13.
22. Bondi, A. (1968). *Physical properties of molecular crystals, liquids and glasses*, John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
23. Case, D. A., Pearlman, D. A., Caldwell, J. W., Cheatham III, T. E., Ross, W. S., Simmerling, C. L., Darden, T. A., Merz, K. M., Stanton, R. V., Cheng, A. L., Vincent, J. J., Crowley, M., Tsui, V., Radmer, R. J., Duan, Y., Pitera, J., Massova, I., Seibel, G. L., Singh, U. C., Weiner, P. K. & Kollman, P. A. (1999). AMBER 6 6 edit., University of California, San Francisco.
24. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19, 1639-1662.
25. Sotriffer, C. A. & Dramburg, I. (2005). "In-situ Cross-Docking" to Simultaneously Address Multiple Targets. *Med. Chem.*, in press.
26. SYBYL Molecular Modeling Software. Tripos Inc., St. Louis, MO.
27. Sotriffer, C. A., Gohlke, H. & Klebe, G. (2002). Docking into knowledge-based potential fields: a comparative evaluation of DrugScore. *J. Med. Chem.* 45, 1967-70.

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
abs.	absolut
Ac	Acetyl
aPC	aktiviertes Protein C
arom.	aromatisch
AT	Antithrombin
ber.	berechnet
d	Tag(e)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
EC	<i>Enzyme commission</i>
EI	<i>Electron impact</i>
ESI	Elektronenspray Ionisierung
Et	Ethyl
EZM	extrazelluläre Matrix
F	Blutgerinnungsfaktor
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
gef.	gefunden
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HR	<i>High Resolution</i>
HV	Hochvakuum
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
k	Kilo- (10^3)
konz.	konzentriert
L	Liter
LGA	Lamarck'scher genetischer Algorithmus
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})

M	Molarität (mol L ⁻¹)
Me	Methyl
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonanz</i>)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
p. A.	zur Analyse
PEG	Polyethylenglykol
Pip	Pipecolinsäure
pNPGb	p-Nitrophenylguanidinobenzoat
<i>ppm</i>	<i>parts per million</i>
<i>rms</i>	<i>root mean square</i>
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
TRICINE	<i>N</i> -(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	unit
UV	ultraviolett
V	Volt
verd.	verdünnt
Veronal	5,5-Dimethylbarbitursäure
VIS	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
Zers.	Zersetzung

7.2 Verwendete Nomenklatur der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.3 Kristallographische Begriffe

Auflösung	Abstand d_{\min} der Gitterebenen in einem gegebenen Kristall gemäß der Braggschen Gleichung; $d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}}$, wobei θ_{\max} den Beugungswinkel darstellt, bis zu dem sich die Beugungsintensität maximal beobachten lässt.
Datensatz	Ergebnis der Auswertung einer Serie von Diffraktionsbildern, welches die gemessenen Reflexe in Form von numerischen Werten der Strukturfaktoramplituden ($ F_{hkl} $) wiedergibt.
Differenz-Fourier	Fouriersummation, bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden: die resultierende Elektronendichtekarte gibt die molekularen Unterschiede wieder, welche die Differenzen in den Strukturfaktoramplituden erzeugen.
F_{calc}	Strukturfaktoren, die aus den Koordinaten eines Modells berechnet wurden, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{\text{calc}} $ (kürzer F_c) und den Phasenwinkeln α_{calc} zusammensetzen.
F_{obs}	Experimentelle Strukturfaktoren, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{\text{obs}} $ (kürzer F_o) und falls experimentell bestimmt, den Phasenwinkeln α_{obs} zusammensetzen.
Multiplizität	Mittelwert des Verhältnisses aus Anzahl der gemessenen Reflexe und der kristallographisch unabhängigen Reflexe.
R-Faktoren	Werden in der Kristallographie dazu verwendet, um die Übereinstimmung von zwei Messwerten oder der Messwerte mit dem Modell zu beschreiben.
R, R_{cryst}	Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur als Funktion der Übereinstimmung von $ F_{\text{calc}} $ und $ F_{\text{obs}} $;

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

wobei k einen Skalierfaktor darstellt, um die gemessenen und die berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitlich Skala zu bringen.

R_{free} Wird analog zu R mit einem bestimmten Anteil der Reflexe (*test set*) berechnet, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden, dies soll eine Überanpassung des Modells verhindern;

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \|}{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|}$$

wobei $hkl \subset k$ alle Reflexe des *test set* bezeichnet.

R_{sym} Beschreibung der Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung von symmetrieverwandten Reflexen;

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}}$$

für n unabhängige Reflexe und i Beobachtungen eines gegebenen Reflexes.

rigid body Bezeichnung für die Verfeinerung von ganzen Molekülen (oder Molekülteilen) als starre Körper.

rms bzw. RMS Quadratisches Mittel („*root mean square*“), das in der Regel zur Angabe von Abweichungen verwendet wird, im Gegensatz zum geometrischen Mittelwert werden hohe Differenzen stärker gewichtet.

simulated annealing Verfeinerungsalgorithmus in CNS, bei dem im Rahmen einer Moleküldynamikrechnung die Temperatur des Systems virtuell erhöht wird, um so den Konvergenzradius der Verfeinerung zu verbessern.

test set Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der nur zur Berechnung von R_{free} benutzt und nicht zur Verfeinerung herangezogen wird (in der Regel ca. 5-10% der gemessenen Strukturfaktoramplituden).

Vollständigkeit Prozentualer Anteil der gemessenen unabhängigen Reflexe im Vergleich zur Anzahl der theoretisch möglichen Strukturfaktoren.

working set Strukturfaktoren, die nicht zum *test set* gehören und zur Verfeinerung benutzt werden (90-95% der gemessenen Strukturfaktoramplituden).

Unabhängige Reflexe Anzahl der unabhängigen Reflexe bzw. Strukturfaktoramplituden, die nicht über eine kristallographische Symmetrie verknüpft sind.

7.4 Kristallographiedaten

Trypsinstrukturdaten

	Trypsin Lig1	Trypsin Lig2	Trypsin Lig3	Trypsin Lig5
PDB-Zugriffscodes	1Y3U	1Y3V	1Y3W	1Y3Y
Statistik zur Datensammlung				
Temperatur (K)	298	298	298	103
Anzahl der Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.5418	1.5418	1.5418
Auflösungsbereich (Å)	100.0 - 1.8	47.0 - 1.6	46.7 - 1.8	50.0 - 1.75
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3 ₁ 2 ₁
Einheitszelle (Å)	a = 63.3 b = 69.4 c = 63.9	a = 63.2 b = 69.2 c = 64.0	a = 63.1 b = 69.3 c = 64.0	a = b = 54.9 c = 109.2
Gemessene Reflexe	139348	97364	74197	64363
Unabhängige Reflexe	25191	37652	26785	18963
Vollständigkeit (%)	94.1 [88.6]	98.8 [98.8]	99.2 [97.2]	97.1 [94.0]
Durchschnitt von I/σ	22.4 [4.4]	11.9 [1]	6.0 [1]	7.7 [1.9]
R _{sym} (%)	7.5 [39.9]	3.7 [43.3]	9.0 [61.1]	10.0 [45.0]
Verfeinertes Modell				
Anzahl der verfeinerten Proteinreste	223	223	223	223
Anzahl der verfeinerten Ligandenatome	44	34	33	22
Anzahl der verfeinerten Wassermoleküle	115	120	107	111
Auflösung des verfeinerten Modells (Å)	8.0 - 1.8	10.0 - 1.6	8.0 - 1.8	10.0 - 1.75
R _{cryst} (F _o > 4σ F _o ; F _o)	15.2	16.0	18.2	16.3
R _{free} (F _o > 4σ F _o ; F _o)	20.1	19.3	23.8	19.9
Rmsd Bindungslänge (Å)	0.008	0.010	0.007	0.007
Rmsd Bindungswinkel (°)	2.1	2.2	2.1	2.1

Durchschnittlicher B-Wert	21.6	22.7	21.4	18.5
Protein (\AA^2)				
Hauptkette (\AA^2)	18.0	18.9	17.7	14.7
Seitenkette (\AA^2)	23.8	24.9	23.6	20.9
Ligand (\AA^2)	36.2	37.1	42.3	42.0
Wasser (\AA^2)	30.8	32.8	31.6	27.4
Ramachendran plot				
Bevorzugt (%)	86.7	88.3	85.6	88.3
Zusätzlich erlaubt (%)	13.3	11.7	14.4	11.7
Allgemein erlaubt (%)	0.0	0.0	0.0	0.0
Nicht erlaubt (%)	0.0	0.0	0.0	0.0

Angaben in [] beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale.

	Trypsin Lig6	Trypsin Lig7
PDB-Zugriffscodes	1Y3X	1YP9
Statistik zur Datensammlung		
Temperatur (K)	298	103
Anzahl der Kristalle	1	1
Wellenlänge (\AA)	1.5418	1.5418
Auflösungsbereich (\AA)	47.0 - 1.7	40.0 - 2.1
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle (\AA , °)	a = 63.3 b = 69.3 c = 63.9	a = 61.2 b = 63.5 c = 69.3
Gemessene Reflexe	69771	82675
Unabhängige Reflexe	31574	13949
Vollständigkeit (%)	93.6 [63.7]	99.2 [99.9]
Durchschnitt von I/ σ	7.4 [1]	18.0 [4.1]
R _{sym} (%)	5.8 [22.9]	8.0 [34.5]
Verfeinertes Modell		
Anzahl der verfeinerten	223	223
Proteinreste		
Anzahl der verfeinerten	33	31
Ligandenatome		

Anzahl der verfeinerten Wassermoleküle	150	145
Auflösung des verfeinerten Modells (Å)	8.0 - 1.7	10.0 - 2.1
R _{cryst} (F _o > 4σ F _o ; F _o)	15.2	17.4
R _{free} (F _o > 4σ F _o ; F _o)	19.2	26.4
Rmsd Bindungslänge (Å)	0.09	0.005
Rmsd Bindungswinkel (°)	2.2	1.8
Durchschnittlicher B-Wert Protein (Å ²)	22.8	21.3
Hauptkette (Å ²)	18.3	16.7
Seitenkette (Å ²)	24.5	20.7
Ligand (Å ²)	37.9	40.1
Wasser (Å ²)	37.2	36.5
Ramachendran plot		
Bevorzugt (%)	87.8	86.7
Zusätzlich erlaubt (%)	12.2	13.3
Allgemein erlaubt (%)	0.0	0.0
Nicht erlaubt (%)	0.0	0.0

Angaben in [] beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale.

Thrombinstrukturdaten

	Thrombin Lig2	Thrombin Lig3	Thrombin Lig6	Thrombin CRC220
PDB-Zugriffscod	1YPG	1YPE	1YPJ	1YPK
Statistik zur Datensammlung				
Temperatur (K)	103	103	103	103
Anzahl der Kristalle	1	1	1	1
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.5418	1.518	1.5418
Auflösungsbereich (Å)	50.0 - 1.8	50.0 - 1.81	50.0 - 1.78	50.0 - 1.78
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2

Einheitszelle (Å, °)	a = 71.0	a = 71.1	a = 70.5	a = 70.9
	b = 71.6	b = 71.4	b = 71.8	b = 71.7
	c = 72.3	c = 72.4	c = 71.3	c = 72.3
	β = 100.6	β = 100.6	β = 99.9	β = 100.9
Gemessene Reflexe	358325	273682	97377	75255
Unabhängige Reflexe	30320	30793	32153	32334
Vollständigkeit (%)	95.2 [94.3]	95.8 [93.0]	99.1 [98.0]	96.9 [97.4]
Durchschnitt von I/σ	15.1 [2.6]	18.4 [8.0]	12.5 [2.9]	6.0 [4.2]
R_{sym} (%)	6.7 [32.4]	7.1 [17.7]	7.6 [33.2]	5.0 [25.4]
Verfeinertes Modell				
Anzahl der verfeinerten	277	277	279	277
Proteinreste				
Anzahl der verfeinerten	34	33	33	42
Ligandenatome				
Anzahl der verfeinerten	197	212	182	224
Wassermoleküle				
Auflösung des verfeinerten	10.0 – 1.80	10.0 – 1.81	10.0 – 1.78	10.0 – 1.78
Modells (Å)				
R_{cryst} ($F_o > 4\sigma F_o$; F_o)	18.4	17.3	19.5	18.1
R_{free} ($F_o > 4\sigma F_o$; F_o)	24.8	23.5	25.6	23.9
Rmsd Bindungslänge (Å)	0.07	0.017	0.017	0.023
Rmsd Bindungswinkel (°)	2.9	2.0	2.0	2.1
Durchschnittlicher B-Wert				
Protein (Å ²)	27.2	19.6	31.7	24.4
Hauptkette (Å ²)	24.3	16.6	29.2	21.5
Seitenkette (Å ²)	30.2	22.5	34.2	27.3
Ligand (Å ²)	36.1	18.3	29.4	20.1
Wasser (Å ²)	33.3	34.8	36.3	31.3
Ramachendran plot				
Bevorzugt (%)	84.0	86.4	86.1	85.2
Zusätzlich erlaubt (%)	16.0	13.2	13.9	14.4
Allgemein erlaubt (%)	0.0	0.4	0.0	0.4
Nicht erlaubt (%)	0.0	0.0	0.0	0.0

Angaben in [] beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale.

	Thrombin RA-1008	Thrombin RA-1014
PDB-Zugriffscod	1YPL	1YPM
Statistik zur Datensammlung		
Temperatur (K)	103	103
Anzahl der Kristalle	1	1
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.5418
Auflösungsbereich (Å)	50.0 - 1.85	50.0 - 1.85
Raumgruppe	C2	C2
Einheitszelle (Å, °)	a = 71.1	a = 69.7
	b = 71.6	b = 71.7
	c = 72.2	c = 71.3
	β = 100.4	β = 99.7
Gemessene Reflexe	87351	64512
Unabhängige Reflexe	28802	27275
Vollständigkeit (%)	99.4 [99.9]	94.9 [91.6]
Durchschnitt von I/σ	9.7 [2.7]	15.7 [3.2]
R_{sym} (%)	9.9 [44.4]	5.3 [31.5]
Verfeinertes Modell		
Anzahl der verfeinerten Proteinreste	277	277
Anzahl der verfeinerten Ligandenatome	34	34
Anzahl der verfeinerten Wassermoleküle	191	155
Auflösung des verfeinerten Modells (Å)	10.0 – 1.85	10.0 – 1.85
R_{cryst} ($F_o > 4\sigma F_o; F_o$)	19.5	19.1
R_{free} ($F_o > 4\sigma F_o; F_o$)	26.3	26.0
Rmsd Bindungslänge (Å)	0.017	0.017
Rmsd Bindungswinkel (°)	2.2	1.9
Durchschnittlicher B-Wert Protein (Å ²)	26.4	30.6

Hauptkette (\AA^2)	23.6	27.5
Seitenkette (\AA^2)	29.2	33.6
Ligand (\AA^2)	27.5	46.1
Wasser (\AA^2)	32.3	33.4
Ramachendran plot		
Bevorzugt (%)	85.6	87.2
Zusätzlich erlaubt (%)	14.4	12.3
Allgemein erlaubt (%)	0.0	0.4
Nicht erlaubt (%)	0.0	0.0

Angaben in [] beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale.

Dankschön

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. *Gerhard Klebe* für das interessante Thema, seine stete Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung der vielen Reisenbedanken, wodurch ich die Möglichkeit hatte viel zu lernen. Vor allem die große Freiheit bei der Arbeit und die wertvollen Anregungen habe zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Dr. *Christoph Sotriffer* danke ich für die exzellente Einführung in das Gebiet des Dockings, seine stete Hilfsbereitschaft und die hilfreichen Diskussionen.

Hans-Dieter Gerber danke ich für die Unterstützung im Labor und den Versuch meine Enantiomere zu trennen.

Bernhard Stengl danke ich für die nette Zeit mit ihm als Bürokollege und seine stets aufmunternden Worte, wenn gerade mal wieder kein Ligand in der Bindetasche war.

Dr. *Andreas Heine* danke ich für die Hilfe bei allem, was mit der Röntgenkristallographie zu tun hat, die unendliche Geduld mit all meinen Fragen und vor allem auch die Unterstützung bei der Vorbereitung auf meine Bewerbungsgespräche.

Dr. *Holger Gohlke* danke ich für die schnelle Hilfe bei der Berechnung der Connolly-Oberfläche.

Christian Sohn danke ich für die Wartung der technischen Geräte in der Arbeitsgruppe und bereitwillige Hilfe beim Abtauen eines Kühlschranks – auch wenn dieser dabei dran glauben musste.

Angela Scholz gilt mein Dank für die immerwährende freundliche Hilfe mit allen bürokratischen Angelegenheiten und vielen netten Plauderein.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft, die mir oft bei der Anfertigung dieser Arbeit weitergeholfen haben.

Prof. Dr. *Francois Diederich* danke ich für die Ermöglichung eines Aufenthaltes in seinem Labor an der ETH Zürich und die hilfreichen Diskussionen. Dr. *Jacob Olsen* und *Kaspar Schaerer* danke für die Unterstützung bei der Synthese und die vielen hilfreichen Hinweise

während dieser Zeit. Der gesamten Gruppe möchte ich für die schöne Zeit in Zürich und die nette Aufnahme in der Gruppe danken.

Dr. *Ulrike Obst-Sander*, Dr. *David Banner*, Dr. *Manfred Kansy* und Herrn *Björn Wagner* von der *Hoffmann-LaRoche AG* danke ich für die Hilfe bei diversen Fragen zur Synthese, zur Kristallisation von Thrombin und für die Bestimmung der pK_a -Werte, nachdem unsere Geräte den Geist aufgegeben hatten.

Mein Dank gilt auch Dr. *Jörg Stürzebecher* und *Gabi Riesner* für die Unterstützung bei der Thrombin-Aufreinigung und die Hilfe bei dem Enantiomerenproblem. Außerdem möchte ich mich bei Dr. *Jörg Stürzebecher* und *Gabi Riesner* für die interessanten und lehrreichen Stadtführungen durch Erfurt und eine Reise durch die deutsche Geschichte bedanken.

Prof. Dr. *Wolfram Bode* und Dr. *Rainer Friedrich* waren eine große Hilfe bei der Kristallisation von Thrombin. Allen aus der Gruppe, die mich zum Cocktail-Abend nach München geschleppt haben, möchte ich nochmals für diesen schönen Abend danken.

Ich danke meiner Vertieferin *Marion Stricker*, die mich bei der Synthese unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt *Michael Fokkens*, PD. Dr. *Klaus Reuter*, Dr. *Andreas Heine*, *Bernhard Stengl* und Dr. *Christoph Sottriffer* für die sorgfältige und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern der analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie für die Messung der NMR-Spektren, für die Anfertigung der Massenspektren sowie der Elementaranalysen.

Außerdem möchte ich noch allen meinen Freunden für ihre Unterstützung und die aufmunternde Abwechslung während der ganzen Zeit danke. Hierbei möchte ich vor allem *Edgar Specker*, *Silvia Specker* und *Tanja Sgraja* für die vielen schönen Spieleabende und die oft sehr unterhaltsamen Cocktailabende danken.

Meinem Mann *Michael Fokkens* gilt ein besonders herzliches Dankeschön für seine Engelsgeduld und für die vielen, schönen Stunden in Marburg. Das Gelingen dieser Arbeit ist

auch sein Verdienst, da er nie aufgehört hat, an mich zu glauben, mir immer Mut gemacht hat und mir durch viele wertvolle Anregungen immer wieder weitergeholfen hat.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal bei *meiner Mutter, Ralf* und *meinem Bruder* dafür bedanken, dass sie mich immer unterstützt haben und mir immer starken Rückhalt gegeben habe.

Dem Graduiertenkolleg *Proteinfunktion auf atomarer Ebene* danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Mikrokalorimetrische Studien zum Verständnis der thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften von Inhibitoren der Blutgerinnungskaskade

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 15. April 2005

(Jasmine Fokkens)

10. Dezember 1976: Geboren in Dortmund.
- Sept. 1982 – Juli 1986: Schiller-Grundschule, Wiesloch
- Sept. 1986 – Juni 1996: Gymnasium Wiesloch
- Sept. 1996: Praktikum bei Boehringer Mannheim, Isolierung von Naturstoffen aus marinen Lebewesen und Pilzen.
- Okt. 1996 – Sept. 2001: Chemiestudium an der Universität Karlsruhe (TH).
- März 1998: Praktikum bei Heidelberger Baustoffchemie, Leimen, Analytische Tätigkeit.
- Juli – Okt. 1999: Praktikum bei Novartis, Horsham, England, Synthese neuer Asthmamedikamente (Vertiefungsarbeit).
- März – April 2000: Bayer AG, Leverkusen, Angestellt in der Zentralen Forschung.
- Ab Feb. 2001: Beginn mit der Diplomarbeit in der Organischen Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Giannis zum Thema *Beiträge zur Synthese von neuen Ovalicin-Analoga*.
- Nov. 2001 - Mai 2005 Promotion an der Universität Marburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Klebe mit dem Titel *Mikrokalorimetrische Studien zum Verständnis der thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften von Inhibitoren der Blutgerinnungskaskade*.