

**Strukturelle und physikochemische Charakterisierung  
der Protein-Ligand-Wechselwirkung  
am Beispiel  
der Serinproteasen Thrombin und Trypsin**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**Frank Dullweber**  
aus Osterholz-Scharmbeck

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 28.6.2000 angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.2000

Erstgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Fahr

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

### **Aufsätze**

**G. Klebe, M. Böhm, F. Dullweber, U. Grädler, H. Gohlke, M. Hendlich**

Structural and Energetic Aspects of Protein-Ligand Binding in Drug Design In „*Molecular Modelling and Prediction of Bioactivity*“, Eds. K. Gundertofte and F. Jorgensen, KLUWER Academic/Plenum Publ., New York, 2000, Seiten 103-110

**F. Dullweber, F.W. Sevenich & G. Klebe**

Determination of Accurate Thermodynamics of Binding for Proteinase-Inhibitor Interactions In „*Molecular Modelling and Prediction of Bioactivity*“, Eds. K. Gundertofte and F. Jorgensen, KLUWER Academic/Plenum Publ., New York, 2000, Seiten 495-496

**G. Klebe, F. Dullweber, H.J. Böhm**

Thermodynamic Models of Drug-Receptor Interactions: A General Introduction In „*Thermodynamics and Drug-Receptor Interactions*“ Ed. R. Raffa, John Wiley & Sons, New York, 2000, in press

### **Tagungsbeiträge**

**F. Dullweber**

Thermodynamic Studies of Serineproteinase-Inhibitor Interactions, 16<sup>th</sup> Winter School on Proteinases and Their Inhibitors-Recent Developments, Tiers, Italien, März 1998

F. Dullweber, F.W. Sevenich, G. Klebe

**Determination of Accurate Thermodynamics of Binding for Proteinase-Inhibitor Interactions**, 12<sup>th</sup> European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships, Kopenhagen, Dänemark, August 1998

**F. Dullweber, G. Klebe**

Structural and Physico-chemical Characterization of the Ligand Binding Process, Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Freiburg, März 1999

**F. Dullweber, G. Klebe**

Structural and Physicochemical Characterization of the Ligand Binding Process, *International Workshop – Virtual Screening*, Rauischholzhausen, März 1999

**F. Dullweber, G. Klebe**

Structural and Physico-chemical Characterization of the Ligand Binding Process, 2<sup>nd</sup> International Conference on Applications of Biocalorimetry, Halle (Saale), März 1999

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	Voraussetzungen für die Bindung eines Liganden an ein Protein .....	4
1.2	Treibende Kraft des Bindungsvorgangs.....	5
1.3	Problemstellung der Arbeit .....	7
<b>2</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>9</b>
2.1	Serinproteasen .....	9
2.1.1	Biologische Rolle von Trypsin .....	10
2.1.2	Die biologische Funktion von Thrombin.....	11
2.1.3	Katalysemechanismus der Serinproteasen.....	17
2.1.4	Struktur von Thrombin und Trypsin.....	18
2.1.5	Thrombin- und Trypsininhibitoren .....	22
2.2	Röntgenstrukturanalyse.....	27
2.2.1	Kristalle .....	28
2.2.2	Proteinkristallisation.....	29
2.2.3	Datenaufnahme .....	31
2.2.4	Datenanalyse.....	34
2.2.5	Interpretation der Ergebnisse.....	37
2.3	Titrationsskalorimetrie.....	40
2.3.1	Beschreibung des Gerätes.....	41
2.3.2	Bindungssimulation.....	43
2.3.3	Durchführung der Messungen .....	47
2.3.4	Datenanalyse.....	50
2.3.5	Ionisierungsreaktionen.....	55

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
3.1	Datensatz und Inhibitionskonstanten .....	58
3.2	Ionisierungsgleichgewichte und pK <sub>a</sub> -Messungen .....	64
3.3	Kristallstrukturen .....	68
3.3.1	Bindungsmodus der Inhibitoren <b>1b</b> , <b>1cMe</b> , <b>1d</b> und <b>1dAc</b> .....	69
3.3.2	Bindungsmodus des Inhibitors <b>3</b> (CRC 220).....	73
3.3.3	Bindungsmodus des Inhibitors <b>4</b> (Inogatran) .....	75
3.3.4	Bindungsmodus des Inhibitors <b>5</b> (Melagatran).....	77
3.3.5	Bindungsmodus des Inhibitors <b>2</b> (Napsagatran) im Komplex mit Thrombin.....	78
3.4	Thermodynamische Messungen.....	81
3.4.1	Bestimmung der Bindungskonstanten K .....	81
3.4.2	Änderung der Protonierungszustände während der Bindung .....	84
3.4.2.1	Messungen in Pyrophosphatpuffer .....	84
3.4.2.2	Korrektur des Pufferbeitrages.....	86
3.4.2.3	Korrektur der Ionisierung von funktionellen Gruppen.....	92
3.4.2.4	Berücksichtigung der Korrekturterme .....	93
3.4.3	Abhängigkeit der Enthalpie von den eingesetzten Salzen.....	98
3.4.4	Wärmekapazitäten und Oberflächen.....	101
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>105</b>
4.1	Veränderungen in der Protonierung .....	105
4.2	Enthalpische und entropische Beiträge .....	113
4.3	Natriumabhängigkeit der Thrombinbindung .....	119
4.4	Wärmekapazitätsänderungen .....	123
4.4.1	Einführung.....	123
4.4.2	Wasser und Oberflächen.....	123
4.4.3	Oberflächen und Wärmekapazitätsänderungen .....	124
4.4.4	Thrombin- und Trypsinbindungen.....	126
4.4.5	Abhängigkeit der Wärmekapazitätsänderung von zugesetzten Alkaliionen .....	130

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>140</b>
6.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen .....	140
6.2	Proteinreinigung.....	141
6.2.1	Herstellung der Affinitätsäule.....	141
6.2.2	Reinigung von Thrombin.....	142
6.3	Aktivitätsbestimmung .....	143
6.4	Inhibitor Datensatz.....	145
6.5	Messung der Inhibitionskonstanten $K_i$ .....	147
6.6	Kristallisation .....	149
6.6.1	Kristallisation von Trypsinkomplexen durch „Soaking“ .....	149
6.6.2	Kokristallisation von Trypsinkomplexen .....	151
6.7	Röntgenstrukturanalyse.....	153
6.8	Kalorimetrische Messungen.....	157
6.9	Potentiometrische Messungen.....	163
6.10	Berechnung der Oberflächen .....	164
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>165</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Voraussetzungen für die Bindung eines Liganden an ein Protein

Ein Wirkstoff muß, um als Arzneimittel seine Wirkung zu entfalten, im Körper an ein ganz bestimmtes Zielmolekül, beispielsweise ein Protein, binden. Die wichtigste Voraussetzung für die Bindung ist zunächst, daß der Wirkstoff die richtige Größe und Gestalt aufweist, um optimal in die Protein-Bindetasche hineinzupassen. Diese Bedingung läßt sich mit dem Schlüssel-Schloß-Prinzip nach Fischer erklären (Fischer, 1894). Darüber hinaus ist es aber auch notwendig, daß die Oberflächeneigenschaften von Ligand und Protein zueinanderpassen, damit sich spezifische Wechselwirkungen ausbilden können.

Die Bindung eines Liganden an ein Protein läßt sich messen. Man erhält als charakteristische Größe die Bindungskonstante  $K$ . Sie beschreibt die Stärke der Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand.  $K$  ist eine thermodynamische Gleichgewichtskonstante, die angibt, welcher Anteil des Liganden  $L$  an das Protein  $P$  gebunden ist:

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (\text{Gleichung 1.1})$$

Allerdings gilt die Formulierung des Massenwirkungsgesetzes nur unter der Annahme, daß die Gleichgewichtsthermodynamik anzuwenden ist. Ist das noch für biophysikalische *in-vitro* Messungen, die unter vereinfachten Bedingungen durchgeführt werden, gegeben, so müssen bei offenen biologischen Systemen (*in vivo*) zusätzliche Effekte wie Fließgleichgewichte und Konzentrationsgradienten mit in die Betrachtung einbezogen werden. Die Bedingungen der Gleichgewichtsthermodynamik sind hier („*in vivo*“) praktisch nicht gegeben.

Statt der Bindungskonstanten wird häufig die Freie Enthalpie  $\Delta G$  angegeben, die sich wiederum aus einem enthalpischen ( $\Delta H$ ) und entropischen Bindungsanteil ( $-T\Delta S$ ) zusammensetzt.

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Gleichung 1.2})$$

Die Wechselwirkung zwischen einer niedermolekularen Verbindung und einem Protein beruht in der Regel auf nichtkovalenten Wechselwirkungen. Häufig auftretende Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, Metallkomplexierungen, hydrophobe Kontakte oder Wechselwirkungen eines Kations mit den  $\pi$ -Elektronen eines ungesättigten Systems (Böhm & Klebe, 1996). Setzt man voraus, daß die Distanz einer Wechselwirkung mit ihrer Stärke korreliert, lassen sich Beiträge der genannten Effekte aus einer hochaufgelösten Kristallstruktur eines Protein-Ligand-Komplexes herauslesen, beispielsweise über die Länge von H-Brücken. Neben diesen mehr von der statischen Geometrie des Komplexes bestimmten Größen spielen Effekte wie die Solvation bzw. Desolvation, das Einfrieren von Bewegungsfreiheitsgraden und die Verdrängung von Wassermolekülen eine entscheidende Rolle für den Bindungsprozeß. Die genannten Bindungsbeiträge können enthalpischer und entropischer Natur sein. Erstere haben etwas mit der Bilanz der ausgebildeten Wechselwirkungen zu tun, letztere beschreiben Änderungen im Ordnungsgrad bzw. der Verteilung von Energiebeiträgen über molekulare Freiheitsgrade. Der entropische Beitrag zur Protein-Ligand-Wechselwirkung beruht also nicht auf direkten Wechselwirkungen, sondern er rührt daher, daß sich für das System Protein-Ligand-Wasser die Zahl der Freiheitsgrade durch die Assoziation des Liganden an das Protein ändert. Die Praxis hat nun gezeigt, daß das Zusammenspiel beider Beiträge, Enthalpie und Entropie, die Bindungsaffinität bestimmt.

## 1.2 Treibende Kraft des Bindungsvorgangs

Zum Verständnis der treibenden Kraft eines Bindungsprozesses und zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten müssen die enthalpische und entropische Komponente bekannt sein. Auch ist das Verhältnis beider Beiträge für die Planung einer Strukturoptimierung wichtig.



Enthalpische Beiträge können zum Beispiel durch die Verstärkung einer Wasserstoffbrücke gesteigert werden. Dies kann beispielsweise durch Einführen elektronenziehender Reste in einem Liganden erreicht werden. Eine entropisch bestimmte Bindung läßt sich durch Einfrieren von Rotationsfreiheitsgraden oder durch Verdrängen von Wassermolekülen von der Proteinoberfläche durch Liganden mit vergrößerter lipophiler Oberfläche ändern. Beide Konzepte wären denkbare Strategien für eine Leitstrukturoptimierung. Welcher Weg dabei der aussichtsreichere ist, kann nur entschieden werden, wenn die treibende Kraft des Bindungsprozesses bekannt ist.

Durch mikrokalorimetrische Messungen lassen sich enthalpische und entropische Bindungsbeiträge bestimmen. Leider liegen bis heute nur wenige dieser wichtigen Messungen an strukturell charakterisierten Protein-Ligand-Komplexen vor. Trotzdem erlauben die erhobenen Daten einige Schlußfolgerungen. Als wichtigstes Resultat zeigen alle Studien, daß es keine Korrelationen zwischen der Bindungsenthalpie  $\Delta H$  und der Freien Bindungsenthalpie  $\Delta G$  gibt.

Für ein besseres Verständnis und auch für die Vorhersage der Ligandenbindung ist eine Aufteilung der Freien Bindungsenthalpie in physikalisch interpretierbare Einzelbeiträge wünschenswert. Dies würde den Wirkstoffchemiker in die Lage versetzen, seine Leitstruktur gezielt zu verändern, damit dessen Affinität zum Rezeptorprotein ansteigt.

Gründe für die teilweise unbefriedigende Beschreibung der Ligandenbindung liegen in der unvollkommen verstandenen Aufteilung der enthalpischen und entropischen Bindungsbeiträge. Der Protonierungszustand vieler Liganden läßt sich nicht festlegen, da bis heute keine zuverlässigen und schnellen Rechenverfahren zum Abschätzen dieser Größen existieren. Die Abschätzung der Solvatationsbeiträge verlangen eine bessere Beschreibung der Lipophilie, die bei geladenen z.B. heterocyclischen oder peptidischen Liganden nur sehr unvollkommen gelingt. An dieser Stelle kann nur experimentelles Datenmaterial weiterhelfen.

Zum besseren Verständnis fehlen experimentelle Daten über enthalpische und entropische Bindungsbeiträge, molekulare Lipophilien und genaue  $pK_a$ -Werte.

In der Literatur sind nur wenige Arbeiten beschrieben worden, in denen parallel zu den Strukturbestimmungen von Protein-Ligand-Komplexen mikrokalorimetrische Bestimmungen der Komplexbildung durchgeführt wurden (Davies *et al.*, 1999; Sleight *et al.*, 1999). Sehr überraschende Effekte wurden registriert, die anhand der Strukturbestimmungen nicht verstanden werden (Connelly, 1994). Messungen von  $pK_a$ -Werten innerhalb einer kongeneren Verbindungsreihe lassen überraschend auftretende Affinitätssprünge verstehen, da z.B. eine geladene Verbindung unter Umständen erheblich fester als eine ungeladene Spezies binden kann.

### 1.3 Problemstellung der Arbeit

Wie die einleitenden Erläuterungen zeigen, hilft die reine Ermittlung thermodynamischer Größen kaum, den Bindungsvorgang in einem einzelnen Protein-Ligand-Komplex besser zu verstehen. Erst die gleichzeitige Bestimmung der Struktur des untersuchten Komplexes ermöglicht eine strukturbezogene Interpretation der thermodynamischen Daten. Daher sollten Untersuchungen angegangen werden, bei denen stets neben der physikochemischen Charakterisierung auch die kristallographische Strukturbestimmung durchgeführt wurde.

Wir haben uns für die Serinproteasen Trypsin und Thrombin als Untersuchungssystem entschieden, da zahlreiche strukturell unterschiedliche Liganden bekannt sind. Die Palette der Bindungsaffinitäten erstreckt sich über mehrere Größenordnungen. Es sind sowohl Liganden bekannt, die kaum Selektivitätsunterschiede für die genannten Proteine aufweisen, andere dagegen besitzen bei kleinen Strukturänderungen deutlich unterschiedliche Affinitäten. Für viele dieser Liganden sind die Bindungsgeometrien bereits aufgeklärt. Fehlende Kristallstrukturen wurden in dieser Arbeit bestimmt.

Die vorliegenden Strukturdaten unterschiedlicher Thrombin- bzw. Trypsinkomplexe lassen auf relativ rigide Enzyme schließen. Dies wird die strukturbezogene Interpretation thermodynamischer Daten erleichtern, da vermutlich ein „*induced-fit*“ des Enzyms bei der Ligandenbindung nicht in Betracht gezogen werden muß.

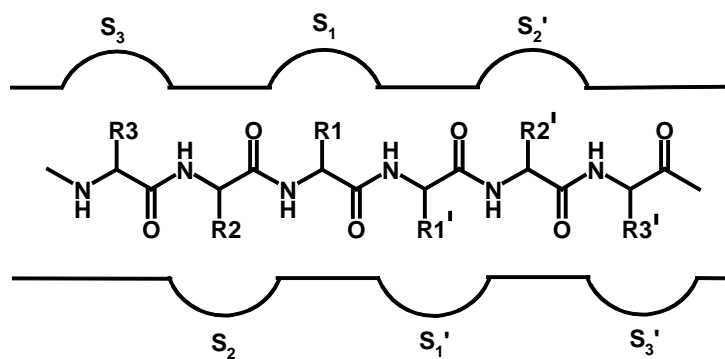
An den Protein-Ligand-Komplexen der Serinproteasen Trypsin und Thrombin sollen mikrokalorimetrische und physikochemische Eigenschaftsbestimmungen Antworten auf folgende Fragen geben:

- 1) Welche Änderungen in der Enthalpie und Entropie ergeben sich innerhalb einer Ligandenreihe, die sich graduell unterscheiden?
- 2) Wie setzen sich enthalpische und entropische Bindungsbeiträge für Liganden zusammen, die Affinität zu unterschiedlichen Proteinen zeigen?
- 3) Wie können die Erkenntnisse für das Wirkstoffdesign verwendet werden? Wie schon angedeutet worden ist, sollen die experimentell erhobenen Daten in die Entwicklung und Verbesserung der Computermethoden zum Design neuer Liganden zurückfließen. Es ist zu hoffen, daß dadurch der Bindungsprozeß zum einen phänomenologisch besser verstanden wird, zum anderen die Software eine höhere Vorhersagewahrscheinlichkeit bekommt.

## 2 EINFÜHRUNG

### 2.1 Serinproteasen

Proteasen spalten Polypeptidketten an deren amidischen Bindungen, zum Beispiel beim enzymatischen Abbau oder bei der Aktivierung eines Proteins oder Peptides aus seiner inaktiven Vorgängerform (Zymogen). Die Spaltung findet bei den Proteasen in einem aktiven Zentrum statt. Um ein Substrat spezifisch erkennen zu können, weisen Enzyme allgemein an ihrer Oberfläche mehrere Bindungstaschen auf, die strukturell komplementär zu den Seitenketten des Substrates sind. Die Nomenklatur zur Beschreibung der Bindungstaschen des Enzyms und der entsprechenden Seitenketten des Substrates wurde von Schechter & Berger (1967) beschrieben. Die Positionen der Aminosäuren werden mit  $P_3$ ,  $P_2$ ,  $P_1$ ,  $P_1'$ ,  $P_2'$ ,  $P_3'$  usw. bezeichnet, wobei  $P_1$  die Aminosäure unmittelbar vor der Spaltstelle und  $P_1'$  die Aminosäure unmittelbar nach der Spaltstelle ist. Die Bindungstaschen werden analog mit dem Buchstaben „S“ bezeichnet. So gehört zum Beispiel die Tasche  $S_1$  zur Aminosäureseitenkette  $P_1$ .



**Abbildung 2.1:** Nomenklatur eines Enzymsubstrates. Die  $P_3$ ,  $P_2$ ,  $P_1$ -Aminosäuren mit den Seitenketten  $R_3$ ,  $R_2$  und  $R_1$  befinden sich auf der N-terminalen Seite vor der Spaltstelle, die  $P_1'$ ,  $P_2'$ ,  $P_3'$ -Aminosäuren mit den Seitenketten  $R_1'$ ,  $R_2'$  und  $R_3'$  auf der C-terminalen Seite. Die Bindetaschen werden entsprechend mit dem Buchstaben „S“ bezeichnet.

Eine der am besten untersuchten Klassen von Proteasen sind Serinproteasen. Neben den Verdauungsenzymen Chymotrypsin, Trypsin und Elastase gehören die meisten Proteasen der Blutgerinnungskaskade dieser Enzymklasse an. Während die Verdauungsenzyme verständlicherweise eine große Bandbreite von Peptiden und Proteinen spalten können, wirken andere Serinproteasen wie Thrombin als Enzym in der Gerinnungskaskade hoch spezifisch.

Den Serinproteasen ist ein gleicher Katalysemechanismus gemeinsam, der sie von anderen Proteaseklassen wie Aspartyl-, Cystein- oder Metalloproteasen unterscheidet. Beim katalytischen Mechanismus der Serinproteasen spielt ein nucleophil aktiviertes Sauerstoffatom der Serinseitenkette eine entscheidende Rolle, daher auch der Name dieser Enzymklasse.

Das Verdauungsenzym Chymotrypsin war 1976 die erste Serinprotease, deren 3D-Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse durch David Blow (Cambridge, England) aufgeklärt wurde. Ein weiterer Meilenstein in der Erforschung der Serinproteasen war die Aufklärung der 3D-Struktur von Thrombin im Jahr 1989 am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durch Wolfram Bode (Bode *et al.*, 1989). Die Thrombinstrukturbestimmung in Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor PPACK (D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl) gab Anlaß zur intensiven Suche nach neuen Thrombinhemmstoffen durch viele industrielle Arbeitsgruppen. Etliche Gruppen wählten NAPAP (N<sup>α</sup>-(Naphthylsulfonylglycyl)-D,L-amidinophenylalanin-piperid) (Stürzebecher *et al.*, 1984), dessen Komplexstruktur mit Thrombin kurz danach aufgeklärt wurde, als Ausgangspunkt (Bode *et al.*, 1990).

### **2.1.1 Biologische Rolle von Trypsin**

Trypsin ist neben Chymotrypsin und Elastase ein Verdauungsenzym, das im Bereich des Dünndarms Proteine hydrolytisch spaltet. Die Verdauungsenzyme werden als Zymogene (inaktive Vorstufen) im Pankreas synthetisiert, der eines der aktivsten Organe ist, was die Proteinsynthese angeht. Gebildet werden die Zymogene des Pankreas in den Acinuszellen.

Bei Stimulation dieser Zellen durch ein Hormonsignal oder einen Nervenimpuls werden die Zymogene in einen Gang sezerniert, der zum Duodenum (Zwölffingerdarm) führt.

### **Wie wird Trypsinogen aktiviert?**

Zellen des Duodenums sezernieren das Enzym Enteropeptidase, das Trypsinogen, sobald es aus dem Pankreas ins Duodenum übertritt, durch Spaltung einer Peptidbindung in das aktive Trypsin überführt. Diese kleine Menge an gebildetem Trypsin aktiviert dann weiteres Trypsinogen. Trypsin wirkt weiterhin als gemeinsamer Aktivator der Zymogene Chymotrypsinogen, Proelastase und Procarboxypeptidase. Da jede Protease nur bestimmte Stellen im Protein spaltet, bedarf es der gemeinsamen Einwirkung mehrerer verschiedener Enzyme bei der Proteinverdauung. So zeigt sich bei Vergleich der  $S_1$ -Taschen von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase, daß Trypsin bevorzugt eine Peptidbindung nach Argininen bzw. Lysin spaltet, während die Bindungstaschen benachbart der Spaltstellen von Chymotrypsin bzw. Elastase auf große bzw. kleine lipophile Seitenketten zugeschnitten sind.

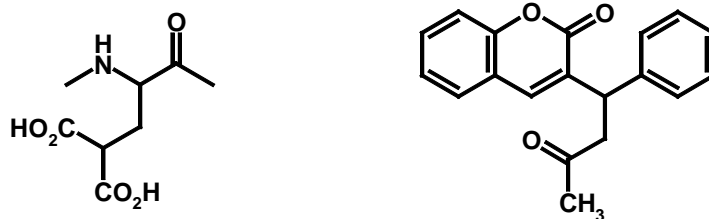
Die Aktivierung eines Zymogens in eine aktive Protease ist ein genau geregelter Prozeß des Organismus. Diese Aktivierung ist jedoch irreversibel. Deshalb beruht die spätere Deaktivierung der aktivierten Proteasen auf den Eingriff spezifischer endogener Proteaseinhibitoren. Im Falle von Trypsin bewirkt dies zum Beispiel der Pankreas-Trypsin-inhibitor, der mit Trypsin einen starken Komplex mit einer Dissoziationskonstante im pikomolaren Bereich bildet. Ein anderer endogener Proteaseinhibitor, das  $\alpha_1$ -Antitrypsin, schützt das Gewebe vor der Verdauung durch die Elastase.

### **2.1.2 Die biologische Funktion von Thrombin**

Bei einer Verletzung der Blutgefäße muß der Prozeß der Blutstillung (Hämostase) durch hämodynamische Mechanismen und biochemische Vorgänge (Blutgerinnung) schnell eintreten, um den Blutverlust zu begrenzen. Der Verschuß der verletzten Stelle im Gewebe erfolgt zunächst durch Kontraktion der Gefäßmuskeln sowie durch die Bildung eines Thrombus (Thrombogenese). Die Entstehung von Thromben beruht auf zwei miteinander

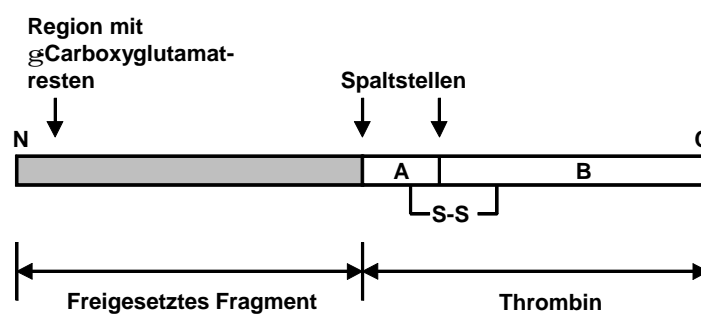
gekoppelten Prozessen: (1.) der sehr schnell erfolgenden Aggregation von Blutplättchen (Thrombozyten) sowie (2.) der Bildung von Fibrin aus Fibrinogen durch Blutgerinnung. In beiden Prozessen spielt das Enzym Thrombin eine entscheidende zentrale Rolle; es ist ein Hauptaktivator der Blutplättchenaggregation und katalysiert die Bildung von unlöslichem Fibrin aus der im Blut gelöst vorliegenden (und oben genannten) Vorstufe Fibrinogen.

Thrombin wird in der Leber als Prothrombin synthetisiert und posttranslational modifiziert. Unter physiologischen Bedingungen bindet das Prothrombin (auch Faktor II genannt) über Calciumionen an negativ geladene Phospholipidmembranen. Seit vielen Jahren weiß man, daß Vitamin K zur Synthese von Prothrombin und von einigen anderen Gerinnungsfaktoren unerlässlich ist. Untersuchungen an abnormalem Prothrombin, das sich nach Verabreichung von Vitamin K Antagonisten bildete, klärten die Wirkungsweise dieses Vitamins auf. Man fand heraus, daß das abnormale Prothrombin nicht mehr in der Lage ist, am aminoterminalen Ende des Enzyms Calciumionen zu binden. Während sowohl das normale als auch das abnormale Thrombin die gleiche Anzahl an Aminosäure besitzen, liegt der Unterschied in den ersten zehn Glutamatresten, die normalerweise vom einem Vitamin K Enzymsystem zu  $\gamma$ -Carboxyglutamaten carboxyliert werden. Die Vitamin K-abhängige Carboxylierung wandelt die Glutamate in den weitaus stärkeren Calcium-Chelator  $\gamma$ -Carboxyglutamat um. Und genau diese Bindung verankert das Prothrombin - durch Calciumionen vermittelt – an die Phospholipidmembran.



**Abbildung 2.2:**  $\gamma$ Carboxyglutamat (links) und der Vitamin K-Antagonist Warfarin (rechts).

Thrombin selbst entsteht durch die Spaltung zweier Peptidbindungen des 66 kDa schweren Zymogens Prothrombin durch den Gerinnungsfaktor Xa, der seinerseits als Verbindungsglied zwischen extrinsischem und intrinsischem Blutgerinnungsreaktionsweg dient, indem das N-terminale 32 kDa Fragment mit den  $\gamma$ -Carboxyglutamatresten abgespalten wird und so das aktive  $\alpha$ -Thrombin freigesetzt und in das Gefäßlumen abgegeben wird. Die A- und B-Ketten des aktiven Thrombins sind über eine Disulfidbrücke verknüpft.

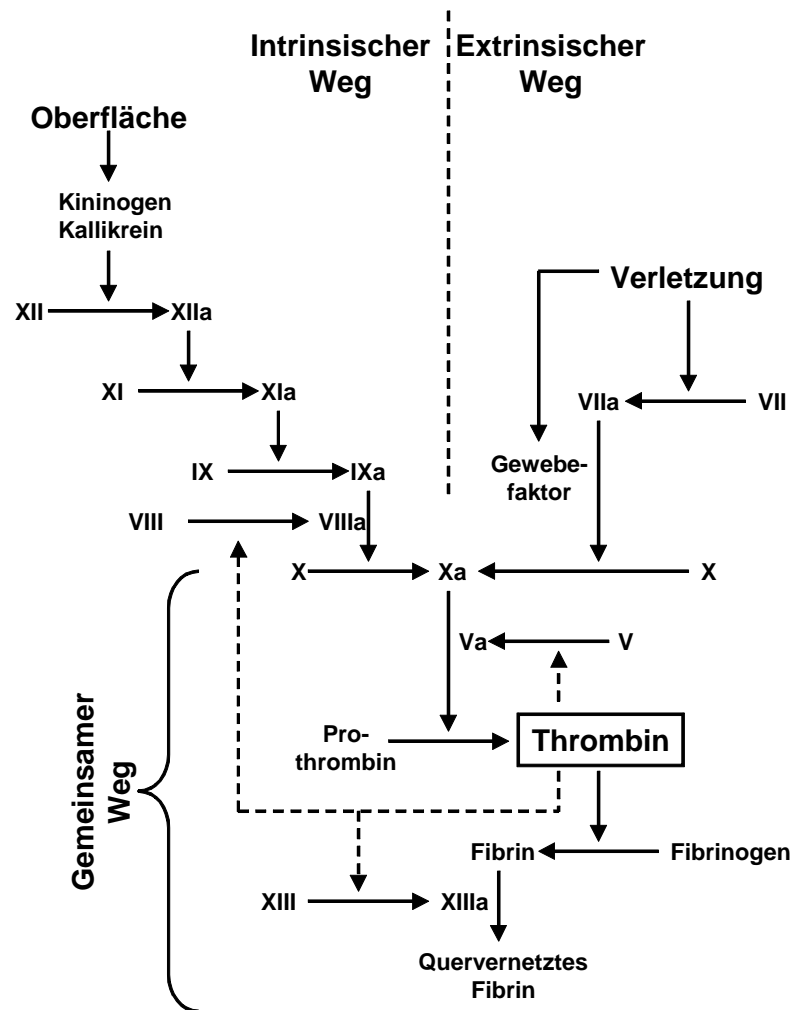


**Abbildung 2.3:** Schematische Struktur von Prothrombin. Die Spaltung von zwei Peptidbindungen ergibt Thrombin. Die A- und B-Ketten des Thrombins sind über eine Disulfidbrücke verknüpft.

Durch die Bindung an der Phospholipidmembran gelangt Prothrombin in die Nähe der Faktoren Xa und V, mit denen es zusammen den membranständigen Prothrombinasekomplex bildet. Weiterhin wird die Freisetzung des aktiven  $\alpha$ -Thrombins auf die Stelle der Gefäßverletzung beschränkt.

Die Blutgerinnung kann auf zwei verschiedenen Wegen ausgelöst werden: auf dem intrinsischen Reaktionsweg, d.h. durch Kontakt des Blutes mit einer unphysiologischen Oberfläche, oder auf dem extrinsischen Reaktionsweg durch Kontakt des Blutes mit Substanzen, die das Gewebe als Folge einer Verletzung freisetzt. Beide Wege münden am Ende in eine gemeinsame Folge von Reaktionsschritten (Abbildung 2.4).





**Abbildung 2.4:** Vereinfachte Blutgerinnungskaskade mit Thrombin als zentralem Enzym, links der intrinsische, rechts der extrinsische Reaktionsweg. Der Zusatz „a“ kennzeichnet jeweils die aktive Form des Gerinnungsfaktors. Die gestrichelten Linien deuten weitere Katalyseschritte an, die von Thrombin beeinflusst werden.

Diese Ereignisse in der Gerinnungskaskade führen zu einer kaskadenartigen Aktivierung der im Plasma vorhandenen Gerinnungsfaktoren durch die proteolytische Aktivierung der inaktiven Proenzyme (Zymogene) in die aktivierten Gerinnungsfaktoren, die im Falle der Blutgerinnungskaskade meist Serinproteasen sind. Dadurch und durch mehrere sich selbst verstärkende Rückkopplungen kommt es zur vielfachen Verstärkung des ausgelösten Anfangssignals und deshalb zu einem Stoppen der Blutung in kürzester Zeit. Das Enzym, das

die zentrale Rolle bei diesen Prozessen spielt, ist das am Ende der Blutgerinnungskaskade lokalisierte Thrombin.

Thrombin spaltet hoch spezifisch vier Arginin-Glycin-Peptidbindungen in der zentralen Region des Fibrinogens (Faktor I) und setzt so vier kurze Peptide frei. Die durch die Abspaltung dieser Fibrinopeptide entstandenen Fibrinmonomere aggregieren zu faserförmigen Strukturen, die man als Fibrin (Faktor Ia) bezeichnet. Durch eine Transamidierungsreaktion zwischen Lysin- und Glutaminseitenketten werden die Fibrinfasern quervernetzt. Diese Quervernetzung wird durch den Gerinnungsfaktor XIIIa katalysiert, der seinerseits durch Thrombin katalysiert aus dem Zymogen Faktor XIII freigesetzt wird. Patienten mit Faktor XIII-Mangel neigen verstärkt zu Blutungen.

Aber die Aktivität des Thrombins beschränkt sich nicht nur auf die Fibrinolyse und die Aktivierung des Faktors XIII. Durch die Aktivierung der gerinnungsfördernden Faktoren V und VIII katalysiert Thrombin seine eigene Freisetzung bzw. erhält diese aufrecht (positives Feedback).

Neben diesen gerinnungsfördernden Eigenschaften besitzt das Thrombin eine Reihe von gerinnungshemmenden Funktionen. Durch Bindung an das membranständige Thrombomodulin aktiviert Thrombin vorrangig Protein C, das dann die gerinnungsfördernden Faktoren Va und VIIa wieder inaktiviert.

Darüber hinaus werden Thrombin weitere zelluläre Effekte zugeordnet, die u.a. zu Entzündungen führen oder zur Heilung bei Gefäßverletzungen beitragen können. Aber auch mitogene Wirkungen, chemotaktische Eigenschaften und neuronale Funktionen zeigt das Thrombin.

Die Ausweitung der Blutgerinnung auf den gesamten Blutkreislauf hätte fatale Folgen. Um den Prozeß der Gerinnung begrenzen zu können, wird die enzymatische Aktivität des Thrombins durch endogene Inhibitoren wie dem  $\alpha$ -Makroglobulin und dem Serpin Antithrombin III inhibiert.

Die unerwünschte Entstehung von Thrombosen in den Blutgefäßen des Herzens oder des Gehirns ist heutzutage eine der Haupttodesursachen in den Industrieländern. Ein medikamentöser Eingriff wäre deshalb wünschenswert.

Die gebräuchlichsten Antikoagulantien sind das Polysaccharid Heparin und Wirkstoffe vom Cumarintyp wie Warfarin, das als Vitamin K-Antagonist wirkt. Beide Wirkstoffe wirken in einem indirekten Mechanismus antikoagulierend. Heparin verstärkt die Thrombinwechselwirkung mit dem Antithrombin III durch die Verbrückung zweier Heparinbindungsstellen am Thrombin und am Antithrombin III und wirkt so der Thrombose entgegen. Die Medikamente vom Cumarintyp behindern die Bildung von Prothrombin und der Faktoren V, VII, IX und X, indem diese als Vitamin K-Antagonisten mit den oben beschriebenen Folgen wirken.

Blutsaugende Tiere enthalten in ihrem Speichel Substanzen, die gezielt in das System der Blutgerinnung des Wirts eingreifen. Die Verwendung von Blutegeln als Heilmittel wurde bereits im ersten Jahrhundert vor Christus überliefert. Die gerinnungshemmende Wirkung des Speicheldrüsensekrets des Blutegels *Hirudo medicinalis* wurde erstmals 1884 beschrieben (Dodt, 1995). Fritz Markwardt gelang es dann 1957, ein Protein mit direkter inhibitorischer Wirkung auf Thrombin rein zu isolieren, das Hirudin genannt wurde. Der gerinnungshemmende Effekt von Hirudin, ein Polypeptid, kommt durch direkte und spezifische Thrombinhemmung zustande, indem es mit Thrombin einen sehr stabilen Komplex mit einer Dissoziationskonstante im femtomolaren Bereich bildet. Dieser Naturstoff ist als rekombinantes Hirudin seit kurzem als Injektionslösung (Revasc<sup>®</sup>) auf dem Markt. Der wichtigste Unterschied zur Wirkung von Heparin ist, daß Hirudin direkt wirkt und so dessen Reaktivität gegenüber Thrombin nicht von endogenen Inhibitoren abhängig ist.

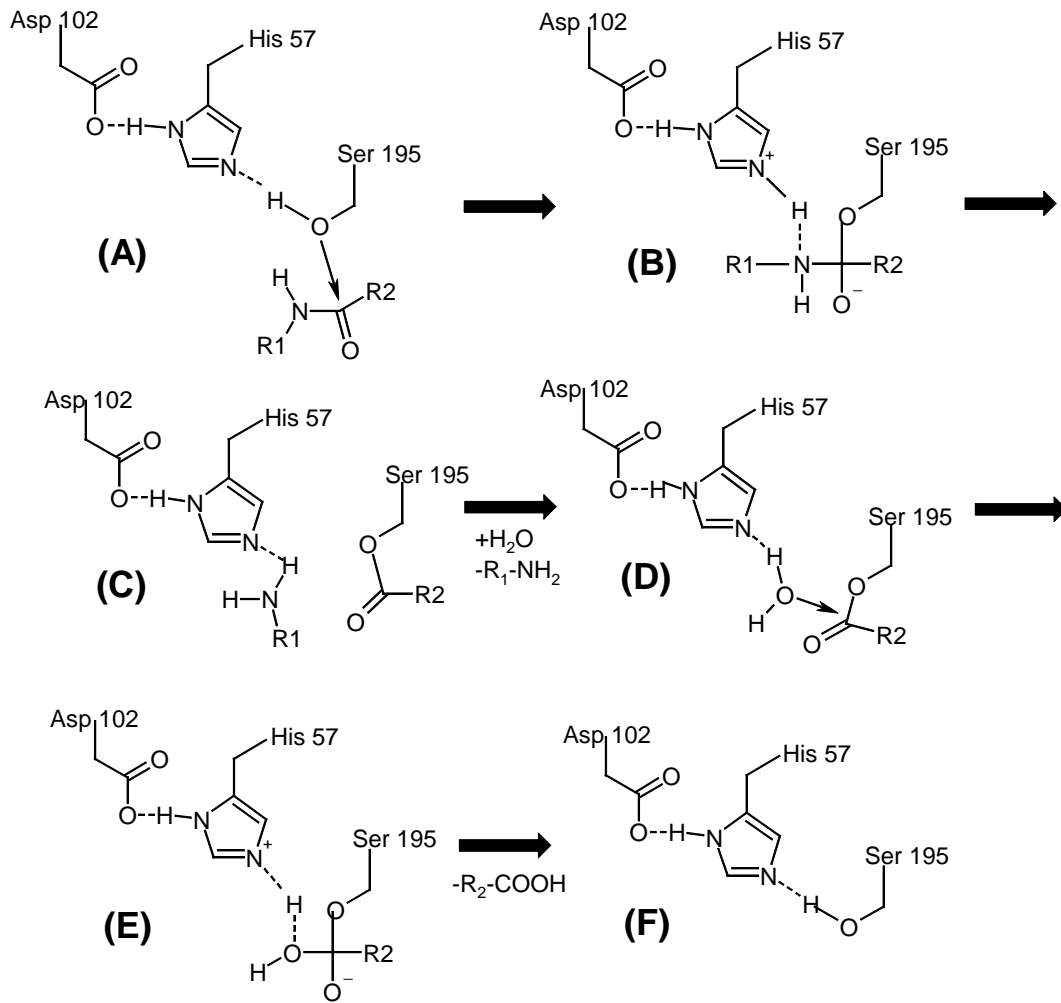
Zahlreiche Arbeitsgruppen in Industrie und Hochschule haben in den letzten Jahren eine große Anzahl von kleinen synthetischen Thrombininhibitoren entwickelt bzw. synthetisiert, die Thrombin durch Besetzung des katalytischen Zentrums hemmen und die oral verfügbar sein sollen. Da aber die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften *in vivo* nur schwer vorhersagbar sind, scheiterten bis heute alle Wirkstoffkandidaten mit ausreichender Hemmwirkung wegen mangelnder oraler Verfügbarkeit, wenngleich noch einige niedermolekulare Wirkstoffe in der klinischen Erprobung sind (Hauptmann & Stürzebecher, 1999).

### 2.1.3 Katalysemechanismus der Serinproteasen

Thrombin und Trypsin sind Serinproteasen mit der für alle Serinproteasen typischen katalytischen Triade Serin-Histidin-Aspartat im aktiven Zentrum. Die weitreichenden Homologien im Bereich der aktiven Zentren der Serinproteasen deuten darauf hin, daß sie zur Spaltung der Peptidbindungen ihrer Substrate den gleichen Katalysemechanismus benutzen (siehe Abbildung 2.5). Nach der Bindung des Substrates an das Enzym erfolgt der nucleophile Angriff des Serins 195 auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung (Schritt A), wobei ein tetraedrisches Intermediat (B) gebildet wird. Der Imidazolring von Histidin 57 nimmt das freigesetzte Proton auf. Eine elektrostatische Stabilisierung und die richtige Positionierung des Imidazoliumions erfolgt durch die Carbonsäureseitenkette des Aspartats 102, die sich auf der vom Lösungsmittel abgeschirmten Seite des Enzyms befindet.

Das Oxyanion des tetraedrischen Intermediates wird in der Oxyanionentasche stabilisiert. Diese Tasche mit ihren konvergent nach innen gerichteten Wasserstoffbrückendonoren, die meist von Aminogruppen der Peptidhauptkette gebildet werden, ist gut für die Solvatisierung eines negativ geladenen Übergangszustandes präorganisiert und trägt wesentlich zur Katalyse bei.

Im nächsten Schritt zur Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediates (C) zerfällt der tetraedrische Übergangszustand. Danach dissoziiert die Aminogruppe ( $R_1-NH_2$ ) ab, ein Wassermolekül greift den verbliebenen Acylenzymkomplex nucleophil an (D) und hydrolysiert den Serinester wiederum über ein tetraedrisches Zwischenprodukt (E). Der Rest des gespaltenen Substrats wird freigesetzt, und das Enzym steht danach für den nächsten Katalysezyklus bereit (F).



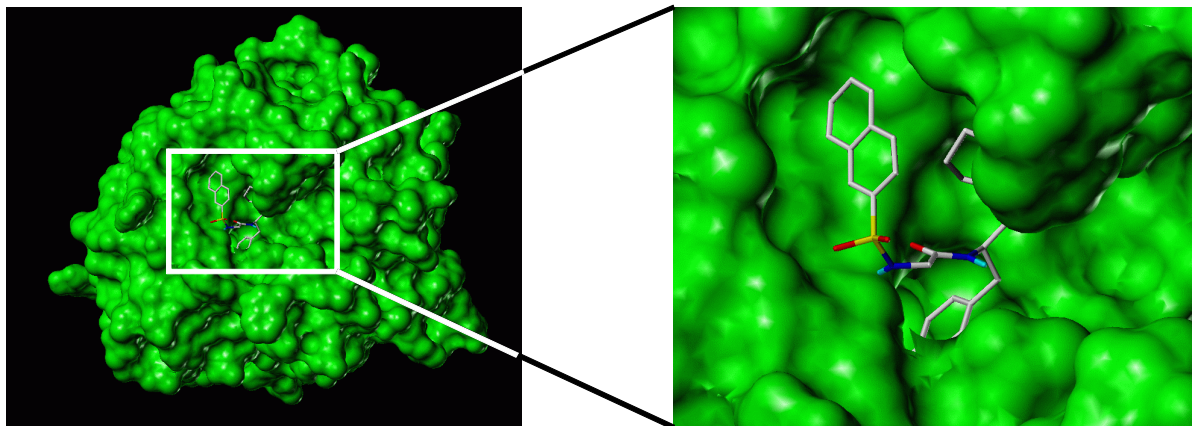
**Abbildung 2.5:** Mechanismus der Peptidspaltung im katalytischen Zentrum der Serinproteasen.

#### 2.1.4 Struktur von Thrombin und Trypsin

Thrombin wird aufgrund seiner Homologie zu anderen Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin der Klasse der Serinproteasen zugeordnet. Gemeinsam ist allen der gleiche katalytische Mechanismus und deshalb eine hohe strukturelle Homologie im Bereich des aktiven Zentrums. Das Enzym besteht aus zwei Ketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Zusammen bilden diese beiden Ketten ein globuläres Molekül der Größe von ca. 45 x 45 x 50 Å (Bode, 1989 *et al.*; Bode & Stubbs, 1995). Die kürzere

A-Kette des Thrombins zeigt keine Gemeinsamkeiten mit den Pankreasenzymen. Die B-Kette dagegen ist denen von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase relativ ähnlich.

Wie Trypsin spaltet auch Thrombin nur hinter basischen Seitenketten in P<sub>1</sub>-Position. Thrombin besitzt allerdings eine weitaus größere Substratspezifität als Trypsin: Es spaltet nur die durch einen weiteren strukturellen Kontext festgelegten Arginin-Glycin-Bindungen, während Trypsin die meisten der auf Arginin oder Lysin folgenden Peptidbindungen angreift. Das scheint auch plausibel, wenn man bedenkt, daß Trypsin als Verdauungsenzym unspezifische Peptidketten spalten soll. Im Gegensatz dazu erfordert Thrombin eine hohe Selektivität für seine Funktion, weil es in der Blutgerinnungskaskade das empfindliche Gleichgewicht zwischen Thrombose, Hämostase und Fibrinolyse herstellt.

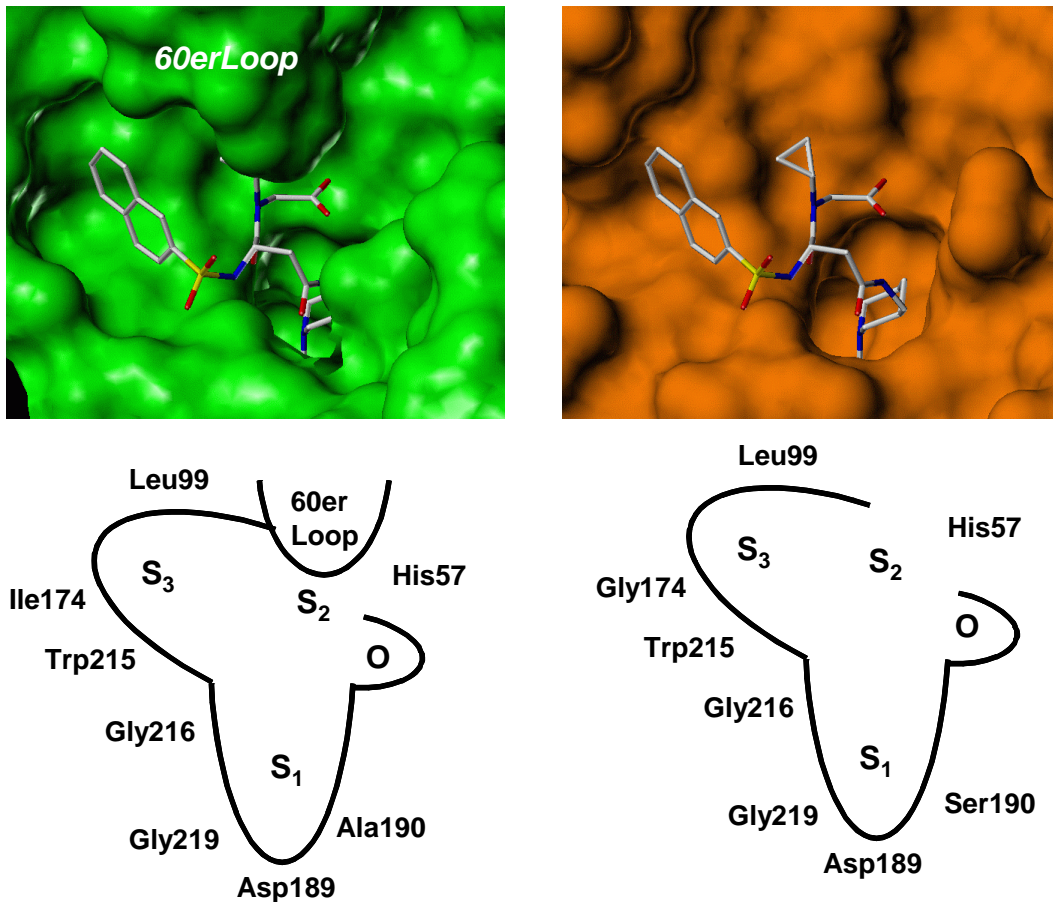


**Abbildung 2.6:** Oberflächendarstellung (Connolly-Oberfläche mit 1.4 Å Probenradius, lösungsmittel-zugängliche Oberfläche) von Thrombin in Komplex mit dem Inhibitor NAPAP (Bode et al., 1990). Die Fibrinogenbindestelle befindet sich auf der rechten Seite. Rechts ist ein Ausschnitt mit dem Inhibitor im aktiven Zentrum zu sehen. Der Benzamidinrest von NAPAP ist tief in der schmalen S<sub>1</sub>-Tasche vergraben und deshalb nur teilweise zu sehen. Ein Teil des Inhibitors ist durch die Seitenkette des Try60D im 60er Loop verdeckt. Unter der Oberfläche auf der rechten Seite des Ausschnittes befinden sich die Aminosäuren der katalytischen Triade.

Wie in Abbildung 2.6 (links) zu sehen, durchzieht eine tiefe canyonartige Spalte („*active-site*“ Spalte) die eine Seite des Thrombinmoleküls von links nach rechts, an deren Grund sich etwa in der Mitte der Abbildung die katalytisch aktiven Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102 und Serin 195 befinden. Die Numerierung der Aminosäuren des Thrombins und Trypsins lehnt sich an die der Protease Chymotrypsinogen an (Bode *et al.*, 1989). Wie die anderen Mitglieder der trypsinähnlichen Serinproteasen besteht auch das Thrombin im wesentlichen aus zwei sechssträngigen  $\beta$ -Faltblättern, die jeweils zu einer faßartigen Struktur zusammengerollt sind. Die V-förmige A-Kette verläuft in einer durch die größere B-Kette ausgesparten Kerbe auf der anderen Seite des Thrombins, d.h. auf der der „*active-site*“ Spalte gegenüberliegenden Seite.

**Aktives Zentrum.** Die  $S_1$ -Spezifitätstasche des Thrombins und Trypsins ist eine tiefe, schmal eingeschnittene Tasche, an deren Grund die Carboxylatseitenkette des Aspartats 189 sitzt, mit dem die basischen  $P_1$ -Arginin- bzw. Lysinreste eine günstige Salzbrücke ausbilden können (Abbildung 2.7). Diese Tasche wird auf der einen Seite durch eine antiparallele Faltblattstruktur, auf der anderen Seite durch eine  $\beta$ -Schleife begrenzt. Im Unterschied zum Serin 190 des Trypsins besetzt diese Position im Thrombinmolekül ein Alaninrest, so daß die  $S_1$ -Tasche des Thrombins etwas weniger polar ist und daher eine Wasserstoffbrücke weniger ausbilden kann. Am „oberen“ Ende der  $S_1$ -Spezifitätstasche schließt sich die sogenannte Oxyanionentasche an, die von drei nach innen gerichteten Aminofunktionen ausgekleidet wird, um so das geladene Sauerstoffatom im oben beschriebenen tetraedrischen Übergangszustand zu stabilisieren.

**Aromatenbindetasche ( $S_3$ -Tasche).** Die  $S_3$ -Tasche des Thrombins ist eine große, hydrophobe Tasche, die bevorzugt aromatische Ringsysteme aufnimmt (Phenylalanin des Fibrinogens, Tyrosin des Hirudins). Deshalb kann diese Tasche als Aromatenbindungsstelle beschrieben werden. Begrenzt wird die Tasche durch die hydrophoben Seitenketten von Leucin 99 und Isoleucin 174. Den Boden der  $S_3$ -Tasche bildet der Indolring des Tryptophans 215.



**Abbildung 2.7:** Oben eine Oberflächendarstellung der aktiven Zentren von Thrombin (links) und Trypsin (rechts) mit Napsagatran als Inhibitor (siehe Kapitel 2.1.5.). Auffällig ist beim Thrombin der 60er Loop, der das aktive Zentrum vertieft und verengt. Unten jeweils eine schematische Darstellung der beiden aktiven Zentren mit der S<sub>1</sub>-Spezifitätstasche, S<sub>2</sub>-Tasche, S<sub>3</sub>-Aromatenbindetasche, der Oxyanionentasche O und den Aminosäuren, die die Bindetaschen umgeben.

**S<sub>2</sub>-Bindetasche.** Im Vergleich zu Trypsin besitzt Thrombin viele zusätzliche Ketteninsertionen, die vor allem die „active-site“ Spalte vertiefen, verengen und so die besondere Substratspezifität bedingen.

Die höhere Substratspezifität von Thrombin gegenüber Trypsin wird durch die zusätzliche, mittelgroße hydrophobe S<sub>2</sub>-Bindetasche erzeugt, die durch die in Trypsin nicht vorhandene Schleife aus Tyr60A-Pro60B-Pro60C-Trp60D (den sogenannten 60er Loop) entsteht. Diese Schleife ist trotz ihrer Exposition erstaunlich wenig verformbar und verhindert so den Zutritt



der meisten Proteine zur Spaltstelle. In Trypsin existiert also die Trennung von  $S_2$ - und  $S_3$ -Tasche nicht, auch sind diese hier nicht so deutlich ausgeprägt wie im hochspezifischen Thrombin. Offensichtlich verlangt die Funktion des weitgehend unspezifischen Verdauungsenzyms diese Begrenzung des katalytischen Zentrums nicht.

Die  $S_2$ -Tasche ist sowohl in Thrombin als auch Trypsin durch die hydrophobe Seitenkette von Leucin 99 von der  $S_3$ -Tasche getrennt und wird von den Aminosäuren Tyr60A, Trp60D und His57 begrenzt. In dieser Tasche werden bevorzugt kleine bis mittelgroße hydrophobe Reste gebunden. Im Falle des Thrombinsubstrats Fibrinogen wird diese Tasche durch die Isopropylseitenkette eines Valins besetzt (Bode & Stubbs, 1995).

Makromolekulare Substrate (Fibrinogen) und Inhibitoren nutzen zur Bindung an Thrombin weitere spezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche des Thrombins, die lokal weit vom aktiven Zentrum entfernt sind. 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 Thrombin wird als Heparinbindungsstelle bezeichnet (Bode *et al.*, 1992). Die zu beobachtende Wechselwirkung beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem durch die Aminosäuren Lysin und Arginin erzeugten positiven Feld des Thrombins und dem negativen Feld des Polysaccharids Heparin.

### 2.1.5 Thrombin- und Trypsininhibitoren

**Hirudin.** Das Hirudin, ein Polypeptid mit 65 Aminosäuren, ist der stärkste zur Zeit bekannte Inhibitor des Thrombins. Sein N-Terminus wird durch drei Disulfidbrücken zusammengehalten und bildet so den globulären „Kopf“ des Hirudins, der auf dem katalytischen Zentrum des Thrombins liegt. Weil das N-terminale Ende über dem aktiven Zentrum zu liegen kommt, ohne aber direkt in der  $S_1$ -Spezifitätstasche zu binden, ist das Hirudin in der Lage, Substrate daran zu hindern, ins aktive Zentrum zu gelangen (Rydel *et al.*, 1991).

Der C-Terminus besteht aus zahlreichen negativ geladenen Seitenketten (Glutamate und Aspartate). Dieser bindet an der oben beschriebenen Fibrinogenbindungsregion, die mehrheitlich aus basischen Seitenketten besteht, so daß sich günstige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Enzym und C-Terminus des Hirudins ausbilden können. Dieser bivalente Bindungsmodus verhilft dem Hirudin zu einer Dissoziationskonstante im femtomolaren Bereich.

Von diesem Standpunkt aus betrachtet scheint Hirudin (und dessen Derivate) ein ideales, direkt wirkendes Antikoagulum zu sein. Für eine Therapie allerdings ist eine ausreichende biologische Halbwertszeit wesentlich wichtiger. Und die ist beim Hirudin wegen dessen peptidischer Struktur naturgemäß relativ kurz. Ein weiterer Nachteil ist, daß das Polypeptid Hirudin verständlicherweise nicht oral verfügbar ist und deshalb parenteral appliziert werden muß.

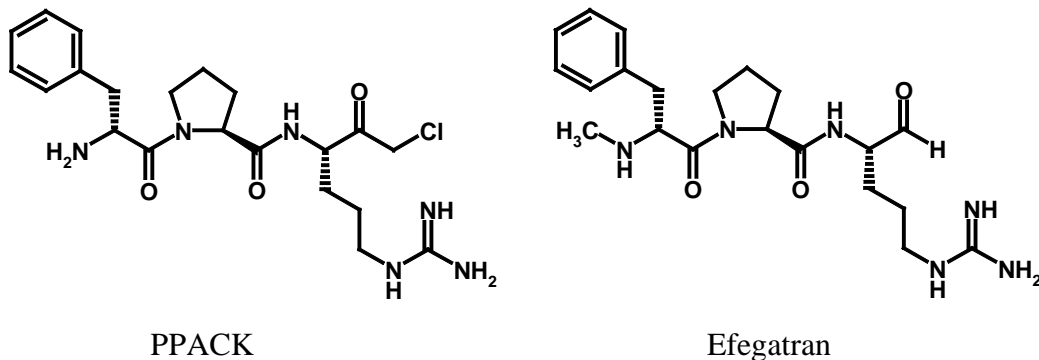
Im Gegensatz zu den relativ großen Peptiden und rekombinanten Proteinen sind synthetische, niedermolekulare Inhibitoren in der Lage, nach oraler Gabe absorbiert zu werden. Zahlreiche Strukturen wurden und werden als Inhibitoren für Thrombin synthetisiert.

Ein idealer, oral verfügbarer „*active-site*“ Inhibitor sollte folgende Eigenschaften haben: lange biologische Halbwertszeit, gute Absorption nach oraler Gabe, metabolische Stabilität, hohe Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen und eine gute Hemmwirkung gegenüber Thrombin (Hauptmann & Stürzebecher, 1999; Kimball, 1995).

Die Substratspezifität der Serinproteasen wird primär über die Erkennung der Aminosäuren in P<sub>1</sub>-Position bestimmt. Für den Entwurf spezifischer Inhibitoren bedeutet dies, die S<sub>1</sub>-Tasche so gut wie möglich auszufüllen.

**Substratanaloga.** Ausgehend von der P<sub>3</sub>-P<sub>3</sub>'-Substratsequenz Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg wurde das substratanaloge Tripeptid PPACK mit der Sequenz D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl (Abbildung 2.8) synthetisiert (Berliner, 1992; Bode *et al.*, 1989; Bode *et al.*, 1992). Das Chloromethylketon reagiert unter Alkylierung des katalytischen Histidins 57 in einer irreversiblen Reaktion. Die Ketogruppe des Inhibitors ist räumlich so günstig plaziert, daß es nucleophil von der Hydroxylgruppe des Serins 195 angegriffen wird. Das Arginin von

PPACK besetzt wie erwartet die  $S_1$ -Bindetasche des Thrombins, während die  $S_2$ -Tasche von Prolin und die  $S_3$ -Tasche von D-Phenylalanin des Inhibitors besetzt wird. Aufgrund seiner reaktiven Gruppe ist PPACK aber nicht als Therapeutikum geeignet.



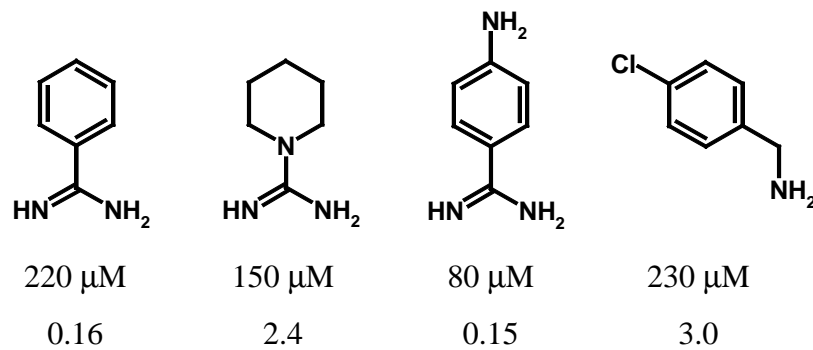
**Abbildung 2.8:** Elektrophile (kovalente) *Thrombininhibitoren*. PPACK (*D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl*) und Efgatran (*D-MePhe-Pro-Arg-H*).

**Elektrophile Inhibitoren.** Elektrophile Inhibitoren sind meistens Derivate von Substraten oder kompetitiven Inhibitoren, die zusätzlich mit einer elektrophilen funktionellen Gruppe versehen sind. Die Hydroxylgruppe des Serins 195 kann die elektrophile Gruppe nucleophil angreifen, wobei ein durch Wechselwirkungen mit der Oxyanionentasche des Enzyms stabilisiertes kovalentes Intermediat entsteht. Da diese bei Inhibitoren mit elektrophilen Carbonylgruppen dem Übergangszustand bei der Spaltung sehr ähnlich sind, nennt man solche Inhibitoren auch Übergangszustandanaloge. Ein Beispiel für einen elektrophilen, reversibel kovalent bindenden Inhibitor (Ripka, 1997) ist das Tripeptid aldehyd Efgatran (Abbildung 2.8). Diese Verbindung ist oral verfügbar, aber besitzt den Nachteil nicht ausreichender Selektivität für Thrombin.

**Reversible nichtkovalente Inhibitoren.** Elektrophile Gruppen in Inhibitoren können mit Serinresten anderer Enzyme unerwünschte Reaktionen eingehen und weitere unerwünschte Nebenwirkungen verursachen. Bei nichtelektrophilen Inhibitoren fehlt die elektrophile

Gruppe, die eine Reaktion mit dem Serinrest eingeht. Deshalb können reversible Inhibitoren, die nicht auf kovalenten Wechselwirkungen mit dem Enzym beruhen, den Vorteil der erhöhten Selektivität gegenüber anderen Serinproteasen aufweisen.

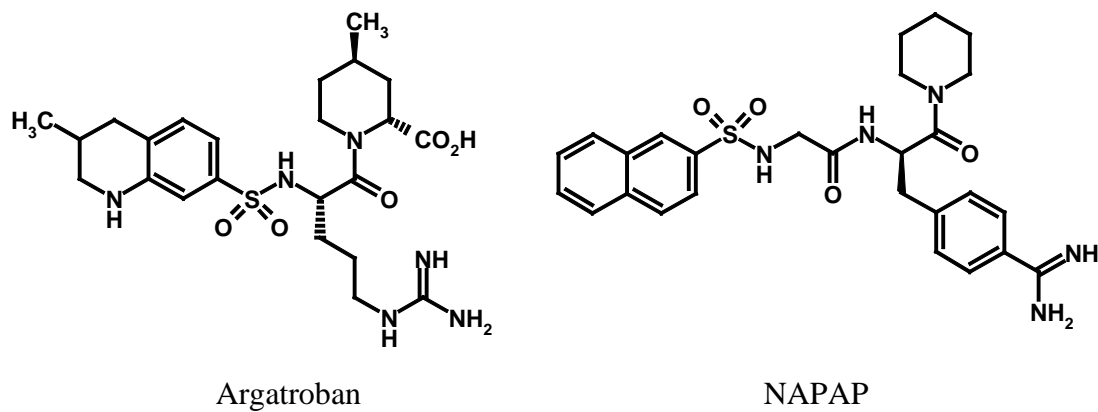
Basierend auf dem Befund, daß sehr kleine basische Moleküle (sogenannte „Nadeln“) wie Benzamidin, die nur die  $S_1$ -Bindetasche besetzen, Trypsin schon im mikromolaren Bereich inhibieren, aber keinerlei Selektivität gegenüber Thrombin aufweisen, wurden diese „Nadeln“ für eine Erhöhung der Affinität gegenüber Thrombin und für eine erhöhte Selektivität mit verschiedenen peptidähnlichen Strukturen verknüpft.



**Abbildung 2.9:** Moleküle, die in der  $S_1$ -Tasche binden, sind mikromolekulare Thrombin- und Trypsininhibitoren („Nadeln“). Die Inhibitionskonstanten ( $K_i$ -Werte in  $\mu\text{M}$ ) von Benzamidin, Amidinopiperidin, *p*-Aminobenzamidin und *p*-Chlorbenzylamin (von links) gegenüber Thrombin und die Selektivitäten gegenüber der Bindung an Trypsin ( $K_i(\text{Trypsin}) / K_i(\text{Thrombin})$ ) sind jeweils unterhalb der Struktur angegeben. Nach U.Obst (1997).

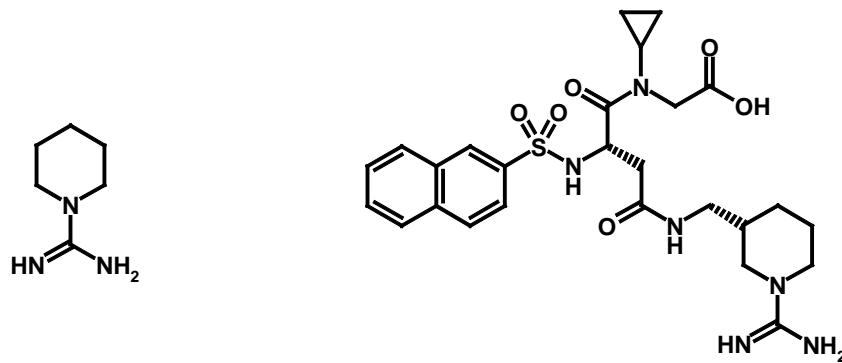
NAPAP war lange Zeit der wirkstärkste Vertreter aus der Klasse der niedermolekularen reversiblen Inhibitoren des Thrombins (Stürzebecher *et al.*, 1984). Ein Schwachpunkt von NAPAP ist die mangelnde Thrombinselektivität im Vergleich zur Protease Trypsin. Bei Argatroban, NAPAP (Abbildung 2.10) und anderen peptidomimetischen und nichtpeptischen Inhibitoren mit Benzamidino- oder Guanidinostrukturen besetzt die basische Amidino- bzw. Guanidinostruktur die  $S_1$ -Spezifitätstasche wie in PPACK, während die große N-terminale Arylsulfonylgruppe in der Aromatenbindetasche ( $S_3$ -Tasche) plaziert wird (siehe auch Abbildungen 2.6 und 2.7). Überraschenderweise kommen die C-terminalen Piperidinringe in der  $S_2$ -Tasche zu liegen (Brandstetter *et al.*, 1992).

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. Bei Argatroban wiederum bindet das Molekül mit dem natürlichen Argininrest (S-Form) an das Thrombin, während hier die R-Form weniger aktiv ist.



**Abbildung 2.10:** Nicht-kovalante Inhibitoren. Links Argatroban mit einer Guanidinogruppe, die in der  $S_1$ -Tasche bindet, und rechts NAPAP mit einem Benzamidinrest.

Wissenschaftler von Hoffmann-La Roche haben einen anderen Weg beschritten. Ausgangspunkt für das Design neuartiger Thrombininhibitoren war hier das N-Amidinopiperidin. Benzamidin besitzt den Nachteil, daß es besser gegenüber Trypsin bindet als gegenüber Thrombin. Im Gegensatz zu Benzamidin bindet N-Amidinopiperidin fester an Thrombin ( $K_i = 150 \mu\text{M}$ ) als an Trypsin ( $K_i = 360 \mu\text{M}$ , Abbildung 2.9). Diese Arbeiten führten schließlich zu Napsagatran, einer hoch potenten und äußerst selektiven niedermolekularen Substanz (Hilpert *et al.*, 1994).



**Abbildung 2.11:** Ausgehend von *N*-Amidinopiperidin (links,  $K_i = 150 \text{ mM}$ ) als Leitstruktur wurde Napsagatran (rechts,  $K_i = 2.5 \text{ nM}$ ) als gut bindender, äußerst selektiver Thrombininhibitor entwickelt.

## 2.2 Röntgenstrukturanalyse

Für die Strukturbestimmung von kleinen organischen Molekülen bis hin zu Proteinen stehen heutzutage im wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung: die Röntgenstrukturanalyse (Glusker *et al.*, 1994; Massa, 1996) und die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR). Die NMR-Spektroskopie geht auf einen Versuch von Bloch und Purcell im Jahre 1945 zurück, die erstmals die Resonanzanregung von Wasserstoffkernen durch Radiowellen (MHz-Bereich) im Magnetfeld beobachteten und dafür 1952 den Nobelpreis für Physik erhielten. Die Fortschritte in der Datenverarbeitung, die Verfügbarkeit von supraleitenden Magneten und andere apparative Verbesserungen führten zur allgemeinen Anwendung höherer Feldstärken - heute bis zu 800 MHz – und zur Möglichkeit der Nutzung zur Proteinstruktur- aufklärung unter Anwendung mehrdimensionaler Pulstechniken. Während Lösungs-NMR auf „kleinere“ Proteinstrukturen bis derzeit maximal 200 bis 300 kDa limitiert ist, gibt es im Falle der Röntgenkristallographie keine obere Grenze für die Masse der untersuchten Proteine, solange geeignete Kristalle erhalten werden können.

Werden bei der magnetischen Kernresonanzspektroskopie Radiowellen zur Anregung des Kernspins benötigt, arbeitet die Kristallstrukturanalyse mit Röntgenstrahlung. Röntgenstrahlen, die 1895 von Wilhelm Röntgen (Nobelpreis für Physik 1901) entdeckt

wurden, haben Wellenlängen, die mit den Abständen der Atome im Kristall vergleichbar sind (ca. 100 pm); sie werden deshalb an Kristallgittern gebeugt. Max von Laue vermutete schon 1912, daß Röntgenstrahlung beim Durchtritt durch einen Kristall gebeugt werden müßte. Daß diese Vermutung richtig war, haben Walter Friedrich und Paul Knipping kurze Zeit später mit Hilfe eines Kupfersulfatkristalls bewiesen und die Wellennatur der Röntgenstrahlen bestätigt. Ein Jahr später bestimmten William und Laurence Bragg (Vater und Sohn) als erste die Kristallstruktur von Kochsalz, wofür sie gemeinsam 1915 den Nobelpreis für Physik erhielten.

### 2.2.1 Kristalle

In Kristallen weisen die atomaren Bausteine eines festen Stoffes eine Fernordnung in allen drei Raumrichtungen auf., d.h. die Moleküle sind im Kristall regelmäßig angeordnet. Die kleinste sich wiederholende Einheit bezüglich des Translationsgitters bezeichnet man als Einheitszelle, die durch drei Kantenlängen  $a$ ,  $b$ ,  $c$  und drei Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  charakterisiert wird. Durch theoretische Translation dieser Einheitszelle erhält man den gesamten Kristallverband.

Neben der dreidimensionalen Periodizität greift ihr interner Aufbau auf weitere Symmetrieeigenschaften zurück. Die Elementarzelle wird so festgelegt, daß man nicht ausschließlich die durch Translation zu ergänzende kleinstmögliche Elementarzelle wählt, sondern die asymmetrische Einheit mit der höchstmöglichen Symmetrie, d.h. den Teil der Elementarzelle, der durch Anwendung der Symmetrieeoperationen die Elementarzelle ergibt. Unterscheidet man die Kristalle anhand ihrer Symmetrieeigenschaften, kann man sie in 14 sogenannte Bravaisgitter einteilen.

Im einfachsten Fall entspricht die Elementarzelle einem Molekül. Der Inhalt einer Elementarzelle kann auch aus mehreren Moleküle oder aus Bruchteilen davon bestehen, die durch Anwendung von Spiegelungen und Drehungen, den sogenannten Symmetrieeoperationen, die Elementarzelle erzeugen. Die Kombination von Elementarzelltypen mit den möglichen Symmetrieeoperationen ergibt 230 sogenannte Raumgruppen.

### 2.2.2 Proteinkristallisation

Schon lange wurde die Morphologie der Kristalle als Folge einer inneren Regelmäßigkeit angesehen. Betrachtet man Mineralien, so fällt deren regelmäßiger Aufbau auf. Auch organische Materie kann Kristalle formen. Allerdings findet man organische Moleküle und Proteine in der Natur nur selten kristallin, sondern muß selbst Bedingungen finden, Proteinkristalle für die Strukturaufklärung wachsen zu lassen.

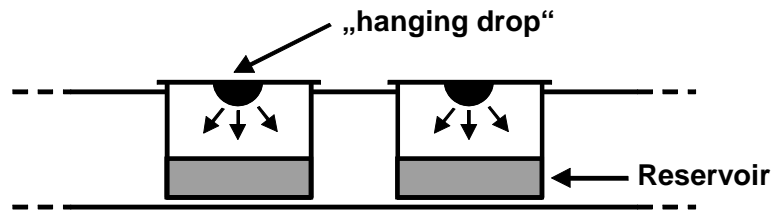
Einige Proteine kristallisieren sehr gut, bei anderen wiederum ist es sehr zeitaufwendig, die geeigneten Kristallisationsbedingungen zu finden, während einige bis zum heutigen Tage nicht kristallisiert werden konnten. Vielfach wird die Proteinkristallisation als eine Kunst bezeichnet, weil ein Kristallzüchter nicht nur große Ausdauer und Geduld, sondern auch eine glückliche Hand braucht.

Für die Kristallisation von Proteinen hat sich die sogenannte „*hanging drop*“ Methode (oder auch „*sitting drop*“ Methode) als geeignet erwiesen. Weil oft nur geringe Mengen an aufgereinigtem Protein (wenige Milligramm) zur Verfügung stehen, ist das „*hanging drop*“ Verfahren die Methode der Wahl zur Proteinkristallisation. Ein 5 bis 15 µl großer Tropfen der konzentrierten Proteinlösung mit entsprechenden Fällungssubstanzen wird auf ein Mikroskopiergläschen aufgetragen. Dieses Gläschen wird dann kopfüber über einem Reservoir plaziert, das etwa 500 µl einer konzentrierteren Lösung an Fällungssubstanzen ohne Protein enthält, so daß der Tropfen mit der Proteinlösung über der Reserviörlösung (durch Adhäsionskräfte am Gläschen gehalten) zu hängen kommt. Das Deckgläschen versiegelt das Reservoir, so daß dieses System nach außen hin abgeschlossen ist. Üblicherweise werden Kristallisationsplatten mit 24 Reserviörs benutzt. Wenn sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Lösungen eingestellt hat, kann das Protein kristallisieren.

Will man Kristalle von Proteinen im Komplex mit niedermolekularen Liganden erhalten, gibt es prinzipiell zwei Vorgehensweisen. Bei der Kokristallisation von Protein und Ligand werden die Lösungen mit dem Protein bzw. Liganden vor dem Kristallisationsansatz miteinander gemischt und entsprechend der obigen Vorschrift kristallisiert. Der hohe



Wassergehalt in Proteinkristallen läßt aber auch die Möglichkeit zu, kleine Moleküle in die Kristalle diffundieren zu lassen, wenn die Bindetasche im günstigen Falle an einen Wasserkanal stößt. Durch Einlegen eines solchen Proteinkristalls in eine Pufferlösung eines Liganden kann dieser in die Bindetasche hineindiffundieren („soaking“) und sich dort in der Bindetasche anlagern, ohne daß sich der Proteinkristall dabei auflösen darf.



**Abbildung 2.12:** Die gepufferte Proteinlösung hängt als Tropfen („hanging drop“) über einer konzentrierteren Reservoirlösung. Die beiden Lösungen stehen über die Dampfphase miteinander in Kontakt. Nach außen hin ist das System abgeschlossen.

Warum fällt das Protein aus? Proteine tragen an ihrer Oberfläche Aminosäuren mit geladenen, ionischen Gruppen. Es gilt nun, die Bedingungen zu finden, unter denen die Proteinmoleküle sich langsam geordnet assoziieren. Das gelingt im Falle der Proteinkristallisation durch langsames Verändern der Wassermenge, in der das Protein gelöst vorliegt, z.B. durch anorganische Salze. Das Salz bindet Wassermoleküle, wenn es in Lösung geht, weil es sich mit einer Wasserhülle umgibt und so dem Protein diese Wassermoleküle entzieht. Wird der Sättigungspunkt überschritten, fängt das Protein an auszufallen. Man spricht auch davon, daß die Substanz „ausgesalzt“ wird. Man kann die Kristallisation aber auch durch den gegenteiligen Prozeß erreichen, indem man die Wassermenge steigert und so ein hydrophobes Enzym zur Kristallisation bringen kann.

Neben Salzen können auch oberflächenaktive Substanzen wie das Detergenz Polyethylenglykol zur Beeinflussung der Proteinhydrathülle verwendet werden. Um das Protein letztendlich kristallisieren zu können, müssen außerdem der richtige pH-Wert (Einstellung der passenden Oberflächenladung) und die richtige Temperatur eingestellt werden.

### 2.2.3 Datenaufnahme

**Präparation des Kristalls.** Proteinkristalle enthalten zahlreiche Wassermoleküle im Kristallgitter (30 bis 70 %). Würde man sie wie Kristalle niedermolekularer organischer oder anorganischer Substanzen behandeln, würden sie austrocknen - und schließlich könnte dann der gesamte Kristall zerstört werden.

Proteinkristalle werden daher in einer geschlossenen dünnwandigen Glaskapillare mit etwa 0.5 mm Durchmesser vermessen. Der Kristall wird in der Kapillare durch Adhäsionskräfte an der Glaswand gehalten und bleibt durch ein oder zwei Tropfen der Mutterlauge in der Kapillare über die gesättigte Atmosphäre in Kontakt mit dieser und kann so während der Messung nicht austrocknen, weil die Glaskapillare vor der Messung an beiden Enden verschlossen wird. Eine weitere Methode ist die Kristallpräparation unter Tieftemperaturbedingungen. Der Kristall wird dabei in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren, so daß die Wassermoleküle in den Kristallkanälen nicht zu Eiskristallen werden, die den Kristall zerstören bzw. sprengen könnten. Der Kristall wird während der gesamten Messung gekühlt. Das hat bei sehr langen Röntgenaufnahmen auch den Vorteil, daß die Röntgenstrahlung den Kristall während der Aufnahme langsamer zerstört als bei Raumtemperatur.

Die Glaskapillare samt Kristall wird danach auf dem Goniometerkopf des Röntgendiffraktometers montiert und so justiert, daß der Kristall bei allen Aufnahmewinkeln (d.h. bei der Drehung um die Achse des Goniometerkopfes) im Röntgenstrahl zentriert bleibt.

**Röntgenstrahlung.** Röntgenstrahlung mit Wellenlängen von 1 bis 100 Å entsteht bei der Abbremsung schneller Elektronen durch direkte oder indirekte Konversion der kinetischen Energie in Strahlung. In einer Röntgenröhre wird ein Elektronenstrahl durch die Hochspannung von circa 50 kV auf eine Anode aus Kupfer oder Molybdän gelenkt. Dabei werden an der Anode größere Mengen an Wärme frei, so daß man zu Drehanoden übergegangen ist, die während der Messung schnell rotieren und mit Wasser gekühlt werden, um die Wärme besser abführen zu können und um höhere Intensitäten zu erreichen.

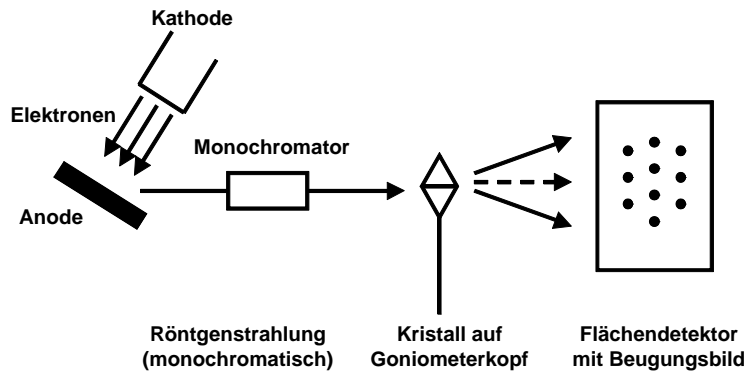
In der Anode wird Röntgenstrahlung durch zwei Prozesse freigesetzt: Durch Abbremsen der Elektronen entsteht die weiße Bremsstrahlung mit kontinuierlicher Energieverteilung. Der Bremsstrahlung überlagert ist die charakteristische Röntgenstrahlung, die dadurch entsteht,

daß Elektronen aus der untersten Elektronenschale des Atoms (K-Schale) herausgeschlagen werden. Ein Elektron aus der nächsthöheren Schale (L-Schale) springt in die Lücke der K-Schale und relaxiert so den entstandenen instabilen Zustand wieder. Die Energiedifferenz beider Energieniveaus wird als Röntgenstrahlung ( $K_{\alpha}$ -Strahlung) definierter Wellenlänge (1.54 Å für Kupferanoden und 0.71 Å für Molybdänanoden) emittiert.

Einkristallmonochromatoren aus Graphit oder Quarz werden so in genau definierter Orientierung in den Röntgenstrahl gebracht, daß nur die  $K_{\alpha}$ -Strahlung die Bedingung für konstruktive Interferenz erfüllt. So erhält man als Primärstrahl monochromatische Röntgenstrahlung.

**Aufnahme der Beugungsbilder.** Der montierte Kristall wird um die Achse des Goniometerkopfes gedreht und mit Röntgenstrahlen aus einer senkrecht zu dieser Achse verlaufenden Richtung bestrahlt.

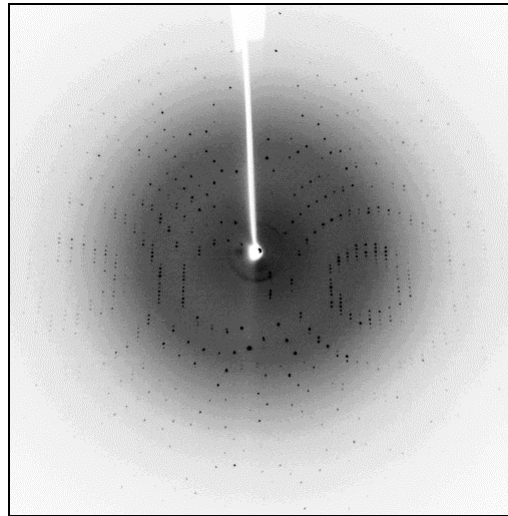
Wegen der scharfen Interferenzbedingungen (Erfüllung der Bragg'schen Beziehung) muß für jeden zu messenden Reflex die entsprechende Netzebene durch Drehung des Kristalls in die „Reflexionsstellung“ gebracht werden. Die Orientierung der Netzebenen im Kristallgitter wird mit den Miller-Indices genannten *hkl*-Werten charakterisiert. Weil die Einheitszelle von Proteinen im Gegensatz zu den Einheitszellen von niedermolekularen Verbindungen relativ groß ist, bringt schon die Drehung um einen kleinen Winkel (üblicherweise  $0.5^{\circ}$  bis  $2^{\circ}$ ) eine große Anzahl von Netzebenen in Reflexionsstellung. Die Reflexe, die aus dieser Drehung resultieren, werden mit einem Flächendetektor aufgenommen. Man nimmt mehrere einander anschließende Aufnahmen („frames“) auf, bis alle unabhängigen Reflexe bezüglich der Symmetrieeigenschaften der Raumgruppe des Kristalls überstrichen worden sind. Dabei darf der Drehwinkel einer Aufnahme nicht so groß sein, daß Reflexe auf dem Film aufeinanderfallen können. Der durch den Kristall hindurchtretende Primärstrahl wird durch einen Primärstrahlfänger absorbiert, um die Detektionssysteme vor energiereicher Strahlung zu schützen.



**Abbildung 2.13:** Vereinfachtes Schema eines Röntgengerätes. Beschleunigte Elektronen treffen auf eine Anode und setzen dabei Röntgenstrahlung frei, die monochromatisiert auf den Kristall fällt, der auf dem drehbaren Goniometerkopf montiert ist. Die Röntgenstrahlung wird am Kristall gebeugt, der Primärstrahl (gestrichelt) von einem Primärstrahlfänger absorbiert. Auf dem Flächendetektor wird das Beugungsbild aufgezeichnet.

**Detektionsmethode.** In der Proteinkristallographie bedient man sich den Verfahren, auf einem Flächendetektor viele Reflexe gleichzeitig zu registrieren. Eingesetzt werden heute üblicherweise die Bildplatte („*image plate*“) oder ein CCD-Detektor.

Man muß sich diese Bildplatte wie einen fotografischen Film vorstellen, der immer wieder gelöscht und beschrieben werden kann. Diese Platte besteht aus einer mit  $\text{Eu}^{2+}$  dotierten Schicht aus  $\text{BaClF}$ , die während der Belichtungszeit (ca. 5 bis 15 Minuten) von auftreffenden Röntgenquanten in metastabile Zustände angeregt wird. Diese werden anschließend ausgelesen, indem sie durch Laserbestrahlung zur Emission von Photonen angeregt werden. Nach der Belichtung mit sichtbarem Licht ist die Information auf der Platte gelöscht, so daß die Platte für die nächste Röntgenaufnahme bereitsteht. Arbeitet man mit einem System aus zwei Bildplatten, so läßt sich die Meßzeit dadurch verkürzen, daß während der Röntgenaufnahme auf der einen Platte die andere Platte gleichzeitig ausgelesen wird.



**Abbildung 2.14:** *Beugungsbild eines Trypsinkristall (trigonale Raumgruppe) mit einer Auflösung von 1.9 Å. In der Mitte ist das Abbild des Primärstrahlfängers zu sehen. Nach außen hin werden die Reflexintensitäten immer schwächer.*

#### 2.2.4 Datenanalyse

**Datenreduktion.** Nach Bestimmung der Symmetrie und der Größe der Elementarzelle müssen die einzelnen Reflexe entsprechend der Netzebenen mit den Miller-Indices indiziert werden und die jeweilige Intensität der einzelnen Reflexe bestimmt werden. Nach der Skalierung aller aufgenommenen Röntgenbilder werden so die Rohdaten der Datensammlung erhalten.

Die Rohdaten für jeden Reflex bestehen aus den Miller-Indices ( $h k l$ ), der integrierten Intensität  $I(hkl)$  und deren Standardabweichung  $\sigma(I)$ . Die gemessenen Intensitäten  $I(hkl)$  sind proportional zum Quadrat der für die Strukturlösung benötigten Amplituden der Strukturfaktoren  $|F(hkl)|$ . Die Umrechnung berücksichtigt unter anderem Korrekturen für die Hintergrundintensität und für Lorentz- und Polarisationsfaktoren. Nach der Skalierung der Strukturamplituden ist die Datenreduktion abgeschlossen.

**Strukturlösung.** Beim Beugungsvorgang wird die dreidimensionale periodische Elektronendichtefunktion durch eine Fourieranalyse in eine Überlagerung vieler Einzelwellen zerlegt. Das Beugungsbild ist also als Fouriertransformierte des periodischen Aufbaus eines Kristalls zu betrachten. Kennt man die Einzelwellen mit ihren Amplituden und Phasen, so kann man durch Fouriersynthese die Elektronendichte  $\rho$  und damit den Inhalt einer Elementarzelle der Kristallstruktur zurückrechnen.

Die Elektronendichte  $\rho(x,y,z)$  des Punktes  $x,y,z$  im Einheitszellenvolumen  $V$  wird in Elektronen pro  $\text{\AA}^3$  ausgedrückt.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \cos 2\mathbf{p} (hx - ky - lz - \mathbf{a}_{hkl}) \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

Die Gleichung für die Elektronendichte  $\rho$  am Punkt  $x,y,z$  beinhaltet die Strukturamplituden  $|F(hkl)|$  und den relativen Phasenwinkel  $\alpha(hkl)$  eines jeden Reflexes. Das heißt also, daß jede Reflexion als sogenannte Elektronendichtewelle mit dreidimensionaler Periodizität repräsentiert wird, die durch den Miller-Index dieser Welle definiert ist. Die dreidimensionale periodische Elektronendichtefunktion wird dann durch Summation dieser Elektronendichtewellen erhalten.

Bei der Messung werden nur die Amplituden (Strukturamplituden  $|F(hkl)|$ ) der Elektronendichtewellen durch Intensitäten der Reflexe bestimmt, während die Phaseninformation verlorengegangen ist. Die fehlende Phaseninformation wird auch als „Phasenproblem der Kristallstrukturanalyse“ bezeichnet. Diese Information muß erst mit geeigneten Rechenverfahren wieder erzeugt werden.

**Lösung des Phasenproblems.** Für niedermolekulare Substanzen gibt es Verfahren, die eine direkte Rekonstruktion der Phaseninformation durch Wahrscheinlichkeitsbeziehungen erlauben. Bei Strukturanalysen von Proteinkristallen kann man die Phaseninformationen durch den Vergleich mit Beugungsbildern isostruktureller Kristalle erhalten. Dazu werden häufig elektronenreiche Elemente, d.h. Schwermetallionen, die meist an freien Histidinen oder Cysteinen koordiniert sind, in das Protein eingelagert. Das elektronenreiche Schweratom

dominiert das Beugungsbild, so daß dadurch dessen Position im Kristallverband ermittelt werden kann - und durch Vergleich mit dem unsubstituierten Protein die Phasen des unsubstituierten Proteins bestimmt werden können.

Ist die Struktur des Proteins oder eines strukturell ähnlichen Proteins bekannt, kann man die „*molecular replacement*“ Methode benutzen, um die Phaseninformation zu erhalten. Dadurch kann man die Notwendigkeit der Schweratomderivate umgehen, da bei dieser Methode der bekannte Teil einer Struktur in der Einheitszelle plaziert wird. Das ist vor allem hilfreich, wenn das bekannte Protein im Komplex mit einem neuen Liganden bzw. Inhibitor oder eine Mutante des bekannten Proteins strukturell aufgeklärt werden soll. Hierbei wird als Startstruktur eine bekannte Proteinstruktur verwendet, die möglichst eine ähnliche Einheitszelle aufweist.

**Strukturverfeinerung.** Durch die Lösung der Struktur wurde ein Strukturmodell erhalten, das durch einen Satz von Atomkoordinaten die Struktur im Wesentlichen richtig beschreibt. Man führt nun Optimierungsschritte ein, um die Differenzen zwischen dem beobachteten Beugungsbild und dem Beugungsbild, das sich aus den Atompositionen des vorherigen Modell berechnen läßt, iterativ zu minimieren. Zur Verfeinerung der Parameter bedient man sich meist der Methode der kleinsten Fehlerquadrate („*least squares*“ Methode). Ein Maß dafür, wie gut das Modell mit der „Wirklichkeit“ übereinstimmt, ist der kristallographische R-Wert, der beobachtete Strukturamplituden  $|F(hkl)|_o$  mit berechneten Strukturamplituden  $|F(hkl)|_c$  vergleicht:

$$R = \frac{\sum_{all\ hkl} \left| |F(hkl)|_o - |F(hkl)|_c \right|}{\sum_{all\ hkl} |F(hkl)|_o} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

### 2.2.5 Interpretation der Ergebnisse

Als Ergebnis einer Strukturanalyse erhält man das Abbild des Inhalts der Elementarzelle in Form einer Elektronendichte, da die Röntgenstrahlung an den Elektronen gebeugt wurde. Wie genau und detailliert die Elektronendichte bestimmt werden kann, hängt von der räumlichen Auflösung und letztendlich von der Qualität des vermessenen Kristalls ab. Durch Unordnungen und Baufehler im Kristall wird die Auflösung reduziert.

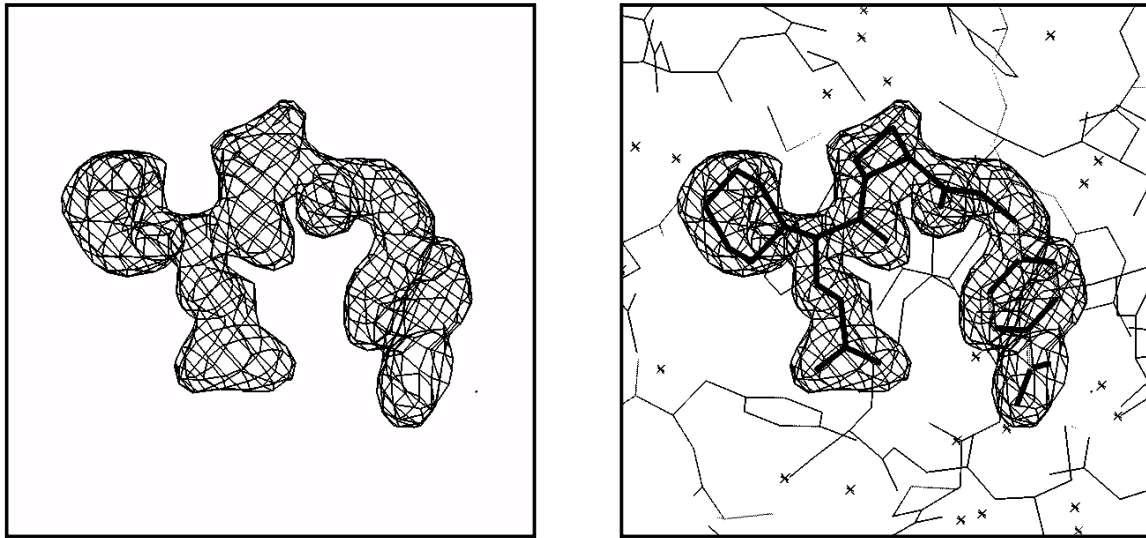
Bei niedermolekularen Strukturen ist die Auflösung meist so gut, daß die Atome der Struktur als getrennte Maxima in der Elektronendichte aufgelöst sind, während bei Proteinstrukturen die Auflösung üblicherweise in der Größenordnung einer Bindungslänge liegt. Bei der Verwendung von Drehanoden wird in der Regel keine bessere Auflösung als 1.5 Å erhalten (Mit energiereicher Synchrotronstrahlung sind auch bessere Auflösungen bei Proteinkristallen möglich).

Bei dieser Auflösung ist keine direkte Zuordnung der Atome des Proteins zu der Elektronendichte möglich. Da aber in der Regel nur zwanzig verschiedene Aminosäuren bei der Lösung der Proteinstruktur zu berücksichtigen sind, vereinfacht sich die Interpretation der Elektronendichte. Die endgültig erhaltene Proteinstruktur darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß deren Geometrie durch die Verfeinerung auf der Basis von Erfahrungswerten für Winkel- und Bindungslängen erfolgt ist, die aus Strukturen niedermolekularer Verbindungen abgeleitet wurden. Man plaziert die Aminosäure mit idealisierten Bindungslängen und -winkeln in eine Elektronendichte, die keine atomare Auflösung zeigt.

Ein Problem der Proteinkristallographie ist die Tatsache, daß die Wasserstoffatome in einer Proteinstruktur aufgrund des geringen Streuvermögens nicht zugeordnet werden können. Da die Streuung der Röntgenstrahlung an der Elektronenhülle erfolgt, ist die Amplitude der gestreuten Welle in erster Linie proportional der Elektronenanzahl des betreffenden Elementes. Weil das Wasserstoffatom aber nur ein Elektron in seiner Elektronenhülle besitzt, können diese zumindest in großen Proteinstrukturen röntgenographisch nicht lokalisiert werden. Abhilfe kann hier die energiereiche Synchrotronstrahlung schaffen, weil sehr hohe



Auflösungen für die Proteinstruktur möglich sind. Allerdings müssen für die sichere Zuordnung von Wasserstoffatomen Beugungsdaten mit einer Auflösung bis zu  $0.8 \text{ \AA}$  vorliegen, was bis jetzt nur für einige wenige Proteinstrukturen gelungen ist.



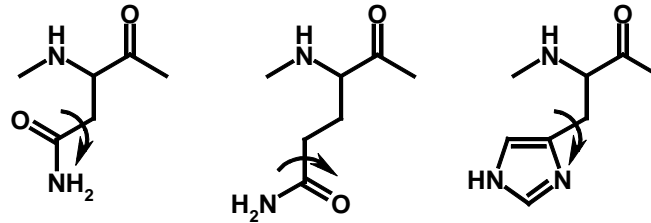
**Abbildung 2.15:** Von der Elektronendichte eines Trypsin-Inhibitor-Komplexes zur Proteinstruktur. Zur besseren Übersicht ist nur die Elektronendichte für den Inhibitor gezeigt (linke Seite). In die Dichte von  $1.9 \text{ \AA}$  Auflösung wird der Inhibitor Melagatran eingepaßt (dicke Linien: Inhibitor, dünne Linien: Protein, Kreuze: Wasser).

Neutronenstrahlung wird an Atomkernen gebeugt. Für das Streuvermögen ist nicht alleine die Masse, sondern vielmehr die Wechselwirkung mit dem Kernpotential entscheidend. Deshalb ist dies eine wichtige Anwendung für die genaue Lokalisation von Wasserstoffatomen in Wasserstoffbrückennetzwerken. Allerdings erfordern diese Experimente größere Einkristalle im Millimeterbereich und lange Meßzeiten (2 Wochen pro Kristall).

Aus der obigen Tatsache, daß Wasserstoffatome in Röntgenstrukturen von Proteinen nicht lokalisiert werden können, ergibt sich ein weiteres Problem. Es ist daher möglich zu entscheiden, ob eine Carboxylgruppe eines Aspartates oder Glutamates ionisiert oder als freie Säure, d.h. deprotoniert oder protoniert, vorliegt.

Aminosäuren bestehen hauptsächlich aus Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoffatomen, die aber aufgrund ihrer ähnlichen Elektronenanzahl nicht röntgenographisch unterschieden

werden können. So ist es nicht möglich, die richtige Konformation sowohl der Säureamidgruppen von Asparagin oder Glutamin als auch des Imidazolrings von Histidin in der Struktur eindeutig festzulegen, weil ja zusätzlich dazu auch keine Wasserstoffatome lokalisiert werden können.



**Abbildung 2.16:** Die Endgruppen der Aminosäureseitenketten von Asparagin, Glutamin und Histidin (von links nach rechts) sind der Elektronendichte von Proteinkristallen nicht eindeutig zuzuordnen. Die gekrümmten Pfeile deuten die Flexibilität an.

Das heißt also, daß die Lage von Akzeptorgruppen und Donorgruppen in Proteinen nicht mit letzter Gewißheit bestimmt werden kann. Allerdings lassen sich Hinweise indirekt aus der Proteinstruktur gewinnen, wenn man die räumliche Anordnung von umgebenden Wasserstoffbrückenpartnern einbezieht. Durch Überprüfung eines in sich konsistenten Wasserstoffbrückennetzwerkes mit der lokalen Umgebung versucht man, eine korrekte Platzierung dieser Baugruppen vorzunehmen.

Proteinkristalle bestehen zu einem großen Teil aus Wasser. Da die Wasserstoffatome des Wassers nicht als Dichtezentren aufgelöst werden, kann man nur das Sauerstoffatom des Wassers zuordnen, d.h. daß auf die räumliche Ausrichtung wiederum nur indirekt durch Analyse des Wasserstoffbrückennetzwerkes geschlossen werden kann, wenn die Umgebung eine eindeutige Festlegung erlaubt.

Weiterhin sind die Elektronendichten von Natriumionen in Proteinkristallen nicht von der Dichte für Wassermoleküle zu unterscheiden, weil Wassermoleküle und Natriumionen die gleiche Elektronenzahl und deshalb gleiches Streuvermögen besitzen. In gut aufgelösten

Strukturen von niedermolekularen Verbindungen lassen sich die Wassermoleküle von Natriumionen unterscheiden. Es zeigt sich, daß Wassermoleküle in der Regel tetraedrisch koordiniert sind. Diese Erkenntnis läßt sich aber nicht ohne weiteres auf Proteinstrukturen übertragen. Während Natriumionen in der Regel oktaedrisch von Wasserstoffbrückenakzeptorgruppen umgeben sind, können Wassermoleküle tetraedrisch, aber auch höher koordiniert sein. Allerdings sind diese verzerrt trigonal bipyramidalen bzw. verzerrt oktaedrischen Strukturen wahrscheinlich das Produkt der Überlagerung zweier Konformationen in der Umgebung des Wassers oder mehrerer Konfigurationen des Wassers selbst bzw. ein Hinweis auf die Flexibilität in der Teilstruktur, da die Röntgenstrukturanalyse diese Flexibilität nicht zeitlich auflösen kann.

### **2.3 Titrationskalorimetrie**

Die Anzahl kalorimetrischer Messungen (Ladbury & Chowdhry, 1998) an Systemen von biochemischem Interesse hat in den letzten Jahren aufgrund der Entwicklung und der Verfügbarkeit hoch empfindlicher Meßgeräte auf den Gebieten der „Dynamischen Differenzkalorimetrie“ (engl.: *„differential scanning calorimetry“*, DSC) und der „Isothermen Titrationskalorimetrie“ (engl.: *„isothermal titration calorimetry“*, ITC) erheblich zugenommen. Diese Entwicklungen haben es möglich gemacht, den zahlenmäßigen Umfang zuverlässiger biophysikalischer und biochemischer Daten von Jahr zu Jahr wachsen zu lassen. Gerade diese direkt gemessenen thermodynamischen Daten sind wichtige Ergänzungen zu den Daten, die durch andere Techniken wie optische Absorption, Zirculardichroismus und „Magnetischer Kernresonanzspektroskopie“ (NMR) auf indirektem Wege zugänglich sind.

Die Strukturen vieler biologisch wichtiger Moleküle (Enzyme, Rezeptoren usw.) kommen durch die kooperative Wechselwirkung vieler einzelner inter- bzw. intramolekularer Wechselwirkungen zustande. Diese hoch organisierten Strukturen durchlaufen strukturelle und konformative Veränderungen, wenn sie erhitzt oder abgekühlt werden. Durch die Messung dieser strukturellen und energetischen Veränderung sind wichtige Informationen über die Natur von Wechselwirkungen innerhalb dieser Strukturen möglich. Die Anwendung

von DSC-Instrumenten hat es möglich gemacht, diese Effekte quantitativ zu messen. Das zu messende System wird in der kalorimetrischen Zelle langsam aufgeheizt. Im Meßergebnis wird die Wärmekapazität, die mathematisch gesehen die erste Ableitung der Entalpie nach der Temperatur ist, als direkte Meßgröße gegen die Temperatur aufgetragen.

Im Gegensatz dazu mißt die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) die Energetik von biochemischen Reaktionen oder Wechselwirkungen (Phänomene der Ligandenbindung, Enzym-Substrat-Wechselwirkungen usw.) bei konstanter Temperatur.

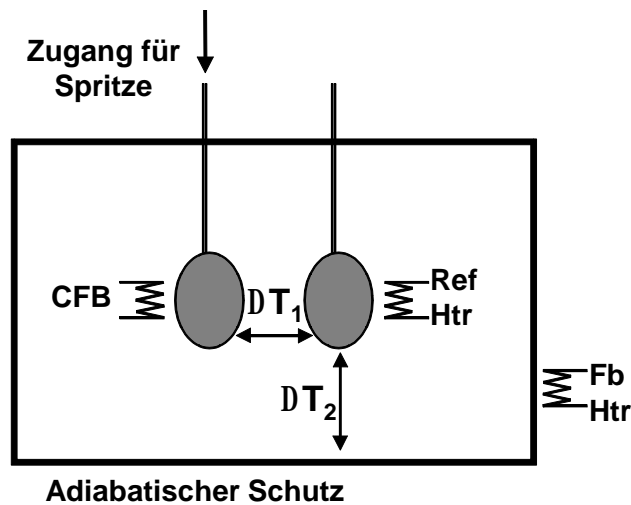
### 2.3.1 Beschreibung des Gerätes

Die folgende Gerätebeschreibung bezieht sich das MCS-ITC Kalorimeter (Wiseman *et al.*, 1989) der Firma MicroCal Inc. (Northampton, USA).

Das Kalorimeter besteht aus zwei Zellen, die aus einer chemisch resistenten *Hastelloy C* Legierung hergestellt wurden, je ein Volumen von etwa 1.4 ml haben und sich in einem adiabatischen Schutzschild befinden, um Wärmeaustausch mit der Umgebung auszuschließen. Die eine Zelle dient als Referenzzelle und ist bei Messungen von wäßrigen Systemen mit entgastem Wasser gefüllt, in der anderen Zelle, der Meßzelle, findet die Reaktion statt. Während die Referenzzelle verschlossen ist, besitzt die Meßzelle einen schmalen, nach oben hin offenen Zugang für die Spritze. Die eingesetzte Spritze (100 µl bzw. 250 µl Volumen) schließt die Meßzelle nach oben hin ab. An ihrer Spitze geht die langnadelige Speziälspritze, deren Kolben durch einen Schrittmotor bewegt werden kann und die am oberen Ende mit einem Motor verbunden ist, der die Spritze drehen kann, in einen kleinen Rührer über. Dieser dient dazu, den Inhalt der Meßzelle während der gesamten Meßdauer bei konstanter Rührgeschwindigkeit (ca. 300 bis 400 Umdrehungen pro Minute) zu durchmischen.

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. Während einer Messung wird der Referenzzelle ein konstanter Heizstrom von weniger als einem Milliwatt zugeführt. Die dadurch auftretende Temperaturdifferenz  $\Delta T_1$  zwischen den

beiden Zellen aktiviert die unabhängige Kompensationsheizung der Meßzelle, um die Temperaturdifferenz  $\Delta T_1$  wieder auszugleichen, d.h. um die Differenz  $\Delta T_1$  wieder auf Null zu bringen. Dieser Heizstrom der Meßzelle ist bei Abwesenheit jedweder Reaktion konstant und bildet deshalb die Basislinie der Wärmetönungen. Als Meßsignal dient bei der isothermen Titrationskalorimetrie der Heizstrom, der der Meßzelle zugeführt werden muß, um die Temperaturdifferenz  $\Delta T_1$  wieder auszugleichen.



**Abbildung 2.17:** Schematische Darstellung des isothermen Titrationskalorimeters mit Meßzelle (links) und Referenzzelle (rechts), die durch das Heizelement RefHtr („reference heater“) geheizt wird.  $DT_1$  aktiviert das Heizelement CFB („cell feedback“), während  $DT_2$  das Heizelement FbHtr („feedback heater“) aktiviert.

Das Gerät kann exotherme und endotherme Reaktionen verfolgen. Wenn ein Aliquot des Spritzeninhaltes in die Zelle injiziert wird, läuft eine Reaktion ab. Bei einer exothermen Reaktion wird Reaktionswärme freigesetzt, d.h. daß sich der Inhalt der Meßzelle erwärmt. Um die Temperaturdifferenz  $\Delta T_1$  wieder auszugleichen, wird der Heizstrom für die Meßzelle verringert, so daß sich ein negatives Signal ergibt. Läuft eine endotherme Reaktion ab, muß der Heizstrom der Meßzelle erhöht werden, um das entstehende Wärmedefizit in dieser Zelle wieder auszugleichen. Das Meßsignal ist in diesem Falle positiv.

Um einen Wärmefluß zwischen den Zellen und deren Umgebung zu verhindern, mißt ein separates Thermoelement die Temperaturdifferenz  $\Delta T_2$  zwischen den beiden Zellen einerseits

und dem adiabatischen Schild andererseits, so daß das Heizelement des äußeren Schildes die Differenz  $\Delta T_2$  kompensiert. Das Gerät arbeitet nur bei Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur zuverlässig, da die Temperaturdifferenzen  $\Delta T_1$  und  $\Delta T_2$  ausschließlich durch Heizelemente kompensiert werden.

Für Messungen bei Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur muß das gesamte Kalorimeter mittels eines Wasserbades gekühlt werden. Dazu besitzt das Kalorimeter Kühlspiralen, die das Gerät im Inneren umgeben.

Das Kalorimeter wird bei mit Wasser gefüllter Meßzelle mit Hilfe von elektrischen Standardpulsen kalibriert. Die Sensitivität (absolutes Detektionslimit) des Geräts liegt bei weniger als 2  $\mu\text{J}$ , was bei einem Volumen von 1.4 ml reinem Wassers einer Temperaturänderung von weniger als  $10^{-6}$  K entspricht. Die Reaktionszeit des Kalorimeters ist wegen der aktiv gesteuerten Wärmekompensation geringer als die für ein Kalorimeter, das mit passivem Wärmetransfer arbeitet. Die beste Performance (schnellste Reaktion ohne Überkompensation) liegt bei 6 bis 7 Sekunden.

### 2.3.2 Bindungssimulation

Die reversible Bindung zwischen Protein P und einem Liganden L zum Komplex PL wird im thermodynamischen Gleichgewicht durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben:

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Die Gesamtkonzentration  $[L]_{\text{tot}}$  des Liganden in der Zelle ist die Summe aus der Konzentration  $[L]$  des Liganden L in ungebundener Form und der Konzentration  $[PL]$  des Liganden L im Komplex mit dem Protein P. Entsprechend ist die Gesamtkonzentration  $[P]_{\text{tot}}$  die Summe der Konzentration  $[P]$  für das freie Protein P und der Konzentration  $[PL]$  für das komplexierte Protein PL.

$$[L]_{tot} = [L] + [PL] \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

$$[P]_{tot} = [PL] + [P] = [PL] + \frac{[PL]}{K[L]} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Durch Auflösen der Gleichung 2.4 nach [L] und anschließender Substitution in Gleichung 2.5 ergibt sich durch Umstellung folgende quadratische Gleichung:

$$[PL]^2 + [PL] \left( -[P]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K} \right) + [P]_{tot} [L]_{tot} = 0 \quad (\text{Gleichung 2.6}),$$

deren einzige positive Wurzel ist:

$$[PL] = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4a}}{2} \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

mit

$$b = -[P]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K} \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

$$a = [P]_{tot} [L]_{tot} \quad (\text{Gleichung 2.9})$$

Durch die Ableitung der Konzentration [PL] nach der Konzentration  $[L]_{tot}$  und Umstellung der entsprechenden Gleichung ergibt sich:

$$\frac{d[PL]}{d[L]_{tot}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{\sqrt{X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2}} \quad (\text{Gleichung 2.10})$$

mit

$$r = \frac{1}{K [P]_{tot}} \quad (\text{Gleichung 2.11})$$

$$X_r = \frac{[L]_{tot}}{[P]_{tot}} \quad (\text{Gleichung 2.12})$$

In einem kalorimetrischen Titrationsexperiment wird ein kleines Volumen der Ligandenlösung in die Zelle mit der Proteinlösung eingespritzt. Bei der Einspritzung wird eine bestimmte Wärme  $Q$  freigesetzt oder absorbiert, die in ihrer Größe von dem Zellvolumen  $V$ , den Konzentrationen, der molaren Bindungsenthalpie  $\Delta H$ , der Stöchiometrie und der Menge des eingespritzten Liganden abhängt. Mit anderen Worten heißt das, daß sich die Konzentration an unbesetzten Bindetaschen mit der abnehmenden Wärmeentwicklung entsprechend verringert. Die Änderung  $d[PL]$  der Konzentration  $[PL]$  ist proportional zur Änderung  $dQ$  der Wärmemenge  $Q$ .

$$dQ = d[PL] \cdot \Delta H \cdot V \quad (\text{Gleichung 2.13})$$

Durch Einsetzen der Beziehung von Gleichung 2.10 in Gleichung 2.13 ergibt sich für eine Bindungsreaktion zwischen einem Protein und einem Liganden im Verhältnis 1:1 folgende Beziehung:

$$\frac{1}{V} \cdot \frac{dQ}{d[L]_{tot}} = \Delta H \left\{ \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r}{2} - \frac{X_r}{2}}{\sqrt{X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2}} \right\} \quad (\text{Gleichung 2.14})$$

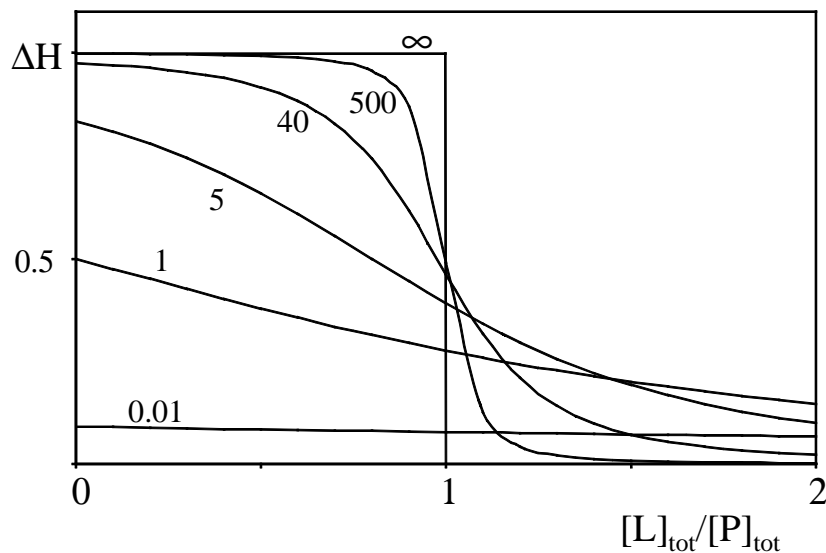


Der experimentelle Parameter, den man aus einer Messung mit dem Titrationskalorimeter bestimmt, ist die differentielle Wärme  $dQ / d[L]_{\text{tot}}$ . Allerdings hängt dieser Wert nicht von der absoluten Konzentration  $[P]_{\text{tot}}$  des Proteins in der Meßzelle ab, sondern nur von dem Wert relativ zur Bindungskonstanten  $K$  und zur Gesamtkonzentration  $[L]_{\text{tot}}$  des Liganden in der Meßzelle.

Simulierte Bindungskurven bezüglich der Gleichung 2.14 sind in Abbildung 2.18 dargestellt. Für die Interpretation dieser Kurven wird ein zusätzlicher Parameter  $c$  eingeführt, der reziprok zum Wert  $r$  aus Gleichung 2.11 ist.

$$c = \frac{1}{r} = K [P]_{\text{tot}} \quad (\text{Gleichung 2.15})$$

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. daß alle katalytischen Zentren besetzt sind. Als Bindungskurve ergibt sich dann eine Stufenfunktion mit der Höhe  $\Delta H$ .



**Abbildung 2.18:** Simulierte Bindungsisotherme nach Gleichung 2.14 für verschiedene Parameter  $c = K [P]_{\text{tot}}$ . Die Werte für  $c$  sind in der Abbildung dargestellt.

Für relativ starke Ligandenbindungen mit  $c = 5$  bis 500 steht diese Stufenfunktion in eine sigmoidale Kurve über, deren Verlauf stark von dem Parameter  $c$  abhängt. Schwache Ligandenbindungen ergeben fast horizontale Bindungskurven ( $c < 5$ ), die nur wenig Informationen über die Bindungskonstante  $K$  enthalten.

### 2.3.3 Durchführung der Messungen

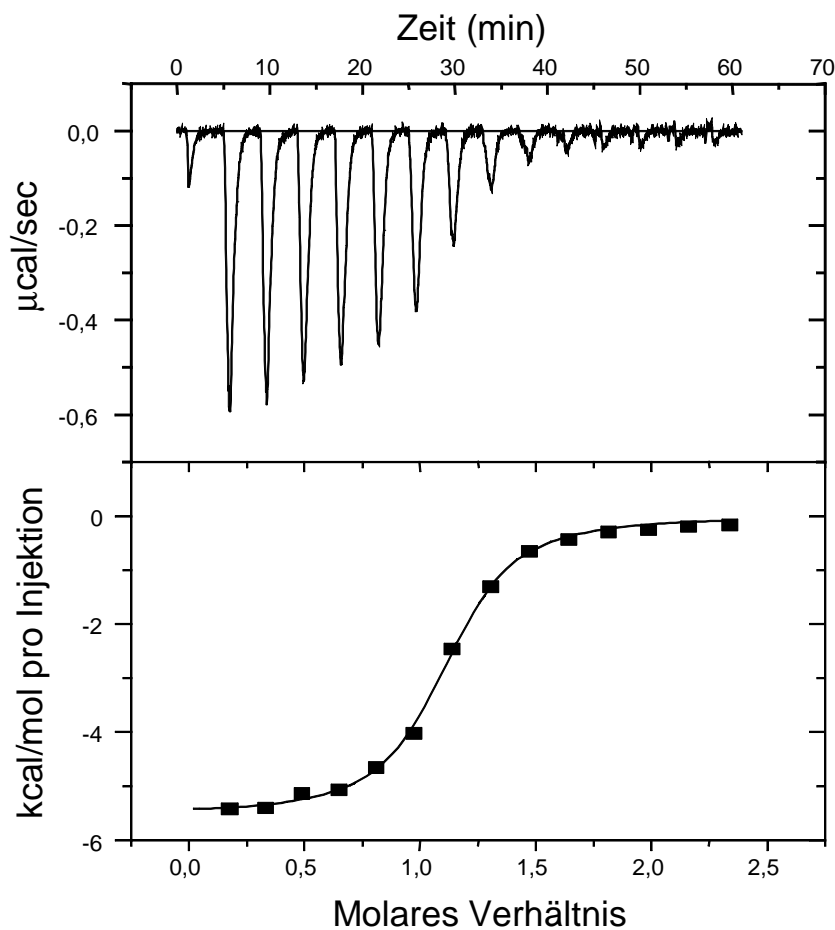
Sowohl das Protein als auch der Ligand müssen in denselben Pufferlösungen, die bezüglich des pH-Wertes, der Zusammensetzung und der Konzentrationen der gelösten Stoffe identisch sein müssen, vorgelegt werden. Ist dies nicht der Fall, so sind die Wärmemengen, die durch das Mischen der verschiedenen Pufferlösungen in der Meßzelle entstehen, um ein vieles größer als die Wärmetönungen, die durch die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein entstehen.

Bevor sowohl Spritze als auch Zelle mit den Lösungen von Ligand bzw. Protein gefüllt werden können, müssen beide Lösungen durch Rühren unter Vakuum vollständig entgast werden. Die Meßzelle und Spritze müssen so gefüllt werden, daß beide frei von Luftblasen sind, die das Experiment sonst stören würden. Nach dem Einsetzen der Spritze in das Kalorimeter und nach dem Beginn des Rührens durch die Spritze dauert es etwa 20 Minuten, bis das Kalorimeter mit den Meßlösungen vollständig äquilibriert ist.

Während des Titrationsexperiments werden üblicherweise 10 bis 25 Aliquote der Ligandenlösung von etwa 5 bis 25  $\mu\text{l}$  Volumen in die Meßzelle eingespritzt, in der die Proteinlösung vorgelegt ist. Die durchschnittliche Meßzeit zwischen zwei Einspritzungen hängt von der Geschwindigkeit der Reaktion ab und liegt zwischen 2 und 5 Minuten, bis sich die Basislinie wieder stabilisiert hat. Das optimale Volumen einer Injektion ist abhängig von den Inhibitor- und Proteinkonzentrationen, der Größe der Spritze (100 oder 250  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen), der erwarteten Wärmetönung und der Bindungskonstanten  $K$ .

Die endgültige Gesamtkonzentration  $[L]_{\text{tot}}$  des Liganden nach der letzten Injektion sollte zweimal die Gesamtkonzentration  $[P]_{\text{tot}}$  des Proteins betragen, so daß die letzten Injektionen nur noch Wärmetönungen aufgrund der Verdünnungswärme des Liganden verursachen, weil das Protein dann vollständig abgesättigt ist. Diese Verdünnungswärmen müssen daher von der eigentlichen Bindungsisothermen subtrahiert werden.

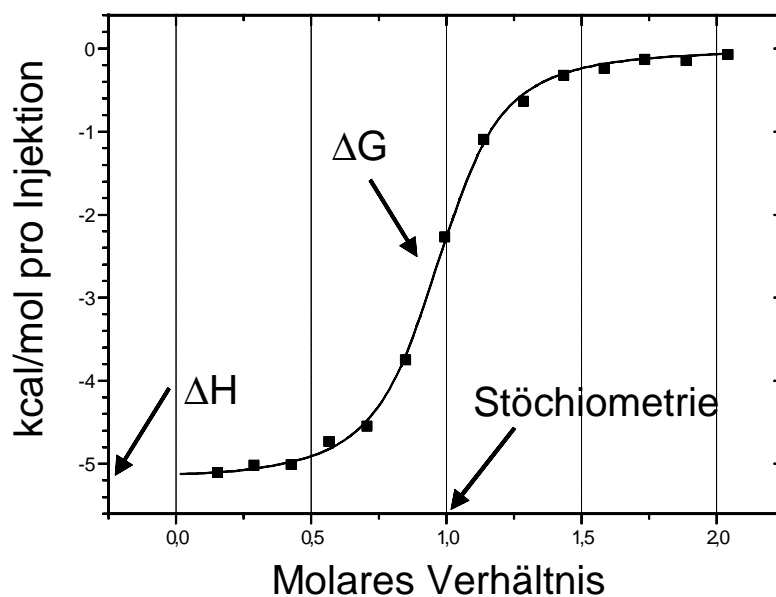
Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Wärmen für die Injektion der Ligandenlösung in die Pufferlösung ohne Protein zu messen und die Werte dieser Leermessung (engl. „blank“) von der eigentlichen Messung abzuziehen.



**Abbildung 2.19:** Ergebnis einer ITC-Messung. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten einer typischen ITC Messung. Jeder Peak steht 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. Die durchgezogene Kurve repräsentiert das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate.

Die Simulation der Bindungsisothermen zeigt, daß der dimensionslose Parameter  $c$ , der gleich dem Produkt aus der Bindungskonstanten  $K$  und der Gesamtkonzentration  $[P]_{\text{tot}}$  vom Protein in der Meßzelle ist, die Form der Bindungskurve bestimmt. Große Werte für  $c$  deuten auf eine große Bindungskonstante hin, während bei konstanter Enzymkonzentration kleine Werte für schwache Bindungen stehen.

Im Bereich für  $c = 5$  bis  $500$  ist es möglich, einen genauen Wert der Bindungskonstanten  $K$  zu erhalten. Ist der Wert von  $c$  viel größer als  $500$ , ist die Bindungsisotherme zu steil, d.h. diese besteht aus zu wenigen Meßwerten im Bereich des Wendepunktes, um die Bindungskonstante  $K$  zu bestimmen. Ist der  $c$ -Wert zu klein, läßt der flache Kurvenverlauf keine Bestimmung der Bindungskonstanten  $K$  zu.



**Abbildung 2.20:** Auswertung einer ITC Messung. Die Meßpunkte in der Abbildung entsprechen jeweils dem Integral der Meßsignale. Die durchgezogene Kurve repräsentiert das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate repräsentiert die Bindungsenthalpie  $\Delta H$ , aus dem Kurvenverlauf läßt sich die Freie Bindungsenthalpie  $\Delta G$  und somit auch die Bindungskonstante  $K$  bestimmen.

Es ist offensichtlich, daß Reaktionen mit großem K-Wert bei einer kleinen Gesamtkonzentration  $[P]_{\text{tot}}$  des Proteins in der Meßzelle durchgeführt werden müssen. Weil die Verringerung der Proteinkonzentration und die damit einhergehende zwangsläufige Verringerung der Ligandenkonzentration aber gleichzeitig die Wärmetönung der Reaktion so weit verringern kann, daß das Detektionslimit unterschritten wird, ist es in diesen Fällen nur möglich, die Stöchiometrie  $n$  und die Bindungenthalpie  $\Delta H$ , nicht aber nicht die Bindungskonstante  $K$  zu bestimmen.

#### 2.3.4 Datenanalyse

Der Vorteil der Titrationskalorimetrie besteht in der Tatsache, daß die Bindungsisotherme aus der Reaktionswärme der beobachteten Reaktion ermittelt wird und deshalb die direkte Bestimmung der Enthalpieänderung  $\Delta H$  ermöglicht. Die direkte Bestimmung der Enthalpieänderung ist mit keiner anderen Methode möglich.

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

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad (\text{Gleichung 2.16}),$$

wobei  $K$  die Gleichgewichtskonstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $R$  die Gaskonstante sind.

Der  $K_i$ -Wert ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor Komplexes.  $K_i$  ist die Konzentration des Inhibitors, bei der 50% der Enzymaktivität gegenüber einem Substrat

gehemmt ist, wenn die Substratkonzentration auf Null extrapoliert wird. Üblicherweise werden Inhibitionskonstanten  $K_i$ , die sich reziprok zur Bindungskonstanten  $K$  verhalten, durch kinetische Experimente vermessen. Eine Möglichkeit ist die Messung von Katalysegeschwindigkeiten bei verschiedenen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen und bei kompetitiver Hemmung des Enzyms. Durch spektroskopische Messung der Abspaltungsrate eines Chromophors vom Substrat wird die Reaktion verfolgt. Der  $K_i$ -Wert ergibt sich dann aus der Anwendung der Gleichungen der Michaelis-Menten-Kinetik. Diese spektroskopische Methode hat den Vorteil, daß nur sehr kleine Mengen an Substanz bei den Messungen verbraucht werden. Weil aber die Bindungskonstante nur bei ungefähr äquivalenten Konzentrationen (Produktkonzentration  $\approx K_i$ ) genau gemessen werden kann, sind die gemessenen Signale oft relativ klein, so daß signifikante Fehler auftreten können. Tame (1999) gibt an, daß Messungen von  $K_i$ -Werten mit Fehlern von bis zu 50% behaftet sein können.

Obleich die van't Hoff Enthalpie  $\Delta H_{vH}$  identisch zur kalorimetrisch bestimmten Enthalpie  $\Delta H$  sein sollte, werden zahlreiche Beispiele zitiert, bei denen größere Differenzen zwischen den Enthalpien beider Bestimmungsmethoden beobachtet werden (Liu & Sturtevant, 1995; Naghibi *et al.*, 1995).

Weil die Änderung der Enthalpie ein nahezu ubiquitäres Kennzeichen für molekulare Wechselwirkungen ist, zeigen praktisch alle wichtigen Reaktionen ein meßbares kalorimetrisches Signal. Deshalb bietet die Titrationskalorimetrie die Möglichkeit der direkten Bestimmung nicht nur der Bindungskonstante sondern auch der Enthalpie, Entropie und Stöchiometrie mit nur einer Messung. Nur für Systeme, bei denen  $\Delta H$  gleich Null ist, ergibt sich kein meßbares kalorimetrisches Signal.

Die Freie Bindungsenthalpie  $\Delta G$  besteht nach der Gibbs-Funktion aus zwei energetischen Komponenten: Enthalpie  $\Delta H$  und Entropie  $\Delta S$ :

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Gleichung 2.17})$$

---

Bei den Größen  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  und  $\Delta S$  handelt es sich immer um Standardgrößen unter Gleichgewichtsbedingungen, also genau  $\Delta G^0$ ,  $\Delta H^0$  und  $\Delta S^0$ . Zur besseren Übersicht werden die Indizes im folgenden nicht berücksichtigt.

Über eine weitere Gleichung ist die Freie Enthalpie  $\Delta G$  mit den verschiedenen Gleichgewichtskonstanten in Beziehung:

$$\Delta G = -RT \ln K = RT \ln K_D \quad (\text{Gleichung 2.18}),$$

wobei  $K$  die Bindungskonstante (oder auch Assoziationskonstante),  $K_D$  die Dissoziationskonstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $R$  die Gaskonstante sind.

$$K = \frac{1}{K_D} = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (\text{Gleichung 2.19})$$

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Nomenklatur für die Bindungskonstante  $K$  und die Dissoziationskonstante  $K_D$  beibehalten. Um die thermodynamisch bestimmten Dissoziationskonstanten eindeutig von den durch kinetisch-spektroskopische Messungen bestimmten zu unterscheiden, werden die letzteren als  $K_i$ -Werte bezeichnet. Die kinetisch bestimmten  $K_i$ -Werte sind den  $K_D$ -Werten sehr ähnlich (siehe auch Diskussion der Ergebnisse in den Kapiteln 3 und 4).

$$K_i \approx K_D \quad (\text{Gleichung 2.20})$$

$$\Delta G \approx RT \ln K_i \quad (\text{Gleichung 2.21})$$

**Enthalpie.** Es ist noch einmal wichtig klarzustellen, daß die mit einem ITC-Gerät gemessene Enthalpie  $\Delta H$  die gesamte Wärmetönung des kompletten Systems darstellt. Das beinhaltet sowohl die Wechselwirkungen zwischen den reagierenden Molekülen als auch Wärme-

tönungen, die durch weitere Prozesse entstehen, zum Beispiel durch konformative Änderungen, Ionisierung von polaren Gruppen (siehe Kapitel 2.3.5) und Wechselwirkungen mit den anderen Pufferkomponenten. Wird bei der Datenanalyse die Bindungsisotherme ohne entsprechende Korrektur an die Meßpunkte angepaßt, so erhält man nicht die Enthalpie des eigentlichen Bindungsschritts, sondern eine um die überlagerte Reaktion modulierte Enthalpie.

Für den Fall, daß einer der beiden Reaktionspartner vor der Bindung in assoziierter Form vorliegt und vor der eigentlichen Bindung dissoziiert, sollte diese Dissoziationswärme nicht in die Bindungsdaten einbezogen werden. Außerdem kann ein solcher konzentrationsabhängiger Prozeß zu einer asymmetrischen Bindungsisotherme führen. Die Korrektur der Bindungsdaten um die Ionisierung einzelner Gruppen im Protein bzw. Liganden ist Gegenstand des nächsten Kapitels und soll an dieser Stelle deshalb nicht weiter diskutiert werden.

**Bindungskonstanten.** Es ist zu beachten, daß Messungen im Bereich der Gleichgewichtsthermodynamik keine Aussagen über die Geschwindigkeit einer Assoziation machen können, d.h. daß hier nicht die Kinetik einer Bindung betrachtet wird, sondern die energetischen Änderungen, die sich auf den Wechsel zwischen zwei Zuständen beziehen. In einem ITC-Experiment wird die Abgabe (exothermer Prozeß) bzw. die Aufnahme (endothermer Prozeß) von Wärme registriert. Der Grad der Wechselwirkungen wird durch das Massenwirkungsgesetz (Gleichung 2.19) mit der Bindungskonstanten  $K$  beschrieben.

Die Wärmemessungen sind analog zu den Messungen, die verschiedene physikalische Eigenschaften messen, um die Bindungskonstante  $K$  zu bestimmen. In spektroskopischen Methoden wird das Ausmaß der Reaktion zum Beispiel anhand von Änderungen in der Absorption oder Fluoreszenz einer chromogenen Komponente verfolgt. Die Eigenschaftsänderungen werden bei verschiedenen molaren Verhältnissen zwischen Ligand und Protein von Null bis zu einem großen Überschuß gemessen.

Um das Gleichgewicht zu beschreiben, ist es notwendig, bei Konzentrationen zu arbeiten, bei denen signifikante Mengen von freiem Liganden, freiem Protein und dem 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  $K$  und somit auch die Freie Enthalpie  $\Delta G$  aufgrund des sigmoiden



Kurvenverlaufs der Bindungsisothermen bestimmt werden (vergleiche auch die Argumentation in Kapitel 2.3.2 bezüglich der Gleichung 2.15). Sind die Konzentrationen im Verhältnis zur Dissoziationskonstanten zu hoch, sind im sigmoiden Bereich der Bindungsisothermen zu wenige Meßpunkte zur präzisen Kurvenanpassung vorhanden. Bei zu niedrigen Konzentrationen wird die Bindungsisotherme nahezu eine horizontale Kurve, die keine präzisen Informationen bezüglich der Bindungskonstanten  $K$  mehr in sich trägt (Abbildung 2.18).

**Entropie.** Nach der Bestimmung der Enthalpie  $\Delta H$  und der Bindungskonstanten  $K$  durch eine ITC-Messung wird der entropische Beitrag  $\Delta S$  mit Hilfe der Gleichungen 2.17 und 2.18 berechnet. Dabei macht man sich zunutze, daß die Freie Enthalpie  $\Delta G$  proportional dem natürlichen Logarithmus der Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten ist. Da bei konstanter Temperatur gemessen wird, kann der Anteil  $-T\Delta S$  aus der Differenz von Freier Enthalpie  $\Delta G$  und Enthalpie  $\Delta H$  mit Hilfe von Gleichung 2.17 bestimmt werden. Wie schon bei den Betrachtungen über die Enthalpie beschrieben (siehe oben), sind auch in dem Term der Entropie alle Beiträge des gesamten Systems in der Meßzelle enthalten.

**Stöchiometrie.** Ein weiterer Vorteil der ITC-Methode für die Untersuchung von biomolekularen Wechselwirkungen ist die Möglichkeit, die Stöchiometrie der Umsetzung direkt aus der Bindungsisothermen zu bestimmen, wenn mit 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 (gebunden und ungebunden) oberhalb der Gesamtkonzentration des Proteins (unkomplexiert und komplexiert) liegt, weil nur dann eine Stufenfunktion erhalten wird, an der sich die Stöchiometrie direkt ablesen läßt (siehe Abbildung 2.18). Ist die Konzentration zu niedrig bezüglich der Dissoziationskonstanten  $K_D$  (vergleiche  $c$ -Wert aus Gleichung 2.15), geht die Bindungsisotherme von einer sigmoiden Kurve in eine fast horizontale Kurve über, die keine exakten Informationen über die Stöchiometrie mehr zuläßt (Abbildung 2.18).

Durch Benutzung von Standardsoftware zur Datenanalyse bei der ITC wurden für die Wechselwirkung vom *trp* Repressorprotein mit einem Oligonucleotid (*trp*-Operator) durch die Anpassung der Bindungsisothermen an die Meßwerte zwei unabhängige Bindungsmodi gefunden (Ladbury *et al.*, 1994).

**Änderung der Wärmekapazität.** Die ITC erlaubt die direkte Messung der Bindungsenthalpie  $\Delta H$ . Bestimmt man die Bindungsenthalpie einer Reaktion über einen Temperaturbereich, so kann die Änderung der Wärmekapazität bei konstantem Druck unter der Voraussetzung, daß  $\Delta C_p$  temperaturunabhängig ist, durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_2} - \Delta H_{T_1}}{T_2 - T_1} \quad (\text{Gleichung 2.22})$$

$T_1$  und  $T_2$  sind hierbei zwei verschiedene experimentelle Temperaturen und  $\Delta H_{T_1}$  und  $\Delta H_{T_2}$  die dazugehörigen Enthalpiewerte. Wenn die  $\Delta H$ -Werte für eine Reihe von Titrationsexperimenten gegen die korrespondierenden Temperaturen aufgetragen werden, so bestimmt die Steigung des Graphen den  $\Delta C_p$ -Wert.

Daß biologische Reaktionen fast immer zu einer Veränderung der Wärmekapazitäten führen, hat auch eine praktische Bedeutung für die ITC-Experimente. Ist das Signal für die Enthalpie bei der Meßtemperatur zu klein, um eine präzise Aussage über die Bindungsdaten zu machen, kann die Reaktion bei einer anderen Temperatur durchgeführt werden, um eine vollständig auswertbare Bindungsisotherme zu erhalten.

### 2.3.5 Ionisierungsreaktionen

Kalorimetrische Untersuchungen von biologischen Systemen werden in gepufferten Lösungen durchgeführt, um den pH-Wert konstant zu halten. Werden gleichzeitig mit der eigentlichen Bindungsreaktion Protonen vom beobachteten System aufgenommen oder abgegeben, so ist

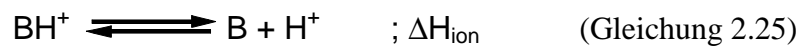
die Enthalpie, die auf diese Protonierungsreaktion zurückzuführen ist, ein Teil der gemessenen Gesamtenthalpie. Die Reaktion der Protonierung läuft folglich simultan zur Assoziationsreaktion zwischen Ligand und Protein ab.

Als Beispiel wird eine Reaktion zwischen einem Protein P und dem Liganden L betrachtet:



Das Protein P bildet mit dem Liganden L den Komplex PL. Falls sich der Protonierungszustand bei dieser Assoziationsreaktion ändert, können vom System entweder n Protonen aufgenommen ( $n > 0$ ) oder n Protonen abgegeben ( $n < 0$ ) werden. Der Wert  $\Delta H_{\text{bind}}$  beschreibt die intrinsische Bindungsenthalpie unter der Annahme, daß die ionisierbare funktionelle Gruppe von P bzw. L keine von Null verschiedene Ionisierungsenthalpie aufweist.

Wenn diese Reaktion in einer gepufferten Lösung stattfindet, so werden von der Puffersubstanz  $BH^+$  Protonen aufgenommen oder abgegeben.



Das heißt also, daß die Protonen, die vom System aufgenommen werden, von der Puffersubstanz abgegeben werden und umgekehrt.

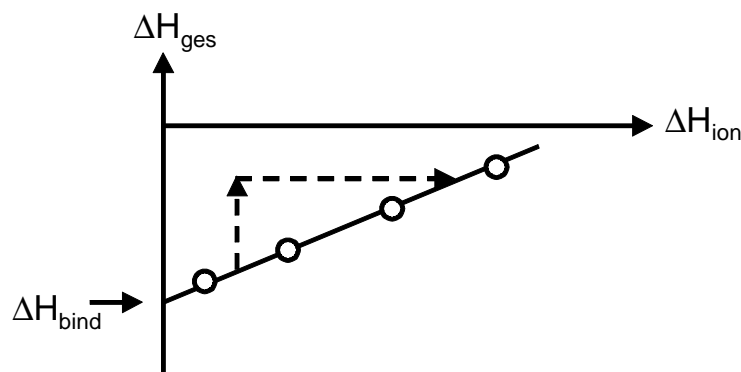
Wenn man die intrinsische Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  der Protein-Liganden-Bindung und die Enthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$ , die mit der Protonenaufnahme oder –abgabe des Puffers zusammenhängt, betrachtet, so ist die kalorimetrisch gemessene Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  die Summe dieser beiden Enthalpien.

$$\Delta H_{\text{ges}} = \Delta H_{\text{bind}} + n \Delta H_{\text{ion}} \quad (\text{Gleichung 2.26})$$

Das bedeutet, daß für die richtige Bestimmung der intrinsischen Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  der Beitrag des Puffers von der gemessenen Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  abgezogen werden muß.

Um aber den richtigen Beitrag des Puffers für die Bestimmung der intrinsischen Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  zu ermitteln, muß man die betreffende Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  des Puffers und die Anzahl  $n$  der übertragenen Protonen kennen.

In der Praxis wird die kalorimetrische Messung eines Protein-Liganden-Systems bei konstantem pH-Wert und konstanter Temperatur mit verschiedenen Puffern wiederholt, die sich in ihren Ionisierungsenthalpien signifikant unterscheiden (z. B. hat Phosphat eine viel kleinere Ionisierungsenthalpie als TRIS). Ansonsten muß die Zusammensetzung der Pufferlösung bezüglich der weiteren Komponenten wie z.B. anorganischer Salze völlig identisch sein, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Wenn nun die gemessenen Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  gegen die jeweiligen Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_{\text{ion}}$  der Puffer-substanzen aufgetragen werden, so bestimmt der Achsenabschnitt auf der  $\Delta H_{\text{ges}}$ -Achse die intrinsische Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  des betrachteten Systems. Aus der Steigung der Regressionsgeraden läßt sich dann der Parameter  $n$  bestimmen, der für die Anzahl der übertragenen Protonen steht.



**Abbildung 2.21:** Gemessene Enthalpie  $\Delta H_{\text{ges}}$  aufgetragen gegen die jeweilige Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$ . Die Steigung der angepaßten Geraden ergibt die Anzahl  $n$  der übertragenen Protonen. Der Abschnitt auf der  $\Delta H_{\text{ges}}$ -Achse bestimmt die intrinsische Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$ .

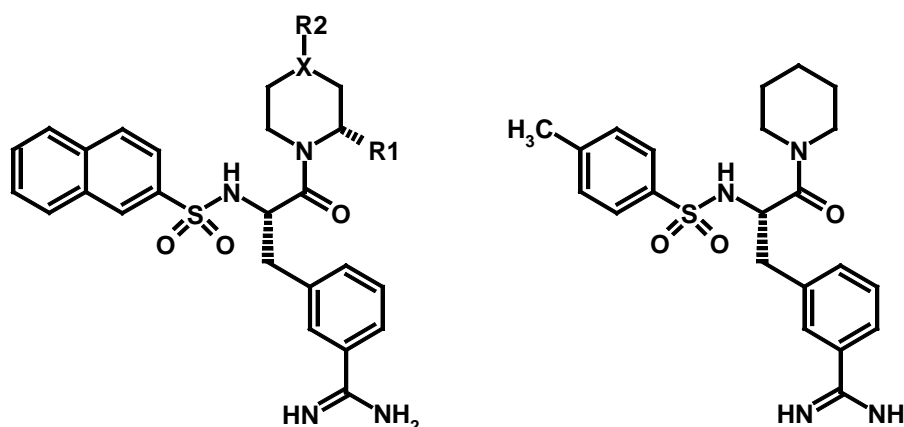
Besitzt die ionisierbare funktionelle Gruppe des Liganden bzw. des Proteins eine von Null verschiedene Ionisierungsenthalpie, muß zusätzlich noch ein Korrekturterm für die Ionisierungsenthalpie dieser Gruppe berücksichtigt werden (siehe Kapitel 3.4.2).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Datensatz und Inhibitionskonstanten

Für die röntgenkristallographische Strukturbestimmung und die thermodynamischen Charakterisierungen wurden zwei Serien von Inhibitoren ausgewählt.

**3-Amidinophenylalaninstrukturen.** Der erste Datensatz besteht aus einer Serie von Derivaten der N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalaninstruktur **1a – 1dAc**, die an ihrem C-terminalen Ende durch verschiedene Sechsringsysteme substituiert sind.



**Abbildung 3.1:** Darstellung der Grundstruktur der vermessenen Thrombin- und Trypsininhibitoren mit 3-Amidinophenylalaninstruktur (links) und 3-TAPAP (rechts).

Diese Inhibitoren leiten sich von dem wohlbekanntem Inhibitor 3-TAPAP (Bode *et al.*, 1990; Stürzebecher *et al.*, 1984; Turk *et al.*, 1991) ab. Sie sind das Ergebnis der Bemühungen, die Bindungseigenschaften, d.h. die Stärke der Bindung an Thrombin, durch Substitutionen des C- bzw. N-Terminus von 3-TAPAP zu verbessern. Der  $K_i$ -Wert für die Bindung von 3-TAPAP an Thrombin beträgt 540 nM. Der Austausch der N-terminalen Tosylgruppe von 3-TAPAP durch einen Naphthylsulfonylrest, die Addition von weiteren Gruppen an den C-terminalen Piperidinrest und die Substitution des Piperidinrestes durch eine

Piperazinstruktur sollten zu einer Verbesserung der Thrombinbindung führen, da man sich von diesen neuen Gruppen ein besseres Ausfüllen der S<sub>3</sub>-Aromatenbindetasche bzw. der S<sub>2</sub>-Tasche von Thrombin verspricht.

Substanz	Substituenten			Inhibitionskonstanten	
	R1	R2	X	Trypsin K <sub>i</sub> (nM)	Thrombin K <sub>i</sub> (nM)
<b>1a</b>	-H	-CH <sub>3</sub>	C	42	2.5
<b>1b</b>	-CO <sub>2</sub> H	-H	C	660	190
<b>1bMe</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	C	1100	48
<b>1c</b>	-H	-CO <sub>2</sub> H	C	220	190
<b>1cMe</b>	-H	-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C	21	10
<b>1d</b>	-H	-H	N	120	210
<b>1dAc</b>	-H	-Ac	N	44	12

**Tabelle 3.1:** Übersicht der untersuchten Thrombin- und Trypsininhibitoren. Die Inhibitionskonstanten K<sub>i</sub> wurden nach der Vorschrift aus Kapitel 6.5 bei Raumtemperatur gemessen.

Der Inhibitor **1a** besitzt eine zusätzliche Methylgruppe in 4-Position des C-terminalen Piperidinrings. Mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 2.5 nM für die Thrombinbindung ist **1a** die am stärksten bindende Substanz in dieser Reihe. Die Bindung an Thrombin ist um eine Größenordnung stärker im Vergleich zur Bindung an Trypsin.

Die beiden Paare **1b/1bMe** und **1c/1cMe** bestehen jeweils aus der freien Carbonsäure und deren Ester. So besitzt **1b** eine R-Pipecolinsäuregruppe als C-Terminus. Die Carbonsäuregruppierung befindet sich in diesem Falle in 2-Position des Piperidinrings. **1bMe** ist die Verbindung, die an der Pipecolinsäure durch Methanol verestert ist.

Bei **1c** sitzt die Carbonsäuregruppe in 4-Position des Piperidinrings (*iso*-Nipecotinsäure). **1cMe** ist die mit Methanol veresterte Form, die sich direkt von der Carbonsäure **1c** ableitet. Während **1c** und **1cMe** keine Selektivitäten zwischen Thrombin und Trypsin zeigen, ist **1b** nur ein schwach selektiver Thrombininhibitor. Einzig **1bMe** diskriminiert stark zwischen den beiden Proteasen Thrombin und Trypsin mit stärkerer Bindung an das Thrombin (48 nM vs. 1100 nM gegenüber Trypsin).

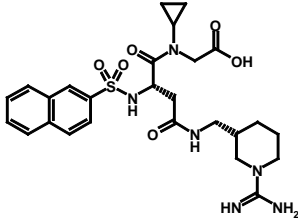
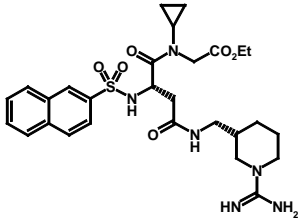
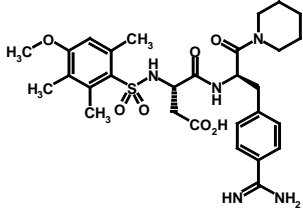
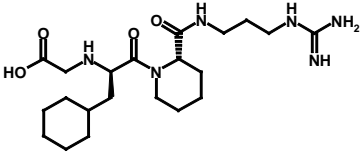
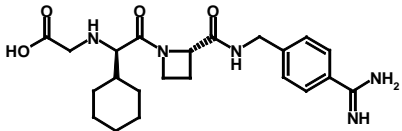
Bemerkenswert ist, daß jeweils die freien Carbonsäuren **1b** und **1c** stärker an Thrombin binden als deren Methylester **1bMe** und **1cMe**. Bei der Bindung an Trypsin sieht es anders aus. Hier bindet einmal die freie Carbonsäure stärker an Trypsin als der homologe Ester (**1b/1bMe**), ein anderes Mal die veresterte Verbindung stärker als deren freie Carbonsäure (**1c/1cMe**).

Anstelle eines Piperidinrings besitzen **1d** und **1dAc** ein Piperazinsystem als terminale Gruppe. In **1dAc** ist die freie sekundäre Aminogruppe von **1d** durch eine zusätzliche Acetylgruppe geschützt. Die beiden Inhibitoren diskriminieren nur schwach zwischen Thrombin oder Trypsin als Target. Allerdings bindet **1dAc** an beide Proteasen stärker als **1d**. Während **1d** bevorzugt an Trypsin bindet (120 nM vs. 210 nM gegenüber Thrombin), ist bei **1dAc** das Umgekehrte der Fall. Der  $K_i$ -Wert gegenüber Thrombin beträgt 12 nM, während die Inhibitionskonstante für Trypsin fast viermal so groß ist (44 nM).

**Entwicklungssubstanzen.** Der zweite Datensatz besteht aus fünf Entwicklungssubstanzen, die von verschiedenen Firmen zur Verfügung gestellt wurden: Napsagatran **2** und dessen Ethylester **2Et** von Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz), CRC 220 **3** von Chiron-Behring (Marburg), Inogatran **4** und Melagatran **5** von Astra Haessle (Mölndal, Schweden).

Napsagatran **2** ist ein sehr stark bindender Thrombininhibitor (0.7 nM) mit einer hohen Selektivität im Vergleich zu Trypsin (11.6  $\mu$ M). Im Gegensatz zu den Verbindungen **1a** - **1dAc**, die über eine Benzamidinfunktionalität in der  $S_1$ -Tasche binden, bindet dieser Inhibitor mit einer Amidinopiperidinuntereinheit in der Spezifitätstasche von Thrombin und Trypsin. Die Verbindung **2Et** leitet sich von **2** in der Weise ab, daß die freie

Carbonsäuregruppe der Glycineinheit von **2** mit Ethanol verestert wurde. Durch die Veresterung verschlechtern sich die Bindungseigenschaften gegenüber Thrombin (86 nM).

Substanz	Struktur	Inhibitionskonstante	
		Trypsin $K_i$ (nM)	Thrombin $K_i$ (nM)
<b>2</b>		11600	0.7
<b>2Et</b>		30000*	86*
<b>3</b>		410	2.3
<b>4</b>		170	4.2
<b>5</b>		8**	4**

**Tabelle 3.2:** Übersicht der kommerziellen Thrombininhibitoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Inhibitionskonstanten  $K_i$  wurden nach der Vorschrift in Kapitel 6.5 gemessen, soweit nichts anderes vermerkt ist.

\*: Nach Hilpert et al., 1994, \*\*: Nach Gustafsson et al., 1998.



---

Inogatran **4** ist ein Thrombininhibitor, der sich zur Zeit in der klinischen Prüfung befindet. Dieser besitzt im Gegensatz zu allen anderen Inhibitoren eine flexible aliphatische Kohlenstoffkette, die mit einer terminalen Guanidinogruppe in der  $S_1$ -Tasche bindet. Allerdings ist die Selektivität von **4** nicht so hoch wie die von **2**, obwohl Inogatran **4** ähnlich stark an Thrombin bindet (4.2 nM) wie Napsagatran **2**.

Melagatran **5** wiederum – wie Inogatran **4** auch eine Entwicklungssubstanz der Firma Astra Haessle – ist **4** im strukturellen Aufbau ähnlich. In **5** sind der zentrale Piperidinring (6-Ring) von **4** durch einen Azetidinring (4-Ring) und der Cyclohexylalaninrest durch einen Cyclohexylglycinrest ersetzt. Die Bindungsstärke gegenüber Thrombin (4 nM) entspricht der von Inogatran **4** (4.2 nM). Allerdings zeigt **4** nahezu keine Selektivität zwischen Thrombin (4 nM) und Trypsin (8 nM).

Für **2** und **3** wurden die Inhibitionskonstanten  $K_i$  im Temperaturbereich von 26 bis 40°C bei vier verschiedenen Meßtemperaturen bestimmt: 26, 30, 35 und 40°C. Die Bindungsreaktionen an Trypsin bzw. Thrombin wurden nach der Versuchsvorschrift in Kapitel 6.5 in Anwesenheit von Natriumchlorid oder Kaliumchlorid durchgeführt.

Tabelle 3.3 faßt die Meßergebnisse für die verschiedenen Temperaturen und Salzbedingungen zusammen. Die Freien Enthalpien  $\Delta G$  wurden nach Gleichung 2.21 aus den gemessenen Inhibitionskonstanten  $K_i$  berechnet.

Die Inhibitionskonstanten  $K_i$  zeigen eine Abhängigkeit von der Temperatur. Mit steigender Temperatur wird  $K_i$  größer. Die Werte für die Freien Enthalpien  $\Delta G$  wurden unter der Annahme, daß die Inhibitionskonstanten  $K_i$  ungefähr gleich den Dissoziationskonstanten  $K_D$  sind ( $K_i \approx K_D$ , Gleichung 2.20), nach Gleichung 2.21 berechnet. Im Rahmen der Meßgenauigkeit (Fehler von 20% für die  $K_i$ -Werte) sind die Freien Enthalpien  $\Delta G$  nahezu temperaturunabhängig.

Die unterschiedlichen Salzbedingungen (d.h. die An- bzw. Abwesenheit von Natriumionen) haben nahezu keinen Einfluß auf die Inhibitionskonstanten  $K_i$ . Die Meßwerte in Anwesenheit von Natriumchlorid bzw. Kaliumchlorid sind nicht signifikant unterschiedlich.

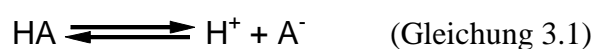
			Temperatur (in °C)			
Salz			26	30	35	40
2-Trypsin	NaCl	$K_i$	11600	16900	18500	29200
		$\Delta G$	-28.3	-27.7	-27.9	-27.2
2-Trypsin	KCl	$K_i$	15000	18100	17200	18900
		$\Delta G$	-27.6	-27.5	-28.1	-28.3
3-Trypsin	NaCl	$K_i$	410	550	570	740
		$\Delta G$	-36.6	-36.3	-36.8	-36.7
3-Trypsin	KCl	$K_i$	560	790	790	650
		$\Delta G$	-35.8	-35.4	-36.0	-37.0
2-Thrombin	NaCl	$K_i$	0.71	0.78	1.21	1.29
		$\Delta G$	-52.4	-52.8	-52.6	-53.3
2-Thrombin	KCl	$K_i$	0.77	0.80	0.98	0.98
		$\Delta G$	-52.2	-52.8	-53.1	-53.5
3-Thrombin	NaCl	$K_i$	2.27	1.72	1.87	2.26
		$\Delta G$	-49.5	-50.8	-51.5	-51.8
3-Thrombin	KCl	$K_i$	1.97	2.47	2.23	2.00
		$\Delta G$	-49.8	-49.9	-51.0	-52.1

**Tabelle 3.3:** Inhibitionskonstanten  $K_i$  (in  $\text{mM}$ ) und die nach Gleichung 2.21 berechneten Freien Enthalpien  $\Delta G$  (in  $\text{kJ/mol}$ ) für 2 und 3 bei vier Meßtemperaturen in Anwesenheit von zwei verschiedenen Alkaliionen. Die Inhibitorkonstanten wurden nach der Vorschrift in Kapitel 6.5 gemessen.

### 3.2 Ionisierungsgleichgewichte und $pK_a$ -Messungen

Von allen untersuchten Substanzen wurden die Säurekonstanten ( $pK_a$ -Werte) potentiometrisch mit dem Meßgerät Sirius PCA 101 gemessen.

Nach der Definition von Brønsted und Lowry ist eine Säure ein Protonendonator und eine Base ein Protonenakzeptor. Eine Säure HA zeigt dann in Wasser das folgende Gleichgewicht:

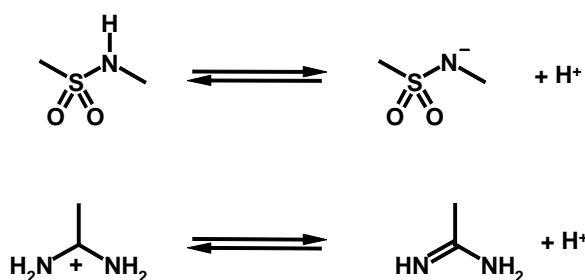


Die Spezies  $A^-$  ist in diesem Falle der Protonenakzeptor. Man nennt  $A^-$  auch die zur Säure HA korrespondierende Base. Die Gleichgewichtskonstante für dieses Gleichgewicht heißt Ionisationskonstante  $K_a$ . Der  $pK_a$ -Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten  $K_a$ .

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

$$pK_a = -\log_{10} K_a \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

Allen Inhibitoren **1a** – **1dAc** sind zwei ionisierbare Gruppen gemeinsam. Zum einen ist die saure Sulfonamidgruppe zu nennen, zum anderen die Benzamidingruppe, die in wäßriger Lösung basisch reagiert (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2:** Ionisierungsgleichgewichte für eine Sulfonamidgruppe (oben) und eine Amidinofunktion. Sulfonamide mit einer Arylfunktion als direkten Substituenten besitzen  $pK_a$ -Werte von etwa 10. Die Amidinogruppe ist eine basische Gruppe, die erst bei hohen pH-Werten deprotoniert wird.

Die veresterten Inhibitoren **1bMe** und **1cMe** sowie der Inhibitor **1a** haben nur zwei  $pK_a$  Werte (Tabelle 3.4). Die  $pK_a$ -Werte werden gut aufgelöst (keine Überlagerung), so daß die  $pK_a$ -Werte den funktionellen Gruppen einfach zugeordnet werden können. Der niedrigere von den beiden Werten gehört zur Sulfonamidgruppe, während der stark basische  $pK_a$ -Wert zum Benzamidiniumrest gehört. Der gemessene Wert im Bereich von 11 bis 12 stimmt auch mit dem  $pK_a$ -Wert überein, der für die Guanidiniumgruppe der Aminosäure Arginin gemessen wird (in Abhängigkeit von den genauen Meßbedingungen um  $pK_a = 12$ ).

Für die freien Carbonsäuren **1b** und **1c** mißt man neben den zwei besprochenen  $pK_a$ -Werten noch einen weiteren  $pK_a$ -Wert, der unterhalb der anderen beiden Werte liegt. Die Werte von 3.21 für **1b** bzw. 4.17 für **1c** können den Carboxylatfunktionen der beiden Substanzen zugeordnet werden. Dabei ist der  $pK_a$ -Wert für die Carboxylatfunktion von **1b** wahrscheinlich deshalb um eine Einheit kleiner, weil bei **1b** die direkt benachbarte Amidgruppe durch die räumliche Nähe einen starken induktiven Effekt auf die Carboxylgruppe ausübt. Bei **1c** ist dieser induktive Effekt der Amidbindung durch aliphatische Ringglieder entkoppelt.

Auch die Substanz **1d** besitzt einen dritten  $pK_a$ -Wert, der der zusätzlichen sekundären Aminogruppe des C-terminalen Rings zugeordnet werden kann. In **1dAc** ist genau diese ionisierbare Gruppe durch eine Acetylgruppe geschützt, so daß man bei dieser Substanz nur noch zwei  $pK_a$ -Werte - nämlich für die Amidinium- und die Sulfonamidgruppe - mißt.

Substanz	pK <sub>a</sub> -Werte		
	Amidinium	Sulfonamid	
<b>1a</b>	11.38	10.02	
<b>1b</b>	11.99	10.33	3.21*
<b>1bMe</b>	11.71	10.26	
<b>1c</b>	11.78	10.20	4.17*
<b>1cMe</b>	11.79	10.11	
<b>1d</b>	11.43	9.90	7.49**
<b>1dAc</b>	11.54	9.91	

**Tabelle 3.4:** pK<sub>a</sub>-Werte für die Inhibitoren **1a** – **1dAc**. \* pK<sub>a</sub>-Wert für die Carbonsäuregruppe, \*\* pK<sub>a</sub>-Wert für die sekundäre Aminogruppe.

Unter den Entwicklungssubstanzen **2** - **5** verhalten sich **2** und **3** bezüglich der protonierbaren Gruppen analog zu den Inhibitoren vom 3-Amidinophenylalanintyp (Tabelle 3.5). Beide Substanzen besitzen je eine Carboxylatgruppe, eine Sulfonamidgruppe und eine stark basische Funktion. Im Falle von **3** ist das die Amidinogruppe mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von 11.57, der im Bereich der pK<sub>a</sub>-Werte für die Amidinogruppen der Verbindungen **1a** – **1dAc** liegt, während der gemessene pK<sub>a</sub>-Wert der Guanidinogruppe von **2** höher liegt (12.25). Ausgehend von **2** sind dann auch die pK<sub>a</sub>-Werte für **2Et** zuzuordnen. Da **2Et** die veresterte Form von **2** ist, besitzt **2Et** nur noch zwei pK<sub>a</sub>-Werte, die der Guanidino- bzw. der Sulfonamidgruppe zugeordnet werden können (12.12 bzw. 9.83).

Den beiden Inhibitoren **4** und **5** fehlt die bekannte Sulfonamidgruppe. Während beide Substanzen jeweils eine Carbonsäurefunktion besitzen, unterscheiden sie sich im Typ der basischen Gruppe, die in der Spezifitätstasche von Thrombin und Trypsin bindet. Inogatran **4** hat eine Guanidinofunktion mit einem pK<sub>a</sub>-Wert von über 12. In **5** ersetzt die weniger basische Benzamidingruppe die relativ flexible Kohlenstoffkette mit endständiger Guanidiniumgruppe.

---

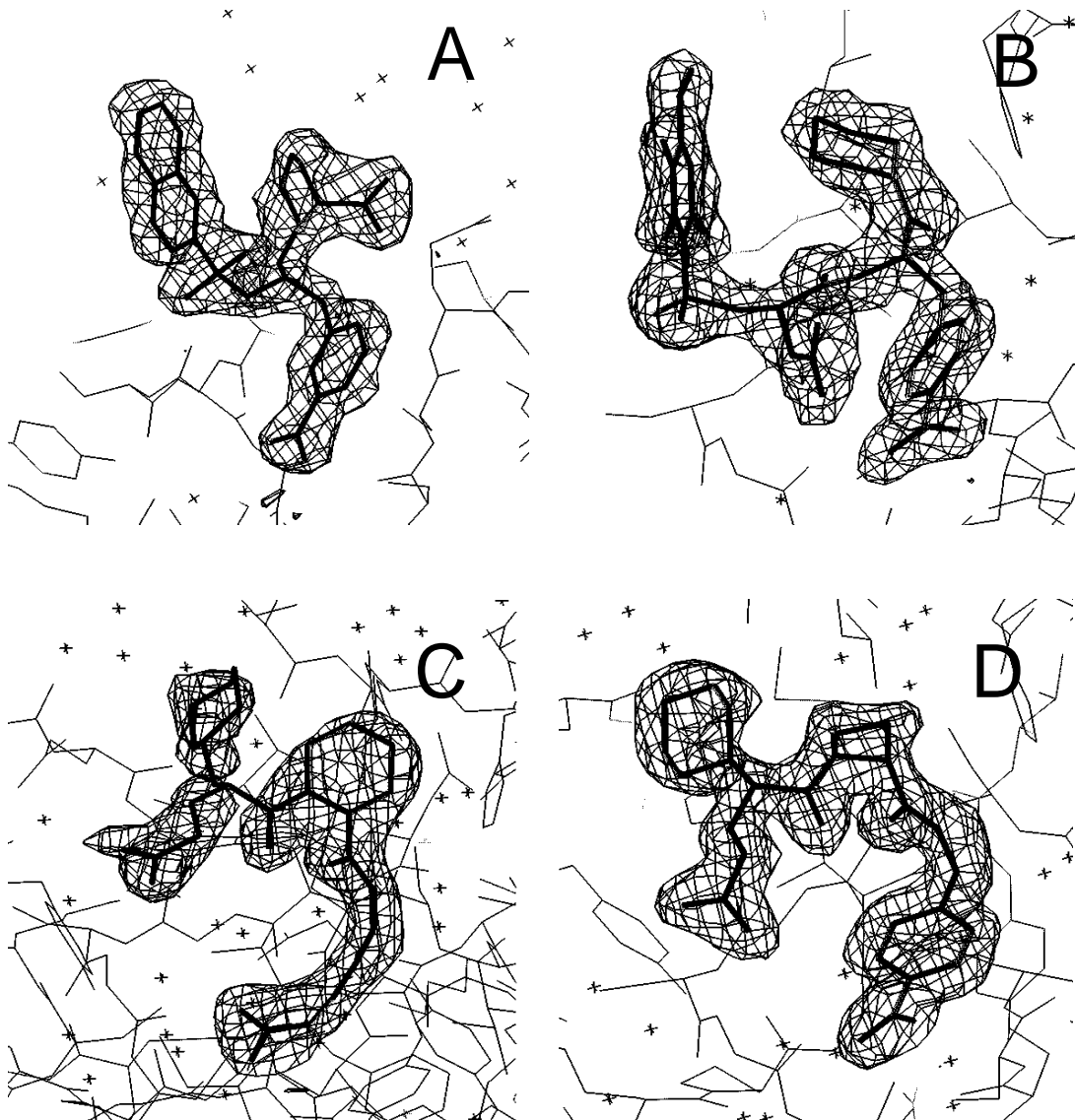
Substanz	pK <sub>a</sub> -Werte		
	Amidinium / Guanidinium	Sulfonamid/ Aminogruppe	Carbonsäure
<b>2</b>	12.25	10.12	4.40
<b>2Et</b>	12.12	9.83	--
<b>3</b>	11.57	10.67	3.84
<b>4</b>	> 12 *	7.48	2.65
<b>5</b>	11.5 *	7.95	2.51

---

**Tabelle 3.5:** pK<sub>a</sub>-Werte für die Inhibitoren 2–4. \*: Die pK<sub>a</sub>-Werte konnten aufgrund der zur Verfügung stehenden Substanzmenge nicht genau bestimmt werden.

### 3.3 Kristallstrukturen

Von den Inhibitoren **1b**, **1cMe**, **1d**, **1dAc**, **3**, **4** und **5** wurden Röntgenstrukturen im Komplex mit der Serinprotease Trypsin aufgenommen. Die Trypsinkomplexe von **1cMe**, **1d** und **1dAc** ließen sich durch „soaking“ nach der Vorschrift Kapitel 6.6.1 gewinnen. Die Inhibitoren **1b**, **3**, **4** und **5** wurden mit Trypsin nach der Vorschrift in Kapitel 6.6.2 kokristallisiert.



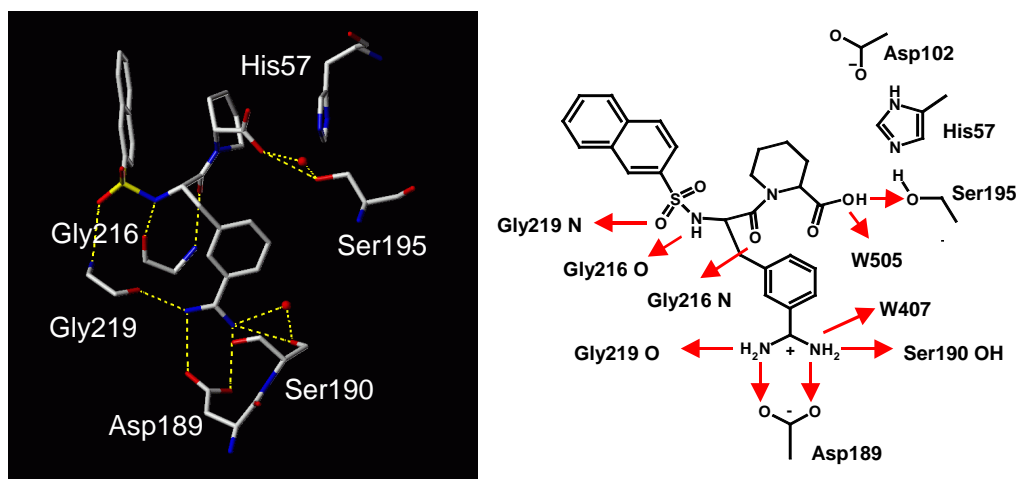
**Abbildung 3.3:**  $2F_{obs}-F_{calc}$  Elektronendichten für **1b** (A), **3** (B), **4** (C) und **5** (D) in Komplex mit Trypsin. Konturoberfläche bei  $0.9 \sigma$ .

### 3.3.1 Bindungsmodus der Inhibitoren **1b**, **1cMe**, **1d** und **1dAc**

Die Inhibitoren **1b**, **1cMe**, **1d** und **1dAc** bilden Komplexgeometrien mit Trypsin, die der Struktur des bekannten Inhibitors 3-TAPAP (PDB Code 1PPH) (Bode *et al.*, 1990; Turk *et al.*, 1991) mit Trypsin ähnlich sind.

Da die meisten Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand für alle vier Inhibitor-komplexe sehr ähnlich sind, soll hier zunächst auf einige allen Inhibitoren gemeinsame Eigenschaften eingegangen werden.

Die basische Benzamidinogruppe ist tief in der  $S_1$ -Spezifitätstasche des Trypsins vergraben. Die beiden Stickstoffe (N1, N2) der Benzamidingruppe bilden mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette des Aspartats 189 eine zweizählige symmetrische Salzbrücke aus. Weiterhin wird diese Gruppe durch Wasserstoffbrücken des einen Stickstoffatoms (N1) zum Carbonylsauerstoffatom von Glycin 219 und des anderen (N2) zur Hydroxylgruppe des Serins 190 sowie zu einem vergrabenen Wassermolekül (W407), das seinerseits wieder mit der Hydroxylgruppe des Serins 190 eine Wasserstoffbrücke ausbildet, zusätzlich stabilisiert (Abbildungen 3.4).



**Abbildung 3.4:** Wechselwirkungen des Inhibitors **1b** mit Trypsin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien bzw. als rote Pfeile und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.



Ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt wird aus zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Aminogruppe (N3) des zentralen Amidinophenylalanylrestes und dem Carbonylsauerstoffatom des Glycins 216 einerseits und zwischen der Carbonylgruppe (O3) des Liganden und dem Stickstoffatom des Glycins 216 andererseits gebildet. Eines der beiden Sauerstoffatome (OS1) der Sulfonylgruppe formt eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoffatom des Glycins 219.

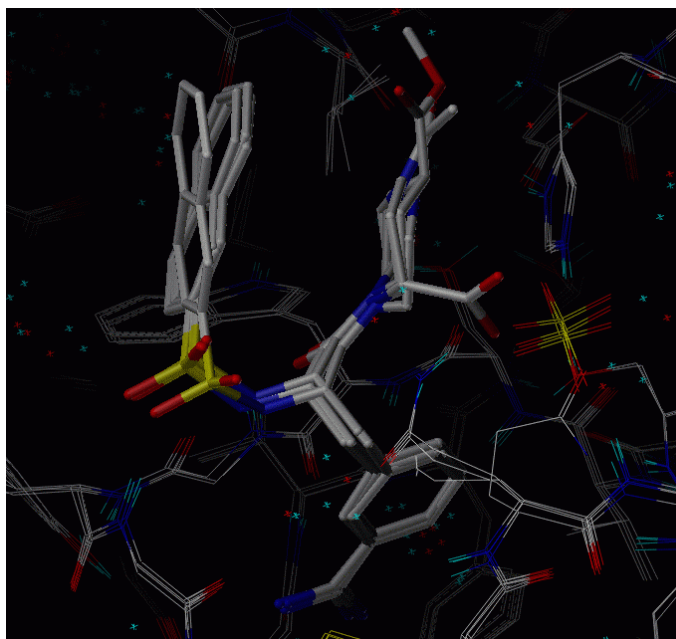
Die N-terminale Naphthylsulfonylgruppe besetzt die  $S_3$ -Aromatenbindetasche, wobei der Naphthylring senkrecht zum Indolring des Tryptophans 215 zu liegen kommt, während der C-terminale aliphatische Piperidin- bzw. Piperazinring in der kleineren  $S_2$ -Tasche bindet. Der C-terminale Sechsring liegt parallel zum Naphthylrest und zum Imidazolring des katalytischen Histidins 57 (Abstand ca. 4.6 Å).

Eine Überlagerung der vier Trypsinkomplexe, die anhand der Koordinaten der Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102, Aspartat 189 und Serin 195 vorgenommen wurde, zeigt vernachlässigbare Unterschiede bei der Orientierung der Benzamidingruppen und den C-terminalen aliphatischen Ringsystemen für alle vier Komplexe (Abbildung 3.5). Bedingt durch die Orientierung der N-terminalen Naphthylsulfonylgruppe ergibt sich für **1b** ein etwas anderer Bindungsmodus. Dieser Effekt könnte mit der abweichenden Gittermetrik der Einheitszelle bei gleicher Raumgruppe in Zusammenhang stehen, weshalb sich ein leicht unterschiedliches Packungsmuster ergibt, da **1b** mit Trypsin nicht, wie alle anderen Inhibitoren durch „soaking“ (siehe Kapitel 6.6.1) gewonnen wurde, sondern kokristallisiert (siehe Kapitel 6.6.2) wurde. Allerdings hat dieser strukturelle Unterschied keinen Einfluß auf das allgemein beschriebene Wasserstoffbrückennetzwerk.

Die Elektronendichte des C-terminalen Piperidinrings von **1b** ist besser definiert als diejenigen Dichten der C-terminalen Ringe von **1cMe**, **1d** und **1dAc** im jeweiligen Trypsinkomplex. Das Stereozentrum des Pipecolinsäurerestes besitzt R-Konfiguration. Die Carboxylatgruppe besetzt eindeutig eine axiale Position am sesselförmigen Sechsring. Offensichtlich ist für die besser definierte Elektronendichteverteilung in diesem Bereich eine stärkere Immobilisierung des aliphatischen Rings in der Trypsinbindetasche verantwortlich, die durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke der C-terminalen Carboxylgruppe zum Protein zustande kommt. Ein Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe des Pipecolinsäurerestes bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe des Serins 195 aus (2.9 Å), eine weitere zu

einem immobilisierten Wassermolekül (2.7 Å, W505), das seinerseits drei weitere Wasserstoffbrücken zum Hydroxylsauerstoffatom von Serin 195 (2.5 Å), zum Stickstoffatom von Glycin 193 (2.7 Å) und zum Stickstoff- oder Sauerstoffatom (siehe auch Kapitel 2.2.5) der Seitenkette von Glutamin 192 (3.0 Å) ausbildet und so seine tetraedrische Koordinierung erreicht.

Auch die C-terminalen Gruppen von **1cMe** und **1dAc** gehen zusätzliche Wasserstoffbrücken ein. Das Carbonylsauerstoffatom der Estergruppe von **1cMe** bzw. das Sauerstoffatom der Acetylgruppe von **1dAc** bilden eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül (jeweils 2.9 Å, W991), das seinerseits mit dem Carbonylsauerstoffatom von Serin 96 verbrückt ist (jeweils 2.7 Å). Verbindung **1d** zeigt keine zusätzlichen polaren Kontakte des C-Terminus mit dem Protein. Die sekundäre Aminogruppe des Piperazinrestes befindet sich in diesem Falle 4.5 Å vom Imidazolring des Histidins 57 entfernt.



**Abbildung 3.5:** Überlagerung von **1b**, **1cMe**, **1d** und **1dAc** in Komplex mit Trypsin. Das Enzym ist bezüglich der Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102, Aspartat 189 und Serin 195 überlagert (siehe Kapitel 6.7).

	<b>1b</b>	<b>1cMe</b>	<b>1d</b>	<b>1dAc</b>
N1 – Asp 189 OG1	2.9	2.7	2.6	2.8
N2 – Aps 189 OG2	3.1	3.1	3.0	3.0
N1 – Gly 219 O	2.7	2.7	2.8	2.8
N2 – Ser 190 OG	3.0	2.8	2.6	2.7
N2 – W407	2.9	2.9	3.1	-- *
W407 – Ser 190 OG	2.9	3.0	3.3	-- *
N3 – Gly 216 O	2.8	2.9	2.7	2.8
O3 – Gly 216 N	3.1	3.2	2.9	3.1
OS1 – Gly 219 N	2.8	2.9	2.9	2.9

**Tabelle 3.6:** Längen der Wasserstoffbrücken in Å. Die Abkürzungen für die Inhibitoratome und das Wassermolekül ergeben sich aus der Strukturbeschreibung in Kapitel 3.3.1, die Nummerierung der Aminosäuren des Trypsins orientiert sich an der Nummerierung der Protease Chymotrypsin (Bode et al., 1989). Weitere Abkürzungen: OG – O<sup>g</sup>Atom der Seitenkette; O – Carbonylsauerstoff, N – Aminogruppe in der Hauptkette; W – Wassermolekül; \* Obwohl die Elektronendichte vermutlich aufgrund einer zu geringen Auflösung der Komplexstruktur von **1dAc** mit Trypsin keine Hinweise für das Vorhandensein eines Wassermoleküls erkennen läßt, kann man aufgrund der Restelextronendichte vermuten, daß auch in dieser Struktur das Wassermolekül W407 vorhanden ist.

Die Wasserstruktur ist in allen beschriebenen Strukturen vergleichbar. Allerdings wird in den Trypsinkomplexen, die nach der Vorschrift in Kapitel 6.6.1 in Gegenwart von Ammoniumsulfat durch „soaking“ erhalten wurden, ein zusätzliches Sulfation nahe der Hydroxylgruppe des Serins 195 und des Imidazolrings von Histidin 57 eingelagert, das die Position besetzt, die im Trypsinkomplex **1b** von der Carboxylgruppe des C-terminalen Pipecolinsäurerestes besetzt wird. Die genaue Orientierung der Sauerstoffatome des Sulfations ist nicht zu ermitteln. Allerdings zeigen sich keine direkten Wechselwirkungen mit dem Inhibitor.

---

In alle Trypsinkomplexe wurden Calciumionen eingelagert. Das Calciumion wird oktaedrisch von zwei Wassermolekülen und vier Proteingruppen umgeben. Es sind dies die Sauerstoffatome der Seitenketten von Glutamin 70 und von Glutamin 80 und die Carbonylgruppen von Valin 75 und Asparagin 72.

Die Kristallstruktur von **1a** im Komplex mit bovinem  $\epsilon$ -Thrombin ist von Bergner *et al.* (1995) beschrieben worden. Der Inhibitor **1a** (auch mit der Bezeichnung NAPAMP abgekürzt) bindet nahezu identisch wie der bekannte Inhibitor 3-TAPAP (PDB Code 1PPH) an Thrombin bzw. Trypsin.

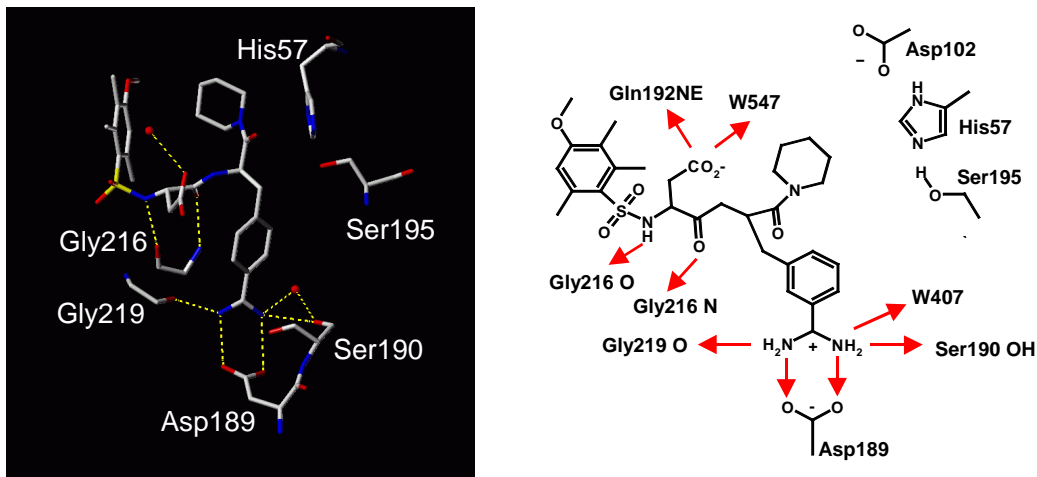
### 3.3.2 Bindungsmodus des Inhibitors 3 (CRC 220)

Der Ligand **3** (Reers *et al.*, 1995) bindet ähnlich dem bekannten Thrombin- und Trypsinhibitor NAPAP (PDB Code 1PPC für Trypsinkomplex und 1ETS für Thrombin-komplex, Bode *et al.*, 1990; Stürzebecher *et al.*, 1984; Turk *et al.*, 1991) an die Serinprotease Trypsin (Abbildung 3.6). Der Bindungsmodus des Benzamidinrestes entspricht weitgehend dem der Benzamidinreste in den Inhibitoren **1b**, **1cMe**, **1d** und **1dAc**.

Die basische Benzamidinogruppe ist auch hier in der  $S_1$ -Spezifitätstasche des Trypsins vergraben. Die beiden Stickstoffe der Benzamidinogruppe formen mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette des Aspartats 189 eine zweizählige weitgehend symmetrische Salzbrücke (2.7 Å bzw. 2.9 Å). Desweiteren wird diese Gruppe durch Wasserstoffbrücken des einen Stickstoffatoms zum Carbonylsauerstoff von Glycin 219 (2.8 Å) und des anderen zur Hydroxylgruppe des Serins 190 (2.8 Å) zusätzlich stabilisiert. Das Serin wiederum bindet an ein vergrabenes Wassermolekül (2.8 Å, W407), das seinerseits wieder mit der Serinseitenkette und dem Sauerstoffatom des Valins 227 Wasserstoffbrücken eingeht (3.0 Å bzw. 3.2 Å).

Ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt wird durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Aminogruppe des zentralen Aspartylrestes im Inhibitor und der Carbonylgruppe von Glycin 216 einerseits (2.8 Å) und der Carbonylgruppe des zentralen Aspartats des Inhibitors und der Aminogruppe

von Glycin 216 andererseits (3.1 Å) gebildet. Eines der beiden Sauerstoffatome der Aspartylseitenkette des Inhibitors formt eine schwache H-Brücke zum Stickstoffatom der Seitenkette von Glutamin 192, das andere Sauerstoffatom geht eine Wasserstoffbrücke (2.9 Å) zu einem Wassermolekül (W547) ein.



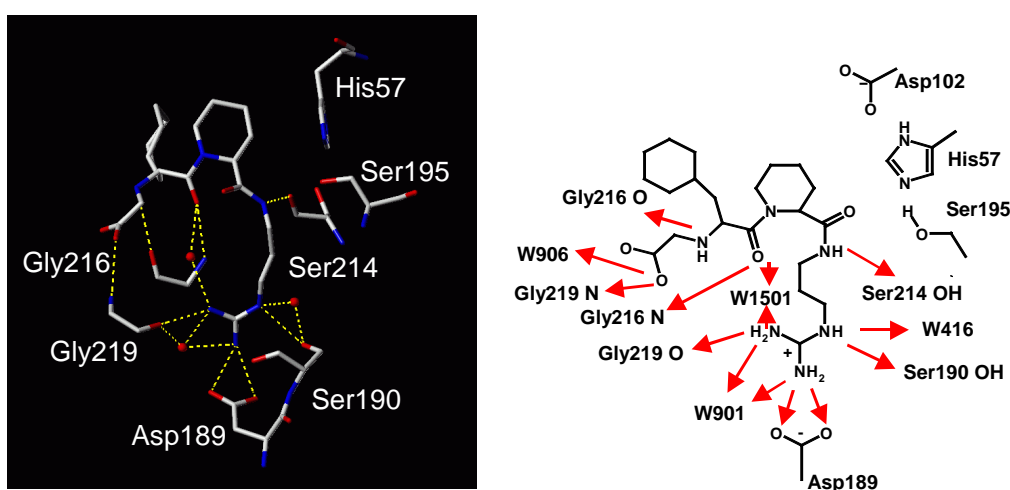
**Abbildung 3.6:** Wechselwirkungen des Inhibitors 3 mit Trypsin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien bzw. als rote Pfeile und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.

Die Sauerstoffatome der Sulfonylgruppe orientieren sich eindeutig von der Trypsinoberfläche 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. Das bedeutet, daß diese Gruppe wahrscheinlich von nicht zu lokalisierenden Wassermolekülen umgeben ist, die in der Röntgenstruktur nicht aufgelöst werden. Der Phenylring, der die  $S_3$ -Aromatenbindetasche ausfüllt, steht nahezu senkrecht zum Indolring des Tryptophans 215. Die Elektronendichte ist für alle vier Substituenten am Phenylring wohl definiert, so daß jeder Ringsubstituent zugeordnet werden kann, was auf eine starke Immobilisierung des N-terminalen Substituenten schließen läßt.

Der C-terminale Piperidinring füllt interkaliert zwischen dem Phenylring des Inhibitors und dem Imidazolring des Histidins 57 die  $S_2$ -Tasche aus, ohne direkte Kontakte mit diesen Ringsystemen einzugehen.

### 3.3.3 Bindungsmodus des Inhibitors 4 (Inogatran)

Verbindung 4 (Nilsson *et al.*, 1998) bindet mit einem anderen Bindungsmodus an Trypsin als alle anderen Inhibitoren mit einem Benzamidinrest. Als zentrales Fragment besitzt dieser Inhibitor einen S-Pipecolinsäurerest, der N-terminal mit R-Cyclohexylalanin und C-terminal mit einem N-(3-Aminopropyl)guanidinrest, der die Aminosäure Arginin in der S<sub>1</sub>-Spezifitätstasche ersetzen soll, verbunden ist (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Wechselwirkungen des Inhibitors 4 mit Trypsin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien bzw. als rote Pfeile und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.

Die Guanidinogruppe ist so in der S<sub>1</sub>-Tasche von Trypsin plaziert, daß nur eines der drei Stickstoffatome (N1) einen Kontakt zu den beiden Carboxylatsauerstoffen von Aspartat 189 eingeht (2.6 Å bzw. 2.7 Å, „*single N – twin O contact*“). Weiterhin wird eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül (W901) geformt (2.7 Å), das seinerseits durch drei weitere Wasserstoffbrücken eine tetraedrische Koordination erhält: (1.) zu einem der Carboxylatsauerstoffatome von Aspartat 189 (2.9 Å), (2.) zur Carbonylgruppe von Glycin 219 (3.1 Å, schwache Wechselwirkung) und (3.) zum zweiten terminalen Stickstoffatom (N2) der Guanidinogruppe.

Das zweite terminale Stickstoffatom (N2) formt neben dem Kontakt zum Wasser W901, das die Wechselwirkung zum Sauerstoffatom des Glycins 219 weiterreicht, noch eine direkte Wasserstoffbrücke (2.7 Å) mit dem Sauerstoffatom von Glycin 219.

Dieses komplizierte Wasserstoffbrückennetzwerk der zwei terminalen Stickstoffatome wird durch einen weiteren Kontakt des N2-Stickstoffatoms zu einem Wassermolekül (2.7 Å, W1501) komplettiert, das den Kontakt zur Carbonylgruppe des Cyclohexylalanylrestes überbrückt (3.0 Å). Dementsprechend entsteht durch das Wasser W1501 ein intramolekulares Wasserstoffbrückennetzwerk des Liganden.

Das dritte Stickstoffatom (N3) der Guanidinogruppe bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe von Serin 190 (2.8 Å) und eine indirekte, über ein Wassermolekül (W416, 3.0 Å) vermittelte Wasserstoffbrücke zur gleichen Hydroxylgruppe (3.2 Å) aus.

Die flexible aliphatische Kohlenstoffkette des N-(3-Aminopropyl)guanidins, die in der Röntgenstruktur gut aufgelöst ist (Abbildung 3.3), wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke stabilisiert, die von der Aminogruppe des Restes zur Carbonylgruppe des Serins 214 geformt wird (2.7 Å).

Während die Elektronendichte des Piperidinrings, der ähnlich den C-terminalen Sechsringen der Inhibitoren **1b**, **1cMe**, **1d** und **1dAc** in der S<sub>2</sub>-Tasche lokalisiert ist, gut definiert ist, weisen höhere B-Faktoren und eine schlechter definierte Elektronendichte für den Cyclohexylring des Cyclohexylalaninrestes auf eine größere Beweglichkeit dieses Rings in der S<sub>3</sub>-Aromatenbindetasche hin.

Ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt wird durch zwei schwache Wasserstoffbrücken zwischen der Aminogruppe des zentralen Cyclohexylalanylrestes und der Carbonylgruppe von Glycin 216 auf der einen Seite (3.3 Å) und der Carbonylgruppe dieses zentralen Restes und der Aminogruppe von Glycin 216 auf der anderen Seite (3.3 Å) geformt.

Die Carboxylatgruppe der terminalen Glycineinheit orientiert sich von der Trypsinoberfläche weg. Eines der Sauerstoffatome dieser Carboxylatgruppe geht Wasserstoffbrücken zum Stickstoffatom des Glycins 219 (3.0 Å) und zu einem Wassermolekül (3.0 Å, W906) ein.

### 3.3.4 Bindungsmodus des Inhibitors 5 (Melagatran)

Der Benzamidinrest von Inhibitor **5** (Gustafsson *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1998) bindet analog den anderen beschriebenen Inhibitoren mit Benzamidinrest (**1b**, **1cMe**, **1d**, **1dAc** und **3**) in der S<sub>1</sub>-Spezifitätstasche Trypsin (Abbildung 3.8).

Die beiden Stickstoffatome der Benzamidingruppe formen mit den Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette des Aspartats 189 eine zweizählige weitgehend symmetrische Salzbrücke (2.7 Å bzw. 2.9 Å). Desweiteren wird diese Gruppe durch vier weitere Wasserstoffbrücken im Raum fixiert. Das eine Stickstoffatom geht Wasserstoffbrücken mit dem Carbonylsauerstoffatom des Glycins 219 (3.0 Å) und mit einem Wassermolekül (2.6 Å, W901) ein, das andere Stickstoffatom bildet Wasserstoffbrücken zur Hydroxylgruppe des Serins 190 (2.8 Å) und zu einem vergrabenen Wassermolekül (3.0 Å, W416) aus.

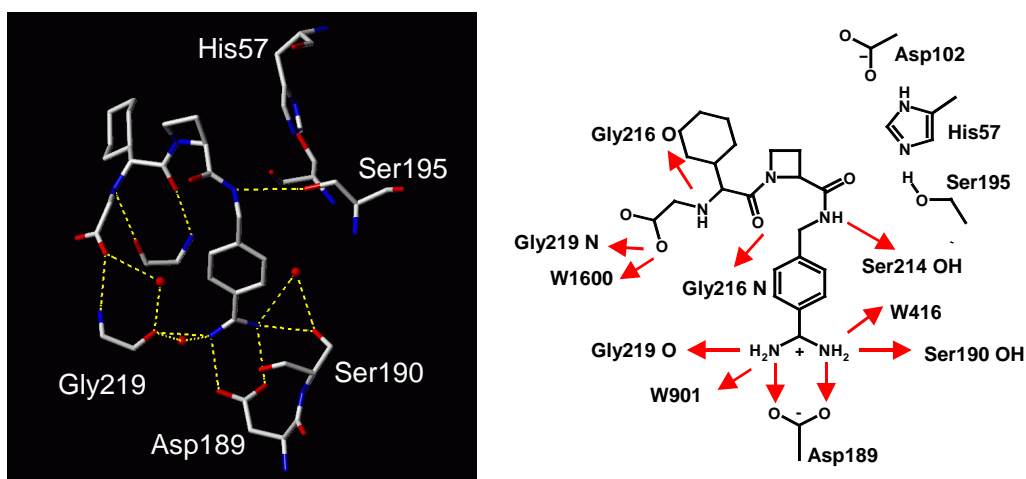
Die Elektronendichte für den Phenylring, der zusätzlich noch durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Aminomethylsubstituenten dieses Ringes und der Carbonylgruppe von Serin 214 in seiner Orientierung stabilisiert wird, ist gut definiert.

Ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt wird durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen der Aminogruppe des zentralen Cyclohexylglycinrestes im Inhibitor und der Carbonylgruppe von Glycin 216 einerseits (3.0 Å) und der Carbonylgruppe der zentralen Cyclohexylglycylstruktur und der Aminogruppe von Glycin 216 andererseits (3.3 Å) gebildet.

Der Azetidinring des Inhibitors ist in der Röntgenstruktur so gut aufgelöst, daß die exakte Stellung der beiden Ringsubstituenten zur Ringebene sicher zugeordnet werden kann. Demgegenüber zeigt der aliphatische Sechsering des Cycloglycinrestes eine verstärkte Mobilität in der S<sub>3</sub>-Bindungstasche des Enzyms, weshalb dessen genaue Konformation nicht bestimmt werden kann.

Die Elektronendichte für die terminale Carboxylgruppe ist dagegen wohl definiert. Diese terminale Gruppe steht bei **4** von der Trypsinoberfläche weg hin zum umgebenden Wasser. Ein Sauerstoffatom des Carboxylats geht Wasserstoffbrücken zur Aminogruppe des Glycins 219 (3.1 Å) und zu einem Wassermolekül (3.0 Å, W1600) ein, das seinerseits wieder eine schwache Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe von Glycin 219 formiert (3.2 Å).



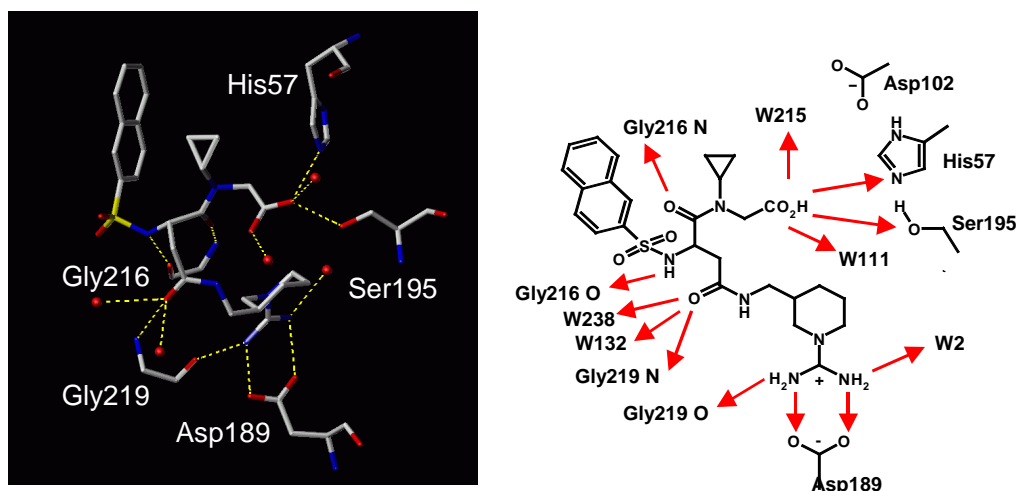


**Abbildung 3.8:** Wechselwirkungen des Inhibitors **5** mit Trypsin. Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien bzw. als rote Pfeile und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.

Das Wassermolekül, welches im Falle von **4** über eine intramolekulare Wasserstoffbrücke die Konformation des Inhibitors stabilisiert (W1501), wird durch den sterisch anspruchsvollen Phenylring der Benzamidingruppe in **5** (im Vergleich zur weniger voluminösen Kohlenstoffkette in **4**) verdrängt. Eine Überlagerung der beiden Strukturen ergibt, daß sich das Wassermolekül W1600 aus der Struktur von **4** bis auf 2.1 Å dem Melagatran nähern müßte. Ein so geringer Abstand ist aber repulsiv.

### 3.3.5 Bindungsmodus des Inhibitors **2** (Napsagatran) in Komplex mit Thrombin

Die Koordinaten von **2** in Komplex mit humanem  $\epsilon$ -Thrombin wurden freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt (Hilpert *et al.*, 1994). Da diese Struktur nicht im Detail veröffentlicht wurde, soll die Komplexstruktur hier kurz beschrieben werden (Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9:** Wechselwirkungen von **2** mit humanem  $\alpha$ -Thrombin. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte gelbe Linien bzw. rote Pfeile und die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt.

Der Amidinopiperidinrest von **2** ist ähnlich wie die Benzamidingruppen von **1b**, **1cMe**, **1d**, **1dAc**, **3** und **5** tief in der  $S_1$ -Spezifitätstasche von Thrombin vergraben. Die beiden terminalen Stickstoffatome der Amidinopiperidylgruppe bilden zwei nicht-kovalente Kontakte (2.8 Å bzw. 2.9 Å) in Form einer nahezu symmetrischen Salzbrücke mit den beiden Sauerstoffatomen der Carboxylatseitenkette von Aspartat 189 aus, das am unteren Boden der  $S_1$ -Bindungstasche lokalisiert ist. Weiterhin wird der Sechsring durch eine Wasserstoffbrücke des einen terminalen Stickstoffatoms zum Carbonylsauerstoffatom des Glycins 219 (2.9 Å) und des anderen Stickstoffatoms zu einem räumlich fixierten Wassermolekül (2.8 Å, W2; W2 entspricht von der Lokalisierung her dem Wassermolekül W407, das für die Trypsinstrukturen beschrieben ist) gebunden. Dieses Wassermolekül bildet seinerseits zum Carbonylsauerstoffatom des Phenylalanins 227 eine Wasserstoffbrücke aus (2.9 Å). Serin 190 in Trypsin ist in der Thrombinstruktur durch die hydrophobe Aminosäure Alanin ersetzt, so daß in diesem Falle keine weitere Wasserstoffbrücke geknüpft werden kann.

Ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt wird durch zwei schwache Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Protein eingegangen. Die Aminogruppe des zentralen Aspartylrestes im Inhibitor formt einen nicht-kovalenten Kontakt mit der Carbonylgruppe des Glycins 216 (2.7 Å), während die Carbonylgruppe des Aspartats eine Wasserstoffbrücke mit dem Stickstoffatom des Glycins 216 (3.0 Å) eingeht.

Weitere Wasserstoffbrücken verknüpfen das Seitenketten-Sauerstoffatom ( $O^\gamma$ ) dieses zentralen Aspartylrestes mit der Aminogruppe von Glycin 219 (3.1 Å) sowie zwei Wassermolekülen (W132 und W238). Die Carboxylgruppe des N-substituierten Glycins im Inhibitor zeigt zusätzliche günstige Kontakte mit dem Protein und zwei Wassermolekülen. Das eine Sauerstoffatom der Carboxylgruppe bindet an ein Wassermolekül (3.0 Å, W215), das andere geht zwei Wasserstoffbrücken mit dem aktiven Zentrum von Thrombin ein, einerseits mit dem Hydroxylsauerstoffatom von Serin 195 (2.7 Å) und andererseits mit dem  $N^\epsilon$ -Atom im Imidazolring von Histidin 57 (2.7 Å). Ein weiterer polarer Kontakt besteht mit einem Wassermolekül (2.9 Å, W111).

Die zwei Sauerstoffatome der Sulfonylgruppe orientieren sich von der Thrombinoberfläche weg, ohne einen direkten Kontakt mit dem Protein einzugehen. Der Naphthylring des Inhibitors besetzt die  $S_3$ -Aromatenbindetasche von Trypsin, während der Cyclopropanring in der hydrophoben  $S_2$ -Bindetasche lokalisiert ist.

### 3.4 Thermodynamische Messungen

#### 3.4.1 Bestimmung der Bindungskonstanten K

Für die Serie **1a-1dAc** sowie die Verbindungen **2** und **3** konnten die Bindungskonstanten K für die Wechselwirkung mit Trypsin thermodynamisch bestimmt werden. In Tabelle 3.7 sind die Werte für vier verschiedene Puffersysteme aufgelistet. Für die Serie **1a-1dAc** wird ein Bereich von  $0.4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  bis  $44 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  für die Bindungskonstanten abgedeckt. Im Rahmen der Meßfehler sind die Bindungskonstanten für den jeweiligen Inhibitor, der in vier verschiedenen Puffern gemessen wurden, gleich.

Substanz	Bindungskonstanten K ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ )			
	TRIS	TRICINE	HEPES	Pyrophosphat
<b>1a</b>	25.4±8.0	30.2±7.0	21.1±6.6	27.8±7.0
<b>1b</b>	3.79±1.50	4.45±1.50	2.11±0.71	2.44±0.19
<b>1bMe</b>	4.37±2.90	3.17±0.78	3.21±1.00	3.11±1.10
<b>1c</b>	1.26±0.20	--*	1.10±0.10	1.68±0.29
<b>1cMe</b>	35.7±8.0	--*	17.0±9.0	44.0±8.1
<b>1d</b>	8.00±0.62	9.34±0.90	7.25±1.60	14.2±5.2
<b>1dAc</b>	25.0±7.0	--*	18.0±5.0	30.3±5.2
<b>2</b>	0.41±0.03	**	0.40±0.05	0.40±0.07
<b>3</b>	6.55±0.95	6.61±1.20	3.71±0.90	5.22±0.70

**Tabelle 3.7:** Bindungskonstanten K für verschiedene Inhibitoren gegenüber Trypsin. Die Werte wurden für vier verschiedene Puffersysteme ermittelt. \*: Nicht bestimmt. \*\*: Die Bindungskonstante von **2** gegenüber Trypsin ist nicht meßbar, weil kein enthalpischer Beitrag bei diesen Meßbedingungen beobachtet werden kann (siehe auch Tabelle 3.12).

In Tabelle 3.8 sind die  $pK_D$ -Werte aufgeführt, die den negativen dekadischen Logarithmus der Dissoziationskonstanten  $K_D$  darstellen. Sie verhalten sich reziprok zur gemessenen Bindungskonstanten  $K$  (siehe Gleichungen 2.18 und 2.19). Die Bindungskonstanten wurden in Pyrophosphatpuffer gemessen, um eventuelle Effekte von mit der Bindungsreaktion gekoppelten Protonierungsreaktion auszuschließen bzw. zu minimieren (siehe Kapitel 2.3.5).

Dem sind die kinetisch bestimmten Inhibitionskonstanten  $K_i$  gegenübergestellt. Tabelle 3.8 und Abbildung 3.10 zeigen, daß die thermodynamisch gemessenen Werte gut mit den kinetisch bestimmten Größen übereinstimmen.

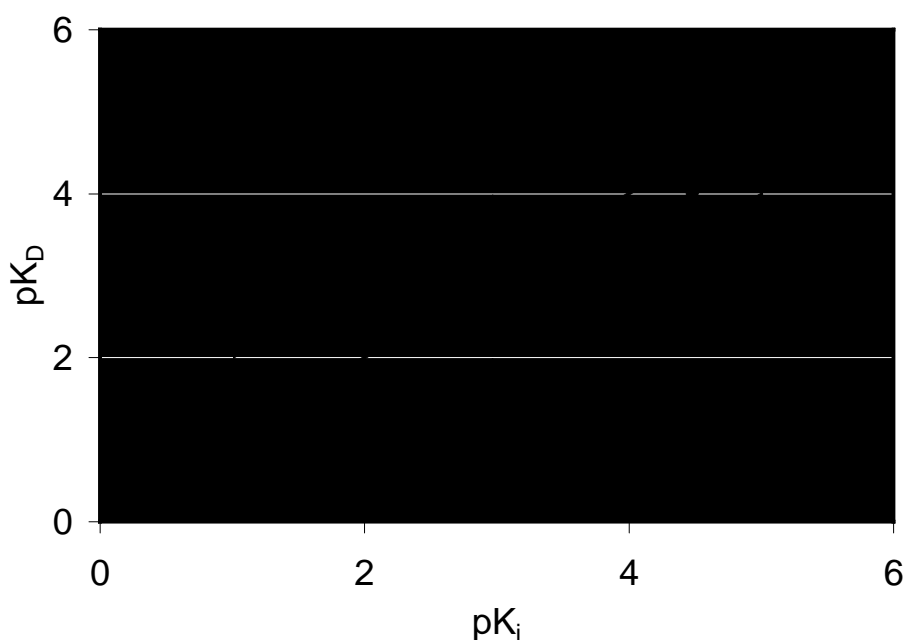
Substanz	Trypsin			
	kinetisch ( $K_i$ in nM)	kinetisch $pK_i$	thermodynamisch ( $K_D$ in nM)	thermodynamisch $pK_D$
<b>1a</b>	42	7.3	39±10	7.4±0.1
<b>1b</b>	660	6.2	264±20	6.6±0.1
<b>1bMe</b>	1100	6.0	229±80	6.6±0.2
<b>1c</b>	220	6.7	794±137	6.1±0.1
<b>1cMe</b>	21	7.7	28±5	7.6±0.1
<b>1d</b>	120	6.9	125±15	6.9±0.1
<b>1dAc</b>	44	7.4	40±7	7.4±0.1
<b>2</b>	11600	4.9	2500±438	5.6±0.1
<b>2Et</b>	30000*	4.5	> 10000	≈ 5
<b>3</b>	410	6.4	153±21	6.8±0.1

**Tabelle 3.8:** Vergleich der kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten  $K_i$  ( $pK_i$ ) (Kapitel 6.5) und der thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten  $K_D$  ( $pK_D$ ) (Kapitel 6.8). \*: Nach Hilpert et al., 1994

Im Rahmen des Meßfehlers sind die  $pK$ -Werte für **1a**, **1cMe**, **1d** und **1dAc** nahezu identisch. Die Meßfehler für  $K_D$  bzw.  $pK_D$  sind in Tabelle 3.8 angegeben. Bei den kinetisch gemessenen  $K_i$ -Wert liegt der maximale Fehler bei 20 %.

Abweichungen bis zu 13 % ergeben sich für die  $pK_D$ -Werte von **1b**, **1bMe**, **2**, **2Et** und **3**. Betrachtet man beispielsweise die  $pK_i$ - bzw.  $pK_D$ -Werte für **1bMe** (6.0 vs. 6.6), so würden diese Werte (Verhältnis 1.1) bei 25°C einem Energieunterschied in  $\Delta G$  von 3.9 kJ/mol entsprechen. Bei einer Freien Enthalpie  $\Delta G = -37.9$  kJ/mol für **1bMe** (Tabelle 3.9) wäre das ein Fehler von 10.3 %, der im Bereich der Meßungenauigkeit von thermodynamisch bestimmten Größen liegt.

Beim Vergleich der Dissoziationskonstanten  $pK_D$ , die durch thermodynamische Messungen bestimmt wurden, mit den kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten  $pK_i$  fällt auf, daß sich die Werte um weniger als 0.7 logarithmische Einheiten unterscheiden.



**Abbildung 3.10:** Korrelation zwischen kinetisch gemessenen Inhibitionskonstanten  $pK_i$  und den thermodynamisch gemessenen Dissoziationskonstanten  $pK_D$ . Die gestrichelten Linien deuten die Abweichung einer Größenordnung an.

### 3.4.2 Änderung der Protonierungszustände während der Bindung

#### 3.4.2.1 Messungen in Pyrophosphatpuffer

**Trypsininhibition.** Für die Verbindungen **1a-1dAc** sowie **2** und **3** wurden die kompletten thermodynamischen Parameter für die Bindung an Trypsin bestimmt. Die gesamte Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  und die Bindungskonstante  $K$  wurden direkt aus der beobachteten Bindungsisothermen bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2). Die Freie Enthalpie  $\Delta G$  leitet sich aus der Bindungskonstanten  $K$  nach Gleichung 2.18 ab. Der entropische Anteil ergibt sich dann aus der Differenz von Freier Enthalpie  $\Delta G$  und beobachteter Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  nach Gleichung 2.17. Die Bindungsisotherme wurde nur dann zur Auswertung herangezogen, wenn sich ein stöchiometrischer Faktor von 0.8 bis 1.1 für die jeweilige Messung ergab.

Substanz	$\Delta H_{\text{ges}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$K$ (10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>1a</b>	-27.1±1.1	-15.4±1.3	27.8±7.0	-42.5±0.6
<b>1b</b>	-42.0±0.5	5.6±0.5	2.44±0.19	-36.4±0.2
<b>1bMe</b>	-16.9±0.8	-20.6±1.2	3.11±1.10	-37.9±0.9
<b>1c</b>	-26.8±0.8	-8.7±0.9	1.68±0.29	-35.5±0.4
<b>1cMe</b>	-39.6±1.0	-4.0±1.1	44.0±8.1	-43.6±0.5
<b>1d</b>	-16.4±1.0	-24.4±1.3	14.2±5.0	-40.8±0.9
<b>1dAc</b>	-34.5±0.8	-8.2±0.9	30.3±5.2	-42.7±0.4
<b>2</b>	-30.1±0.9	-1.9±1.0	0.40±0.07	-32.0±0.4
<b>3</b>	-27.7±1.2	-10.6±1.2	5.22±0.70	-38.3±0.3

**Tabelle 3.9:** Thermodynamische Parameter  $\Delta H_{\text{ges}}$ ,  $\Delta G$  und  $\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$  und  $K$  für verschiedene Liganden gegenüber Trypsin. Die Messungen wurden in Pyrophosphatpuffer durchgeführt. Die Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  und die Bindungskonstante  $K$  wurden direkt aus der gemessenen Bindungsisothermen abgeleitet.

Die thermodynamischen Parameter sämtlicher Inhibitoren wurden anschließend zur Bestimmung sich überlagernder Prozesse in vier verschiedenen Puffern ermittelt (Pyrophosphat, HEPES, TRICINE und TRIS, siehe Kapitel 3.4.2.2).

In Tabelle 3.9 sind die in Pyrophosphatpuffer gemessenen thermodynamischen Parameter für **1a-1dAc** sowie **2** und **3** zusammengefaßt. Die  $\Delta G$ -Werte liegen in einem relativ kleinen Bereich von  $-32.0$  und  $-43.6$  kJ/mol, während bei den gemessenen enthalpischen Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  der Meßbereich erheblich größer ist ( $-16.4$  bis  $-42.0$  kJ/mol).

Dementsprechend wirken sich die größeren Schwankungen dieser Größe innerhalb der Reihe auch auf den Betrag des entropischen Terms aus. Diese Werte liegen im Bereich von  $-24.4$  bis  $+5.6$  kJ/mol.

Substanz	$\Delta H_{\text{ges}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$K_i$ (nM)	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>1cMe</b>	$-18.3 \pm 0.8$	$-27.3$	10	$-45.6$
<b>1dAc</b>	$-16.0 \pm 1.4$	$-29.2$	12	$-45.2$
<b>2</b>	$-70.0 \pm 2.1$	$17.8$	0.7	$-52.2$
<b>2Et</b>	$-24.4 \pm 0.9$	$-15.9$	86	$-40.3$
<b>3</b>	$-48.5 \pm 1.0$	$-0.7$	0.5	$-49.2$
<b>4</b>	$-57.8 \pm 2.0$	$10.0$	4.2	$-47.8$
<b>5</b>	$-37.0 \pm 1.2$	$-10.9$	4	$-47.9$

**Tabelle 3.10:** Thermodynamische Parameter  $\Delta H_{\text{ges}}$ ,  $\Delta G$  und  $\Delta G - \Delta H_{\text{ges}}$  und  $K$  für verschiedene Liganden gegenüber Thrombin. Die Messungen wurden in Pyrophosphatpuffer durchgeführt. Die Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  wurden direkt aus der gemessenen Bindungsisothermen abgeleitet. Als Bindungskonstante  $K$  wurde der reziproke Wert der Inhibitionskonstanten  $K_i$  genommen (Tabellen 3.1 und 3.2).

**Thrombininhibition.** Die Substanzen **1cMe**, **1dAc**, **2**, **2Et**, **3**, **4** und **5** wurden gegenüber Thrombin thermodynamisch vermessen. Die auftretende Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  wurde direkt



aus der beobachteten Bindungsisothermen bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2), während für die Bindungskonstanten  $K$  der reziproke Wert der kinetisch bestimmten Inhibitionskonstanten  $K_i$  übernommen wurde, weil die Steilheit der sigmoiden Bindungsisotherme keine präzise Bestimmung der Bindungskonstanten zuließ (siehe Gleichung 2.21).

Auch die thermodynamischen Parameter sämtlicher Thrombinnhibitoren wurden wie bei der Trypsininhibierung in vier verschiedenen Puffern gemessen (Pyrophosphat, HEPES, TRICINE und TRIS, siehe Kapitel 3.4.2.2).

Während die Freien Enthalpien  $\Delta G$  im Bereich von  $-40.3$  bis  $-52.2$  kJ/mol liegen, ist der Bereich für die gemessenen Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  viel größer. Dieser umfaßt Wechselwirkungen von  $-16.0$  bis zu  $-70.0$  kJ/mol (Tabelle 3.10).

### 3.4.2.2 Korrektur des Pufferbeitrages

Um die intrinsische Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  zu bestimmen, wurden die ITC-Experimente bei pH 7.8 und  $25^\circ\text{C}$  in vier verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_{\text{ion}}$  durchgeführt: Pyrophosphat, HEPES, TRICINE und TRIS (Kapitel 6.8). Die jeweiligen Meßpuffer enthielten 50 mM Puffersubstanz, 100 mM Natriumchlorid und 0.1 Gew.-% Polyethylenglykol 8000. In Tabelle 3.11 sind die verwendeten Puffersubstanzen mit ihren entsprechenden Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_{\text{ion}}$  aufgeführt (siehe Kapitel 2.3.5).

Puffersubstanz	Ionisierungsenthalpie $\Delta H_{\text{ion}}$ (kJ/mol)
Pyrophosphat	5.12
HEPES	21.07
TRICINE	31.97
TRIS	48.07

**Tabelle 3.11:** Übersicht über die verwendeten Ionisierungsenthalpien bei  $25^\circ\text{C}$ . Die Werte beziehen sich auf die Deprotonierung der Puffersubstanz.

---

Werden gleichzeitig mit der Bindungsreaktion Protonen vom untersuchten System aufgenommen oder abgegeben, müssen der enthalpische Beitrag des Puffers bzw. die enthalpischen Beiträge der ionisierbaren Protein- bzw. Ligandengruppen, auf die diese Protonierungsreaktionen zurückzuführen sind, von der gemessenen Gesamtenthalpie  $\Delta H_{\text{ges}}$  abgezogen werden, um die intrinsische Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  zu erhalten. Nach Abzug der Ionisierungsenthalpie des Puffers erhält man die korrigierte Enthalpie  $\Delta H_x$ . Erst nach der anschließenden Korrektur um den enthalpischen Beitrag der ionisierbaren Protein- bzw. Ligandengruppe ergibt sich die intrinsische Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  (siehe nächstes Kapitel).

**Trypsininhibition.** Für **1a**, **1bMe**, **1c**, **1cMe**, **1dAc** und **3** sind die gemessenen  $\Delta H_{\text{ges}}$ -Werte unabhängig vom Puffer in allen vier Puffern praktisch konstant (Tabelle 3.12). Das bedeutet, daß bei der Bindung dieser sechs Inhibitoren an Trypsin keine Protonen zwischen den Bindungspartnern Inhibitor und Enzym bzw. Inhibitor/Enzym und Puffer ausgetauscht werden. Bei der weiteren Betrachtung und Diskussion der intrinsischen Enthalpien  $\Delta H_{\text{bind}}$  für diese sechs Substanzen gegenüber Trypsin werden im folgenden die Enthalpien  $\Delta H_{\text{ges}}$  herangezogen, die für den Puffer Pyrophosphat gemessen wurden.

Es wurde beobachtet, daß die gemessenen Enthalpien  $\Delta H_{\text{ges}}$  für **1b**, **1d** und **2** gegenüber Trypsin eine Abhängigkeit von der verwendeten Puffersubstanz zeigen. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß für **2** bei der Meßtemperatur von 25°C eine endotherme Reaktion in TRIS-Puffer beobachtet wird, in HEPES- bzw. Pyrophosphatpuffer hingegen eine exotherme Reaktion abläuft. Unter den Meßbedingungen des TRICINE-Puffers kann bei einer Meßtemperatur von 25°C kein enthalpischer Betrag beobachtet werden. Deshalb ist es auch nicht möglich, in diesem Falle die Stöchiometrie und die Bindungskonstante  $K$  bzw. die Freie Enthalpie  $\Delta G$  zu bestimmen.

Die Art der Abhängigkeit der Enthalpie  $\Delta H_{\text{ges}}$  von der Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  ist für **1b** und **2** gleich. Die größten Enthalpien wurden in TRIS-Puffer gemessen, während in Pyrophosphat-Puffer, der die kleinste Ionisierungsenthalpie aufweist, die am stärksten negativen Enthalpien  $\Delta H_{\text{ges}}$  gemessen wurden. Im Gegensatz dazu wurde für **1d** in TRIS-Puffer die stärksten negative Enthalpie gemessen, während die gemessene Enthalpie in Pyrophosphatpuffer den größeren Wert aufweist.

Substanz	Enthalpie $\Delta H_{\text{ges}}$ (kJ/mol) gegen Trypsin			
	TRIS	TRICINE	HEPES	Pyrophosphat
<b>1a</b>	-28.8±0.6	-27.8±1.2	-24.4±0.4	-27.1±1.1
<b>1b</b>	-3.0±0.8	-16.9±0.3	-30.0±1.8	-42.0±0.8
<b>1bMe</b>	-16.4±0.7	-15.9±0.5	-16.0±0.5	-16.9±0.8
<b>1c</b>	-25.5±0.5	--	-25.5±0.8	-26.8±0.8
<b>1cMe</b>	-40.7±0.6	--	-37.9±1.0	-39.6±1.0
<b>1d</b>	-39.6±0.7	-30.1±1.0	-26.8±1.3	-16.4±1.0
<b>1dAc</b>	-36.8±0.7	--	-34.4±0.8	-34.5±1.0
<b>2</b>	10.0±1.1	~ 0	-10.0±0.9	-30.1±1.0
<b>3</b>	-25.6±0.5	-25.9±1.0	-24.7±1.2	-27.7±0.5

**Tabelle 3.12:** Gemessene Enthalpien  $\Delta H_{\text{ges}}$  für verschiedene Inhibitoren in unterschiedlichen Puffern bei 25°C gegenüber Trypsin. \*: Nicht bestimmt.

**Thrombininhibition.** Die Enthalpiewerte für **2Et** und **3**, die in TRIS-Puffer gemessen wurden, weichen von den jeweils anderen drei Enthalpiewerten, die in TRICINE-, HEPES- und Pyrophosphatpuffer gemessen wurden ab. Für **2Et** wurde ein Wert von  $-34.7$  kJ/mol gemessen, der maximal um  $10.3$  kJ/mol von dem größten der anderen gemessenen Enthalpien abweicht. Bei **3** beträgt der gemessene Wert  $\Delta H_{\text{ges}}$   $-57.7$  kJ/mol und weicht maximal  $9.2$  kJ/mol von dem größten der anderen drei Enthalpiewerten ab. Während der in TRIS-Puffer gemessene Wert für **4** im Rahmen des Meßfehlers gleich den anderen Meßwerten für **4** ist, weicht die Enthalpie, die für **5** in TRIS-Puffer gemessen wurde, um maximal  $6.2$  kJ/mol von dem kleinsten der anderen gemessenen Enthalpien ab.

Die drei Meßwerte in TRICINE-, HEPES- und Pyrophosphatpuffer sind im Rahmen der üblichen Meßungenauigkeit als gleich anzusehen. Eine Erklärung für die abweichenden Enthalpien (außer für **4**) aus dem TRIS-Puffer könnte der Ladungszustand der Puffersubstanz

sein, der die Eigenschaften des Enzyms möglicherweise beeinflusst. Der TRIS-Puffer unterscheidet sich durch seine positive Gesamtladung von allen anderen verwendeten Puffersubstanzen. Der TRICINE- bzw. HEPES-Puffer stellen bei pH=7.8 zwitterionische Verbindungen dar. Die Ionisierungsstufen des Pyrophosphats sind unter den angewandten pH-Bedingungen alle negativ geladene Spezies.

Allerdings werden nicht systematisch kleinere oder größere Werte für die Messungen in TRIS-Puffer gefunden. Daher scheint die Erklärung auf molekularer Ebene sehr komplex zu sein. Wegen dieses ungeklärten Phänomens sollen die TRIS-Werte der Thrombinbindung für die folgenden Betrachtungen nicht weiter berücksichtigt werden.

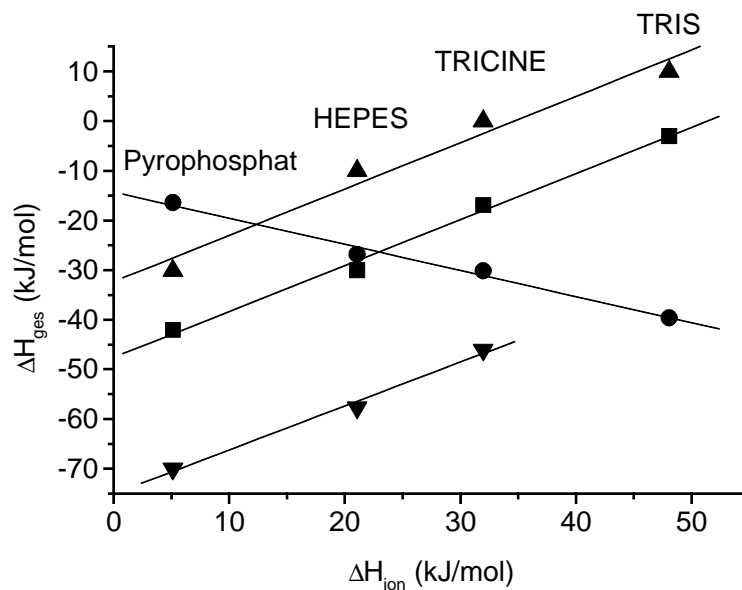
Unter Berücksichtigung der oben genannten Ausnahmen bedeutet dies, daß bei der Bindung von **2Et**, **3**, **4** und **5** an Thrombin keine Protonen zwischen den Bindungspartnern Inhibitor und Enzym einerseits und dem Puffer andererseits ausgetauscht werden. Bei der weiteren Betrachtung und Diskussion der intrinsischen Enthalpien  $\Delta H_{\text{bind}}$  dieser vier Substanzen gegenüber Thrombin werden im folgenden die Enthalpien  $\Delta H_{\text{ges}}$  verwendet, die für den Pyrophosphatpuffer gemessen wurden.

Substanz	Enthalpie $\Delta H_{\text{ges}}$ (kJ/mol) gegen Thrombin			
	TRIS	TRICINE	HEPES	Pyrophosphat
<b>2</b>	-41.9±0.9	-46.0±2.5	-57.7±0.6	-70.0±2.1
<b>2Et</b>	-34.7±1.0	-24.9±0.7	-26.6±1.0	-24.4±0.9
<b>3</b>	-57.7±1.4	-50.8±0.6	-49.9±1.0	-48.5±1.0
<b>4</b>	-56.6±1.2	-55.6±1.0	-53.9±0.7	-57.8±2.0
<b>5</b>	-30.8±1.2	-34.9±1.1	-35.3±0.7	-37.0±1.2

**Tabelle 3.13:** Gemessene Enthalpien  $\Delta H$  für verschiedene Inhibitoren in unterschiedlichen Puffern bei 25°C gegenüber Thrombin.

Napsagatran **2** zeigt gegenüber Thrombin gleiches Verhalten wie bei der Bindung an Trypsin. Die in TRIS-Puffer gemessene Enthalpie  $\Delta H_{\text{ges}}$  ist am kleinsten, dagegen tritt in Pyrophosphatpuffer der am stärksten negative Wert auf.

**Korrektur.** Um die korrigierte Bindungsenthalpie  $\Delta H_x$  zu bestimmen, wurden die ITC-Messungen bei pH=7.8 in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Ionisierungsenergien durchgeführt (Christensen, 1976; Fukada, 1998). In Tabelle 3.11 sind die jeweiligen Ionisierungsenthalpien für die Puffersubstanzen aufgeführt (siehe auch Kapitel 6.8). Die Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_{\text{ion}}$  beziehen sich jeweils auf die Deprotonierung der betrachteten funktionellen Gruppe (siehe Kapitel 2.3.5).



**Abbildung 3.11:** Auftragung der gemessenen Enthalpie  $\Delta H_{\text{ges}}$  gegen die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  und anschließende lineare Regression. Die Anzahl  $n$  der vom Puffer übertragenen Protonen ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden und die korrigierte Enthalpie  $\Delta H_x$  aus dem Achsenabschnitt auf der Ordinate  $\Delta H_{\text{ges}}$ . Eine positive Steigung der Regressionsgeraden bedeutet eine Protonenabgabe des Puffers und eine Protonenaufnahme des Enzym-Liganden-Systems. / **1b**-Trypsin, ? **1d**-Trypsin, ? **2**-Trypsin, ? **2**-Thrombin.

Nach Auftragung der gemessenen Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  gegen die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  des Puffers können durch lineare Regressionsanalyse die Anzahl der vom Puffer auf das Protein-Ligand-System übertragenen Protonen (Größe  $n$ ) und die Enthalpie  $\Delta H_x$  der Reaktion, die die um  $\Delta H_{\text{ion}}$  korrigierte Reaktionsenthalpie  $\Delta H_{\text{ges}}$  darstellt, bestimmt werden.

Die Größe  $n$  ergibt sich nach Gleichung 2.26 aus der Steigung der Regressionsgeraden und  $\Delta H_x$  als Achsenabschnitt auf der Ordinate  $\Delta H_{\text{ges}}$  (Abbildung 3.11).

Weil die gemessene Enthalpien  $\Delta H_{\text{ges}}$  für die Reaktion von **1b**, **1d** und **2** gegenüber Trypsin und für die Reaktion von **2** gegenüber Thrombin vom verwendeten Puffer abhängig waren, wurde für diese Reaktionen die beschriebene Enthalpiekorrektur durchgeführt.

Es zeigt sich durch Auswertung der Abbildung 3.11, daß bei der Reaktion von **1b** mit Trypsin sowie bei den Reaktionen von **2** mit Trypsin und Thrombin Protonen vom Puffer abgegeben werden, die wiederum vom Enzym-Ligand-System aufgenommen werden, während bei der Komplexbildung von **1d** mit Trypsin im Mittel 0.53 ( $\pm 0.04$ ) Protonen während des Bindungsschritts vom Enzym-Ligand-System an den Puffer abgegeben werden (Tabelle 3.14).

Ligand	Enzym	$n$	$\Delta H_x$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>1b</b>	Trypsin	0.90 $\pm$ 0.06	-47.6 $\pm$ 1.9
<b>1d</b>	Trypsin	-0.53 $\pm$ 0.04	-14.3 $\pm$ 1.3
<b>2</b>	Trypsin	0.93 $\pm$ 0.12	-32.3 $\pm$ 3.6
<b>2</b>	Thrombin	0.88 $\pm$ 0.08	-75.1 $\pm$ 1.8

**Tabelle 3.14:** Korrektur ( $\Delta H_x = \Delta H_{\text{ges}} - n\Delta H_{\text{ion}}$ ) der gemessenen Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  um die Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_{\text{ion}}$ , die vom verwendeten Puffer herrühren. Die Werte sind die linearen Regressionsanalyse in Abbildung 3.8 entnommen. Positive  $n$ -Werte deuten auf eine Protonenaufnahme des Systems hin.

### 3.4.2.3 Korrektur der Ionisierung von funktionellen Gruppen

Die Korrektur der gemessenen Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  für die Reaktionen von **1b**, **1d** und **2** mit Trypsin bzw. die Reaktion von **2** mit Thrombin um die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  des Puffers ergibt die Enthalpie  $\Delta H_x$  (Abbildung 3.11 und Tabelle 3.14). Als weiterer Korrekturterm muß noch die Ionisierungsenthalpie der funktionellen Gruppe des Liganden bzw. des Proteins, die während der eigentlichen Bindungsreaktion protoniert bzw. deprotoniert wird, berücksichtigt werden. Bei den oben genannten vier Reaktionen werden jeweils funktionelle Gruppen des Liganden protoniert bzw. deprotoniert. Die ausführliche Beschreibung und Diskussion zur Bestimmung der betreffenden funktionellen Gruppe befindet sich in Kapitel 4.

Die Ionisierungsenthalpien von N-Acetylglycin, N-Acetylpiperidin-2-carbonsäure (N-Acetylpipecolinsäure) und N-Acetylpiperazin wurden gemessen (siehe Kapitel 6.8, Tabelle 6.4). N-Acetylglycin mit seiner freien Carbonsäuregruppierung dient als Modellverbindung für die Carboxylgruppe von **2**, dementsprechend N-Acetylpiperidin-2-carbonsäure als Modell für die Carbonsäure von **1b** und N-Acetylpiperazin mit seiner freien Aminogruppe als Modell für die C-terminale Aminofunktion von **1d**.

In Übereinstimmung mit der sehr kleinen Ionisierungsenthalpie für Essigsäure/Acetat-Puffer von 0.4 kJ/mol (Christensen *et al.*, 1976) zeigten auch die Carboxylgruppen von N-Acetylglycin und N-Acetylpiperidin-2-carbonsäure nur kleine Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_i$  von  $0.84 \pm 0.34$  kJ/mol bzw.  $2.26 \pm 0.56$  kJ/mol, während die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_i$  der freien Aminogruppe von N-Acetylpiperazin einen Wert von  $35.16 \pm 0.98$  kJ/mol besitzt. Die Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_i$  beziehen sich immer auf die Deprotonierung der funktionellen Gruppe (siehe Kapitel 6.8).

Bei der Reaktion von **1b** mit Trypsin sowie bei den Reaktionen von **2** mit Trypsin bzw. Thrombin werden jeweils die freie Carboxylfunktionen während der Bindungsreaktion protoniert (positiver n-Wert). Der exotherme enthalpische Beitrag dieser Protonierungsreaktion muß von der korrigierten Enthalpie  $\Delta H_x$  subtrahiert werden.

Eine ähnliche Argumentation gilt auch für die Reaktion von **1d** mit Trypsin. Zusätzlich zur Korrektur der Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  des Puffers (in diesem Falle exotherm) wurde die teilweise Deprotonierung des Piperazinrestes des Liganden ( $n=0.53$ ) in Wasser um die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_i$  von 35.16 kJ/mol für die Aminogruppe korrigiert (Tabelle 6.5).

$$\Delta H_{\text{bind}} = \Delta H_x + n \cdot \Delta H_i \quad (\text{Gleichung 3.4})$$

Ligand	Enzym	$\Delta H_x$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	n	$\Delta H_i$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{\text{bind}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>1b</b>	Trypsin	-47.6±1.9	0.90±0.06	2.26±0.56	-45.6±2.0
<b>1d</b>	Trypsin	-14.3±1.3	-0.53±0.04	35.16±0.98	-32.9±2.2
<b>2</b>	Trypsin	-32.3±3.6	0.93±0.12	0.84±0.34	-31.5±3.6
<b>2</b>	Thrombin	-75.1±1.8	0.88±0.08	0.84±0.34	-74.4±1.8

**Tabelle 3.15:** Korrektur der Enthalpien  $\Delta H_x$  um die Ionisierungsenthalpien  $\Delta H_i$ , die von der ionisierbaren funktionellen Gruppe des Liganden herrühren, nach Gleichung 3.4.

#### 3.4.2.4 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  $\Delta H_{\text{bind}}$  die Netto-Reaktionenthalpie des Assoziationsschrittes zwischen Ligand und Protein bei 25 °C. Ausgehend von dieser Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  kann der entropische Beitrag  $-T\Delta S$  nach Gleichung 2.17 berechnet werden. Als Bindungskonstante  $K$  bzw. Freie Enthalpie  $\Delta G$  wurden die in Pyrophosphat bestimmten Meßwerte übernommen.



Wenn, wie im Falle der Bindungsreaktion mit Thrombin, die Steigung der sigmoidalen Bindungsisothermen zu steil war, um einen präzisen Wert für  $K$  und  $\Delta G$  abzulesen, wurden die kinetisch bestimmten Inhibitionskonstanten  $K_i$  übernommen, die nach Gleichungen 2.20 und 2.21 in die Bindungskonstanten  $K$  und die Freien Enthalpien  $\Delta G$  umzurechnen waren. Es bleibt festzuhalten, daß die in unterschiedlichen Puffern gemessenen Bindungskonstanten  $K$  im Rahmen des Meßfehlers nahezu gleich sind (siehe Abbildung 3.10).

In den Tabellen 3.16 und 3.17 sind alle Meßwerte unter der Berücksichtigung aller beschriebenen Korrekturen zusammengestellt.

**Trypsinsinhibition.** Betrachtet man die beiden Säurepaare bzw. die davon abgeleiteten Ester **1b/1bMe** und **1c/1cMe**, so fällt auf, daß die entropischen Terme  $-T\Delta S$  für das Paar **1c/1cMe** ähnlich sind, während die  $-T\Delta S$ -Werte für **1b** und **1bMe** stark voneinander abweichen (Tabelle 3.16).

Sind die Freien Enthalpien  $\Delta G$  für **1b** und **1bMe** nahezu gleich, so spalten sich beide in unterschiedliche entropische und enthalpische Anteile auf. Die freie Carbonsäure **1b** besitzt einen stärker negativen enthalpischen Beitrag für die Bindungsreaktion als der Ester **1bMe**. Allerdings ist die Bindung von **1b** ( $-T\Delta S = 9.2$  kJ/mol) im Gegensatz zur Bindung von **1bMe** an Trypsin entropisch ungünstig.

Beim Paar **1c** und **1cMe** weichen die Freien Enthalpien  $\Delta G$  deutlich voneinander ab ( $-35.5$  kJ/mol für **1c** vs.  $-43.6$  kJ/mol für **1cMe**). Dieser Unterschied spiegelt sich auch in den enthalpischen Anteilen wieder. Das Substanzpaar **1d/1dAc** besitzt sowohl nahezu gleiche Freie Bindungsenthalpien  $\Delta G$  wie auch gleiche enthalpische und entropische Anteile.

Für **2** drückt sich  $\Delta G$  fast ausschließlich durch die gemessene Enthalpie  $\Delta H$  aus. Der entropische Anteil für die Komplexbildung zwischen **2** und Trypsin ist fast Null. Vergleicht man die thermodynamischen Parameter für **2** mit denen für **3** in Komplex mit Trypsin, so ist die Bindungskonstante  $K$  für **3** um eine Größenordnung größer. Der zusätzliche Gewinn an Freier Bindungsenthalpie gegenüber **2** rührt von dem günstigeren entropischen Beitrag für diese Reaktion her.

Substanz	$\Delta H_{\text{bind}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	K (10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>1a</b>	-27.1±1.1	-15.4±1.3	27.8±7.0	-42.5±0.6
<b>1b</b>	<b>-45.6±2.0</b>	<b>9.2±2.0</b>	2.44±0.19	-36.4±0.2
<b>1bMe</b>	-16.9±0.8	-20.6±1.2	3.11±1.10	-37.9±0.9
<b>1c</b>	-26.8±0.8	-8.7±0.9	1.68±0.29	-35.5±0.4
<b>1cMe</b>	-39.6±1.0	-4.0±1.1	44.0±8.1	-43.6±0.5
<b>1d</b>	<b>-32.9±2.2</b>	<b>-7.9±2.4</b>	14.2±5.0	-40.8±0.9
<b>1dAc</b>	-34.5±0.8	-8.2±0.9	30.3±5.2	-42.7±0.4
<b>2</b>	<b>-31.5±3.6</b>	<b>-0.5±3.6</b>	0.40±0.07	-32.0±0.4
<b>3</b>	-27.7±1.2	-10.6±1.2	5.22±0.70	-38.3±0.3

**Tabelle 3.16:** Thermodynamische Parameter  $\Delta H_{\text{bind}}$ ,  $\Delta G$  und  $-T\Delta S$  und  $K$  verschiedener Liganden für die Bindung an Trypsin. Die Bindungskonstanten  $K$  wurden direkt aus den in Pyrophosphatpuffer gemessenen Bindungsisothermen abgeleitet. Nach Gleichung 2.18 ergibt sich die Freie Enthalpie  $\Delta G$ , während der entropische Term  $-T\Delta S$  die Differenz aus der Freien Enthalpie  $\Delta G$  und der Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  beschreibt. Die Enthalpien  $\Delta H_{\text{bind}}$  für **1b**, **1d** und **2** sind die um die Ionisierungsenthalpien korrigierten Enthalpien (fett hervorgehoben), in den anderen Fällen, in denen keine Protonen übertragen wurden, wurden die in Pyrophosphatpuffer gemessenen Enthalpien übernommen.

Für die Reaktionen von **1b** und **2** mit Trypsin unterscheiden sich die in Pyrophosphatpuffer gemessenen Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  nur geringfügig von den korrigierten Enthalpien  $\Delta H_{\text{bind}}$  ( $-45.6\pm 2.0$  kJ/mol vs.  $-42.0\pm 0.5$  kJ/mol für **1b** bzw.  $-31.5\pm 3.6$  kJ/mol vs.  $-30.1\pm 0.9$  kJ/mol für **2**, siehe auch Tabellen 3.9 und 3.16). Beide Liganden nehmen während der eigentlichen Assoziation an das Enzym über ihre Carbonsäuregruppe jeweils ein Proton auf (für eine genaue Diskussion siehe Kapitel 4). Der endotherme Beitrag der Puffersubstanz Pyrophosphat ( $\Delta H_{\text{ion}} = 5.12$  kJ/mol), der durch die Abgabe des Protons an den gebildeten Komplex zustande kommt, wird durch den exothermen Beitrag der Protonierung der Carboxylgruppen von **1b**

bzw. **2** nahezu kompensiert. Dabei ist es wichtig, nochmals auf die sehr kleinen Ionisierungsenthalpien sowohl des Pyrophosphats (5.12 kJ/mol) als auch der Carboxylgruppen (2.26 kJ/mol bei **1b** bzw. 0.84 kJ/mol bei **2**) hinzuweisen.

Die freie Aminogruppe am C-terminalen Piperazinring von **1d** hat demgegenüber eine große Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_i$  ( $35.16 \pm 0.98$  kJ/mol). Wird auch hier die ursprünglich beobachtete Wärmetönung um die Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_{\text{ion}}$  des Puffers und um die relativ große Ionisierungsenthalpie  $\Delta H_i$  der freien Aminogruppe korrigiert, so unterscheidet sich die korrigierte Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  für die Assoziation von **1d** an Trypsin stark von der in Pyrophosphatpuffer gemessenen Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  ( $-32.9 \pm 2.2$  kJ/mol vs.  $-16.4 \pm 1.0$  kJ/mol, siehe auch Tabellen 3.9 und 3.16). Vergleicht man nach dieser Korrektur die enthalpischen und entropischen Beiträge des Substanzpaares **1d/1dAc** mit freier bzw. mit durch eine Acetylgruppe geschützter Aminogruppe, so zeigt sich, daß sich diese beiden Inhibitoren hinsichtlich ihrer thermodynamischen Parameter kaum unterscheiden (Tabelle 3.16).

**Thrombininhibition.** Die stärkste enthalpische Bindung gegenüber Thrombin geht **2** ein ( $-74.4$  kJ/mol, Tabelle 3.17), während der Ester **2Et** der Verbindung **2** nur mit  $\Delta H = -24.4$  kJ/mol bindet. Bemerkenswert ist auch, daß sich die Freien Bindungsenthalpien  $\Delta G$  für diese beiden Substanzen demgegenüber nur um 11.9 kJ/mol ( $-52.2$  kJ/mol für **2** vs.  $-40.3$  kJ/mol für **2Et**) unterscheiden. Die Bindung von **2** an Thrombin ist unter den Meßbedingungen entropisch ungünstig, weil der entropische Anteil  $-T\Delta S$  bei  $T = 25^\circ\text{C}$  positiv ist (25.3 kJ/mol). Dagegen ist die Bindung des Esters **2Et** mit negativem  $-T\Delta S$ -Wert entropisch begünstigt ( $-15.9$  kJ/mol).

Bei dem Paar **4/5** sind die Freien Bindungsenthalpien  $\Delta G$  mit  $-47.8$  bzw.  $-47.9$  kJ/mol nahezu identisch. Allerdings unterscheiden sich die beiden Substanzen erheblich in ihren enthalpischen und entropischen Anteilen. Ist bei **4** der entropische Anteil positiv, d.h. daß die Bindung ist entropisch ungünstig, so ist die Bindung von **5** an Thrombin entropisch begünstigt, weil der Term  $-T\Delta S$  hier negativ ist. Bei den Inhibitoren **4/5** überwiegt der enthalpische Anteil gegenüber dem entropischen Bindungsanteil, auch wenn bei **4** der

enthalpische Beitrag mit  $-57.8$  kJ/mol um  $20.8$  kJ/mol günstiger ist als der von **5** ( $-37.0$  kJ/mol).

Das Inhibitorpaar **1cMe/1dAc** zeigt ein anderes Verhalten. Der Bindungsmodus dieser Substanzen im Komplex mit Trypsin ist nahezu identisch. Beide sind auch in ihren thermodynamischen Eigenschaften sehr ähnlich. Sowohl der Meßwert der Freien Enthalpie  $\Delta G$  als auch der Enthalpie  $\Delta H$  sowie der entropische Anteil  $-T\Delta S$  für die Bindung von **1cMe** bzw. **1dAc** gegenüber Thrombin weichen kaum voneinander ab.

Verbindung **3** besitzt eine Inhibitionskonstante im nanomolaren Bereich und bindet mit  $\Delta G = -49.2$  kJ/mol an Thrombin. Bei der Meßtemperatur von  $25^\circ\text{C}$  ist die Komplexbildung zwischen **3** und Thrombin praktisch nur enthalpisch getrieben.

Substanz	$\Delta H_{\text{bind}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$-T\Delta S$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$K_i$ (nM)	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>1cMe</b>	$-18.3 \pm 0.8$	$-27.3$	10	$-45.6$
<b>1dAc</b>	$-16.0 \pm 1.4$	$-29.2$	12	$-45.2$
<b>2</b>	<b><math>-74.4 \pm 1.8</math></b>	<b>22.2</b>	0.7	$-52.2$
<b>2Et</b>	$-24.4 \pm 0.9$	$-15.9$	86	$-40.3$
<b>3</b>	$-48.5 \pm 1.0$	$-0.7$	2.3	$-49.2$
<b>4</b>	$-57.8 \pm 2.0$	10.0	4.2	$-47.8$
<b>5</b>	$-37.0 \pm 1.2$	$-10.9$	4	$-47.9$

**Tabelle 3.17:** Thermodynamische Parameter  $\Delta H_{\text{bind}}$ ,  $\Delta G$  und  $-T\Delta S$  und  $K$  für verschiedene Liganden gegenüber Thrombin. Als Bindungskonstante  $K$  wurde der reziproke Wert der Inhibitionskonstanten  $K_i$  genommen (Tabellen 3.1 und 3.2). Nach Gleichung 2.21 ergibt sich die Freie Enthalpie  $\Delta G$ , während der entropische Term  $-T\Delta S$  die Differenz aus der Freien Enthalpie  $\Delta G$  und der Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  ist. Die Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  für **2** ist die um die Ionisierungsenthalpien korrigierte Enthalpie (fett hervorgehoben), in den anderen Fällen, in denen keine Protonen übertragen wurden, wurden die in Pyrophosphatpuffer gemessenen Enthalpien übernommen.

Für die Reaktion von **2** mit Thrombin unterscheidet sich die anfangs in Pyrophosphatpuffer gemessene Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  kaum von der korrigierten Enthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  ( $-70.0 \pm 2.1$  kJ/mol vs.  $-74.4 \pm 1.8$  kJ/mol, siehe auch Tabellen 3.10 und 3.17). Die freie Carboxylgruppe von **2** nimmt während der eigentlichen Assoziation an das Enzym ein Proton auf (für eine genaue Diskussion siehe Kapitel 4). Der endotherme Beitrag der Puffersubstanz Pyrophosphat ( $\Delta H_{\text{ion}} = 5.12$  kJ/mol), der durch die Abgabe des Protons an den gebildeten Komplex zustande kommt, wird durch den exothermen Beitrag der Protonierung der Carboxylgruppe von **2** ( $\Delta H_i = 0.84$  kJ/mol) nahezu kompensiert (Tabelle 3.15).

### 3.4.3 Abhängigkeit der Enthalpie von den eingesetzten Salzen

Die Bindungsstudien wurden in Gegenwart von Salzen durchgeführt. Neben 50 mmol/l einer Puffersubstanz waren noch 100 mmol/l Natriumchlorid und 0.1 Gew-% Polyethylenglykol in der Standard-Pufferlösung enthalten, so daß die Salzkonzentration in etwa der physiologischen Salzkonzentration von 0.9 % (0.154 mM) entsprach. Um das Protein vollständig in Lösung zu halten, wurde Polyethylenglykol zugesetzt.

Es wurde untersucht, ob die Zusammensetzung des Puffers und die Konzentrationen der Pufferbestandteile einen Einfluß auf die thermodynamischen Parameter der Protein-Ligand-Assoziation nehmen.

Die Variation der Konzentration von Polyethylenglykol 8000 verändert die gemessenen Wärmetönungen  $\Delta H_{\text{ges}}$  nicht, während die Veränderung der Natriumchloridkonzentration (in sukzessiven Schritten von 100 mM) nur bei den Assoziationsreaktionen an Thrombin einen Einfluß auf die gemessene Enthalpie hat. Allerdings wird nur in vollständiger Abwesenheit von Natriumchlorid (z.B.  $-79.5 \pm 1.7$  kJ/mol für die Assoziation von **3** und Thrombin) eine andere Wärmetönung gemessen als bei Anwesenheit von Natriumchlorid. Eine Variation der Konzentration von Natriumchlorid im Bereich von 100 mM ( $-57.7 \pm 1.4$  kJ/mol) bis 900 mM

( $-56.7 \pm 1.0$  kJ/mol) ergibt keine signifikant unterschiedlichen Enthalpien. Bei Trypsin als Zielenzym nimmt die Natriumchloridkonzentration keinen Einfluß auf die Enthalpiemessung.

In einem weiteren Schritt wurde Natriumchlorid durch Chloride der anderen Alkalimetallionen ausgetauscht (Li, K, Rb und Cs). Die Enthalpien, die in Gegenwart von Natriumionen bei den Assoziationsreaktionen mit Thrombin gemessen wurden, zeigen signifikant unterschiedliche Werte im Vergleich zu allen anderen Messungen bei Abwesenheit von Natriumionen. Die gleichen Meßreihen mit Trypsin ergaben keinen solchen Effekt.

Substanz	Enzym	Bindungskonstanten $K$ ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ )				
		LiCl	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
<b>2</b>	Trypsin	--*	$0.41 \pm 0.03$	$0.95 \pm 0.21$	$1.05 \pm 0.41$	$0.72 \pm 0.29$
<b>3</b>	Trypsin	$3.71 \pm 0.45$	$6.55 \pm 0.95$	$4.98 \pm 1.11$	$6.03 \pm 0.91$	$6.23 \pm 0.88$

**Tabelle 3.18:** *Thermodynamisch gemessene Bindungskonstanten  $K$  in Abhängigkeit von dem verwendeten Salz bei einer Meßtemperatur von  $25^\circ\text{C}$ . Die Pufferlösung bestand aus  $50 \text{ mM TRIS}$ ,  $100 \text{ mM Salz}$  und  $0.1 \text{ Gew-\% Polyethylenglykol 8000}$ , eingestellt auf  $\text{pH } 7.8$ . \*: Nicht bestimmbar.*

Die beiden Inhibitoren Napsagatran **2** und CRC220 **3** wurden in Gegenwart unterschiedlicher Alkalimetallchloride auf ihre Bindung an Trypsin und Thrombin thermodynamisch untersucht.

Bei konstanter Meßtemperatur sind die Freien Enthalpien  $\Delta G$  bzw. Bindungskonstanten  $K$  für die Bindung an Trypsin innerhalb einer Meßreihe nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 3.18). Für die Messungen gegenüber Thrombin mußte aufgrund der Steilheit der sigmoiden Bindungsisothermen, die eine präzise Bestimmung der Bindungskonstanten nicht zuließ, auf die Umrechnung der Inhibitionskonstanten  $K_i$  (Tabelle 3.3) in Bindungskonstanten  $K$  nach den Gleichungen 2.19 und 2.20 zurückgegriffen werden. Aber auch die

Inhibitionskonstanten  $K_i$  bzw. die daraus nach Gleichung 2.21 berechneten Freien Enthalpien  $\Delta G$  zeigen keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Meßreihe.

Substanz	Enzym	Wärmetönung $\Delta H_{ges}$ (kJ/mol)				
		LiCl	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
2	Trypsin	8.0±1.3	10.0±1.1	5.5±0.5	6.6±0.6	8.9±0.5
2	Thrombin	-65.2±1.2	-41.9±0.9	-63.2±1.0	-60.6±0.7	-64.1±0.8
3	Trypsin	-24.5±1.0	-25.6±0.5	-23.1±0.8	-21.6±1.3	-22.7±1.1
3	Thrombin	-73.2±1.3	-57.7±1.4	-81.2±2.5	-85.4±2.2	-81.4±0.6

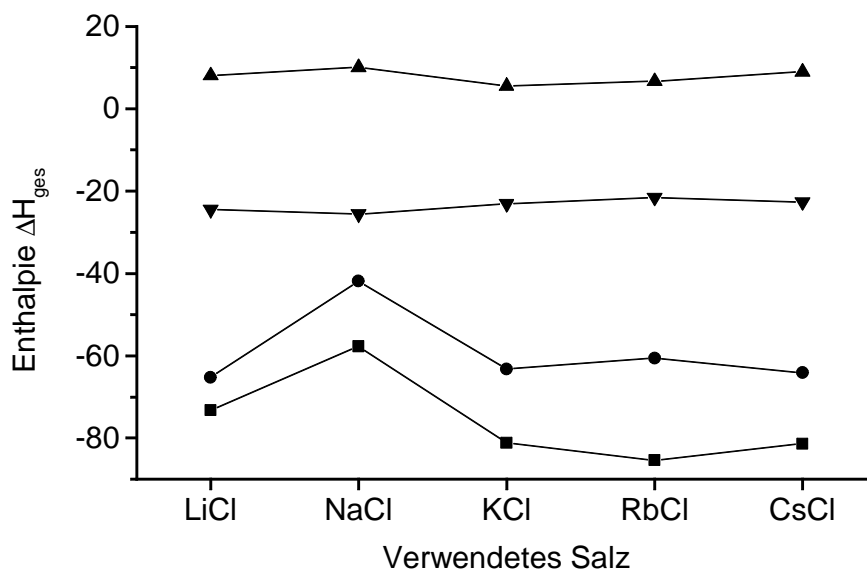
**Tabelle 3.19:** Wärmetönung  $\Delta H_{ges}$  in Abhängigkeit von dem verwendeten Salz bei einer Meßtemperatur von 25°C. Die Pufferlösung bestand aus 50 mM TRIS, 100 mM Salz und 0.1 Gew-% Polyethylenglykol 8000, eingestellt auf pH 7.8.

Innerhalb der Meßreihen gegenüber Trypsin zeigen die gemessenen Wärmetönung  $\Delta H_{ges}$  keine signifikanten Unterschiede für beide Inhibitoren. Zu bemerken ist noch, daß die Werte  $\Delta H_{ges}$  für **2** nicht um die überlagerten Ionisierungsenthalpien korrigiert wurden. Allerdings müßte bei allen fünf Meßwerten unter Annahme der Temperaturunabhängigkeit der Protonierungsenthalpie immer der gleiche Betrag korrigiert werden, so daß der relative Unterschied bestehen bleibt. Bei **3** findet kein Protonenaustausch zwischen Enzym-Ligand-System und Puffer statt.

Betrachtet man die beiden Meßreihen in Bezug auf Thrombin (Tabelle 3.19), so fällt auf, daß die beiden Werte für die Messungen in Gegenwart von Natriumchlorid signifikant von allen anderen Enthalpien abweichen. In beiden Fällen sind die in Gegenwart von Natriumionen gemessenen Enthalpien weniger stark negativ als die übrigen Meßwerte (Abbildung 3.12).

Bei den Messungen von **2** gegenüber Thrombin beträgt die Differenz zwischen dem in Gegenwart von Natriumionen gemessenen Wert und den anderen Meßwerten 18.7 bis zu

23.3 kJ/mol, während für **3** Differenzen von 23.5 bis 27.7 kJ/mol zu beobachten sind. Der in Gegenwart von Lithiumionen gemessene Wert für **3** weicht signifikant von den in Kalium-, Rubidium- und Cäsiumchlorid gemessenen Werten ab.



**Abbildung 3.12:** Abhängigkeit der gemessenen Enthalpien  $\Delta H_{ges}$  von dem verwendeten Salz bei 25°C. Die Pufferlösung bestand aus 50 mM TRIS, 100 mM Salz und 0.1 Gew-% Polyethylenglykol 8000, eingestellt auf pH 7.8. ? 2-Thrombin, / 3-Thrombin, ? 2-Trypsin, ? 3-Trypsin.

### 3.4.4 Wärmekapazitäten und Oberflächen

Die Titrationsexperimente, die bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt wurden, zeigen, daß die Bindungsenthalpien für die Bindung an Thrombin und Trypsin stark von der Meßtemperatur abhängen.

Die Bindungsreaktionen wurden in Pyrophosphatpuffer (50mM Pyrophosphat, 100 mM Natriumchlorid, 0.1Gew-% PEG 8000, eingestellt auf pH 7.8) im Temperaturbereich von 15 bis 35°C gegenüber Thrombin und im Bereich von 10 bis 30°C gegenüber Trypsin in Schritten von 5°C durchgeführt. Trypsin erwies sich bei höheren Meßtemperaturen als



zunehmend instabil, so daß das stöchiometrische Verhältnis von Protein zu Ligand kleiner als eins wurde. Es wird angenommen, daß für **2** ein Protonierungsschritt der Ligandenbindung überlagert ist, der keine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit aufweist. Zusätzlich wurden die Messungen in Pyrophosphatpuffer durchgeführt, da hier aufgrund der geringen Ionisierungsenthalpie dieses Puffers die überlagernden Effekte klein sein sollten.

Mit steigender Temperatur wird die gemessene Enthalpie stärker negativ. Dies bedeutet, daß aufgrund der Komplexbildung eine negative Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  für das System Enzym-Ligand beobachtet werden kann. Da die Enthalpie in dem oben genannten Temperaturbereichen in sehr guter Näherung linear von der Temperatur abhängt (sämtliche Regressionskoeffizienten  $r^2$  größer als 0.98), ist die Annahme einer konstanten Wärmekapazitätsänderung in dem beobachteten Meßbereich gerechtfertigt. Da weiterhin eine nahezu temperaturunabhängige Freie Enthalpie  $\Delta G$  beobachtet wird (Tabellen 3.3 und 3.18), ergibt sich als Konsequenz der starken Temperaturabhängigkeit der Enthalpie auch eine Temperaturabhängigkeit des entropischen Beitrages  $-T\Delta S$ . Mit anderen Worten: Wenn die Temperatur steigt, wird der Bindungsprozess exothermer und gleichzeitig entropisch immer ungünstiger.

**Trypsin.** In Tabelle 3.20 sind die gemessenen Wärmekapazitätsänderungen  $\Delta C_p$  zusammen mit den während der Komplexbildung vergrabenen Oberflächen für die Reaktionen von **1b-1dAc** sowie von **2** und **3** gegenüber Trypsin aufgeführt.

Bei den berechneten Oberflächen handelt es sich um die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen (Connolly-Oberfläche berechnet mit einem Probenradius von 1.5 Å, siehe auch Kapitel 6.10). 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.

Substanz	Vergrabene Oberfläche ( $\text{\AA}^2$ )			$\Delta C_p$ ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )
	gesamt	polar	apolar	
<b>1b</b>	393	195	198	-2.59±0.10
<b>1bMe</b>	436	220	216	-2.79±0.11
<b>1c</b>	431	200	231	-2.26±0.10
<b>1cMe</b>	448	200	248	-2.60±0.12
<b>1d</b>	401	195	206	-2.20±0.50
<b>1dAc</b>	430	198	232	-2.56±0.09
<b>2</b>	497	217	280	-0.91±0.19
<b>3</b>	477	204	273	-1.20±0.15

**Tabelle 3.20:** Wärmekapazitätsänderungen und vergrabene lösungsmittelzugängliche Oberflächen (Connolly Oberflächen) aufgrund der Komplexbindung mit Trypsin. Die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  (in  $\text{kJ/mol K}$ ) wurde in Pyrophosphatpuffer gemessen. Die berechneten Oberflächen sind die während der Komplexbildung vergrabenen lösungsmittelzugänglichen Oberflächen (Connolly-Oberflächen berechnet mit  $1.5 \text{ \AA}$  Probenradius) in  $\text{\AA}^2$ . Da für **1bMe** und **1c** keine Kristallstrukturen vorhanden sind, wurden als Basis die bekannten Strukturen von **1b** bzw. **1cMe** verwendet und strukturell verändert, so daß die Oberflächen berechnet werden konnten.

**Thrombin.** Wurden die ITC-Messungen für **1cMe**, **1dAc**, **2**, **2Et**, **3**, **4** und **5** zur Bestimmung der Wärmekapazitätsänderungen  $\Delta C_p$  in Puffern mit Natriumchlorid bzw. Rubidiumchlorid durchgeführt, so ergaben sich bemerkenswerte Unterschiede für die Wärmekapazitätsänderungen in Abhängigkeit vom eingesetzten Alkalimetallion bei den Messungen gegenüber Thrombin (Tabelle 3.21).

Für die Bindung an Thrombin wurden signifikant unterschiedliche Werte für die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  gemessen, falls Natriumchlorid durch Rubidiumchlorid ersetzt wurde. Die in Anwesenheit von Rubidiumchlorid gemessenen  $\Delta C_p$ -Werte sind betragsmäßig 1.2- bis 1.4-mal größer als die Wärmekapazitäten, die stattdessen in Anwesenheit von Natriumchlorid gemessen wurden. Die absoluten Unterschiede liegen im Bereich von  $0.42$  bis  $0.87 \text{ kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

Substanz	Vergrabene Oberfläche ( $\text{\AA}^2$ )			$\Delta C_p$ ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )	
	gesamt	polar	apolar	NaCl	RbCl
<b>1cMe</b>	537	192	345	-2.12±0.26	-2.54±0.18
<b>1dAc</b>	536	194	342	-2.24±0.20	-2.72±0.22
<b>2</b>	608	237	371	-2.31±0.37	-3.14±0.20
<b>2Et</b>	579	195	384	-2.07±0.16	-2.51±0.21
<b>3</b>	719	207	512	-2.77±0.40	-3.64±0.10
<b>4</b>	509	163	346	-2.22±0.10	-2.64±0.34
<b>5</b>	515	184	331	-2.28±0.20	-2.84±0.31

**Tabelle 3.21:** Wärmekapazitätsänderungen  $\Delta C_p$  und vergrabene lösungsmittelzugängliche Oberflächen (Connolly Oberflächen) aufgrund der Komplexbindung mit Thrombin. Die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  wurde in Pyrophosphatpuffer (mit 100mM Natrium- bzw. Rubidiumchlorid) gemessen. Die berechneten Oberflächen sind die während der Komplexbildung vergrabenen lösungsmittelzugänglichen Oberflächen (Connolly-Oberflächen mit 1.5  $\text{\AA}$  Probenradius) in  $\text{\AA}^2$ . Die Komplexgeometrien der Liganden wurden durch Überlagerung der Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102, Aspartat 189 und Serin 195 aus Trypsin auf Thrombin (PDB Code 1ETS) übertragen (Kapitel 6.7 und 6.10), um die Oberflächen berechnen zu können. Für **2** und **2Et** wurden die Koordinaten des Komplexes von **2** mit Thrombin direkt verwendet.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Veränderungen in der Protonierung

Gómez & Freire (1995) veröffentlichten eine kalorimetrische Studie zur Bindung des natürlich vorkommenden, stark bindenden Aspartylproteaseinhibitors Pepstatin A an Endothiapepsin, einer Aspartylprotease des Pilzes *Endothia parasitica*.

Sie beobachteten, daß die Bindungsaffinität von Pepstatin A gegenüber Endothiapepsin pH-abhängig ist. Die Bindungskonstante wird mit steigendem pH-Wert immer kleiner, weil der eigentlichen Bindungsreaktion zwischen Protein und Inhibitor die Protonierung einer der beiden Aspartylsäuren (Asp 32 und Asp 215) im aktiven Zentrum der Protease überlagert ist. Die Protonierungszustände der aktiven Aspartate in Aspartylproteasen haben einen direkten Einfluß auf die katalytische Aktivität dieser Proteinfamilie. Ein Proton ( $1.1 \pm 0.1$ ) wird während der Reaktion vom Protein aufgenommen. Zahlreiche Veröffentlichungen weisen auf solche Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen hin, die der eigentlichen Assoziationsreaktion überlagert sind (Baker & Murphy, 1996; Doyle, 1997; Tame, 1999). Allerdings gibt es keine Publikationen, die einen solchen Fall detailliert beschreiben.

**Thrombinbindung.** Napsagatran **2** besitzt drei ionisierbare funktionelle Gruppen (Tabelle 3.5): eine stark basische Guanidiumgruppe ( $pK_a = 12.25$ ), ein Sulfonamid ( $pK_a = 10.12$ ) und eine Carbonsäurefunktion ( $pK_a = 3.40$ ). Wie in Kapitel 3.4.2 erwähnt wird bei der Bindung sowohl an Thrombin als auch an Trypsin ein Proton vom Puffer auf den Protein-Inhibitor-Komplex transferiert. Man kann annehmen, daß dieses Proton von der negativ geladenen Carboxylatgruppe des Liganden **2** aufgenommen wird. Die Messungen wurden bei pH 7.8 durchgeführt, so daß die Carbonsäuregruppierung die einzige funktionelle Gruppe des Liganden ist, die vor der Bindung im wäßrigen Medium bei diesem pH-Wert deprotoniert vorliegt und deshalb ein Proton aufnehmen kann. Die anderen beiden funktionellen Gruppen (Sulfonamid und Guanidiniumgruppierung) sind bei einem pH-Wert von 7.8 vollständig protoniert und somit nicht mehr in der Lage, ein weiteres Proton aufzunehmen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, daß die gemessene

Wärmetönung  $\Delta H_{\text{ges}}$  für die Reaktion des Esters **2Et**, bei dem die freie Carbonsäure von **2** durch Veresterung mit Ethanol geschützt ist, keine Abhängigkeit vom eingesetzten Puffer zeigt. Damit werden bei der Reaktion von **2Et** mit Thrombin keine Protonen während der Bindung aufgenommen bzw. abgegeben.

Es ist anzunehmen, daß eine signifikante  $pK_a$ -Verschiebung für die Carbonsäuregruppierung des Inhibitors **2** von 3.40 auf einen Wert höher als 7.8 durch die Komplexbildung induziert wird. Wird die Kristallstruktur von **2** in die Betrachtungen eingeschlossen, so fällt auf, daß die Carboxylatfunktion von **2** eine neue Wasserstoffbrücke zur nucleophil aktivierten Hydroxylfunktion des katalytisch aktiven Serins 195 ausbildet und tief in der wenig hydrophilen  $S_2$ -Bindetasche vergraben ist.

Im vorliegenden Fall bedarf die Bindung des Liganden an das Enzym der Protonierung des Liganden während der Komplexbildung. Das heißt, daß die Komplexbildung von einer durch das Protein induzierten Einstellung der  $pK_a$ -Werte und der Protonierungszustände abhängt.

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 (Gómez & Freire, 1995).

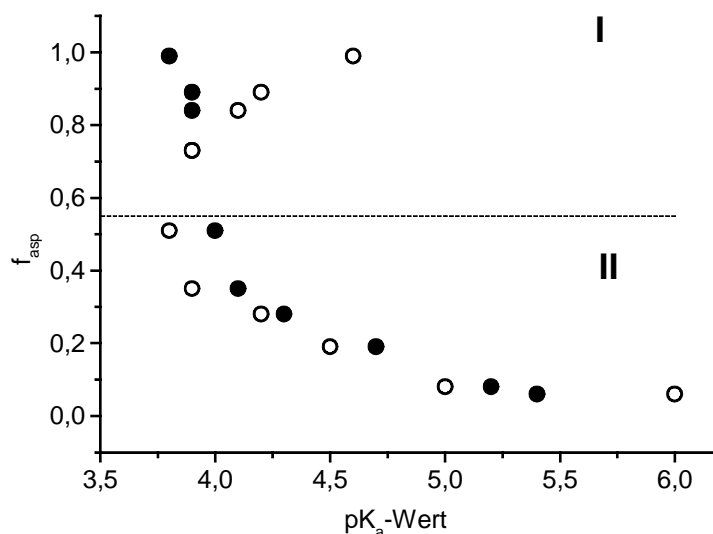
Einige bemerkenswerte  $pK_a$ -Verschiebungen, die auf Umgebungseffekte zurückzuführen sind, werden in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel besitzt das tief im Protein vergrabene Aspartat 26 von *Escherichia coli* Thioredoxin einen  $pK_a$ -Wert von 7.5. Das sind 3.5 Einheiten mehr, als für die freie Carboxylatseitenkette eines Aspartats in wäßriger Lösung gemessen wird. Dieser hohe  $pK_a$ -Wert ist essentiell für die Stabilität des Enzyms, weil die Deprotonierung von Aspartat 26 das Protein signifikant destabilisieren würde (Langsetmo *et al.*, 1991a; Langsetmo *et al.*, 1991b). Im Hühnereiweiß-Lysozym wird ein  $pK_a$ -Wert von 6.1 für die Carboxylatseitenkette von Glutamat 35 gefunden. Die Hydrophobizität des benachbarten Tryptophans 108 soll für diesen überraschend hohen  $pK_a$ -Wert des Glutamats verantwortlich sein (Inoue *et al.*, 1992). In Phosphofruktokinase hängt der  $pK_a$ -Wert (6.6 bzw. >9.6) von zwei unterschiedlichen funktionellen Zuständen ab (Urry *et al.*, 1992).

Ein weiterer ungewöhnlicher  $pK_a$ -Wert von 9 wird für das Glutamat 212 im bakteriellen Photosynthesezentrum beschrieben (Urry *et al.*, 1993).

Normalerweise werden diese enormen  $pK_a$ -Verschiebungen durch die lokalen elektrostatischen Eigenschaften im Inneren eines Enzyms induziert (Schaefer *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1998). Urry *et al.* (1992; 1993) veröffentlichten jedoch eine experimentelle Studie zu  $pK_a$ -Verschiebungen, die den Schluß nahelegt, daß auch hydrophobe Wechselwirkungen bei der Interpretation von ausschlaggebender Bedeutung sein können. Es werden sowohl elektrostatisch als auch hydrophob induzierte Verschiebungen der  $pK_a$ -Werte beschrieben. Die Betrachtungen basieren auf einer Reihe von Aspartat-haltigen Polypentapeptiden, die vergleichend diskutiert werden.

In Abbildung 4.1 ist der Molenbruch  $f_{asp}$  des Aspartat-haltigen Pentamers {Ile-Pro-Gly-Asp-Gly} in den Polymeren  $\text{poly}\{f_{val}(\text{Ile-Pro-Gly-Val-Gly}), f_{asp}(\text{Ile-Pro-Gly-Asp-Gly})\}$  gegen den gemessenen  $pK_a$ -Wert aufgetragen ( $f_{val} + f_{asp} = 1$ ). Der Molenbruch beschreibt die „Dichte“ der Aspartate im Polypeptid. Den kleinsten  $pK_a$ -Wert erhält man für  $f_{asp}=0.5$  in Wasser und für  $f_{asp}=1.0$  in einer 0.15-M-Kochsalzlösung. Der  $pK_a$ -Wert beträgt hier ca. 3.8, was dem üblichen Wert für eine Aspartatseitenkette entspricht.

Für Wasser als Solvens zeigt die Auftragung einen parabolischen Verlauf mit einem Minimum bei  $f_{asp}=0.5$ . Im Bereich **I** wird die  $pK_a$ -Verschiebung mit abnehmender „Dichte“ der Aspartate bis  $f_{asp}=0.5$  (ein Aspartatrest auf zehn Aminosäuren) immer kleiner. Durch Zugabe von Kochsalz, das polare Wechselwirkung zwischen den Aspartaten abschirmt, kann diese Verschiebung zudem verhindert werden, so daß dieser Bereich durch elektrostatische Wechselwirkungen beschrieben werden kann. Für  $f_{asp} > 0.5$  (Bereich **II**) vergrößert sich die  $pK_a$ -Verschiebung wieder. Das heißt, daß durch zunehmenden Ersatz polarer Aspartate durch die hydrophobe Aminosäure Valin die Verschiebung vom Anstieg der Hydrophobizität abhängt. Durch Zugabe von 0.15-M-Kochsalzlösung, die, wie im Bereich **I** gesehen, polare Wechselwirkungen nivellieren kann, wird dieser Effekt nicht kompensiert.



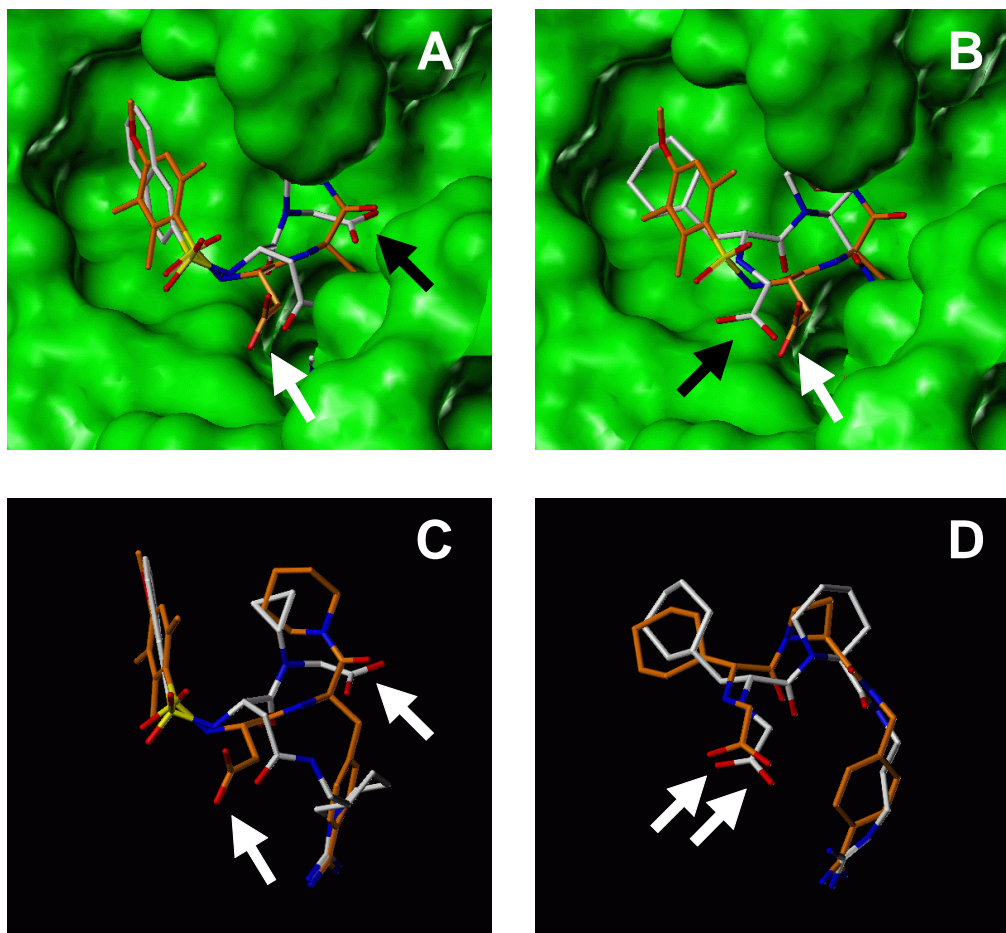
**Abbildung 4.1:** Gemessene  $pK_a$ -Werte in Abhängigkeit vom Molenbruch  $f_{asp}$  in Wasser (?) und 0.15-M-Kochsalz (?). **I** = durch elektrostatische, **II** = durch hydrophobe Wechselwirkungen dominierter Bereich. Nach Urry *et al.*, 1993.

Betrachtet man Polymethacrylsäure als Beispiel einer Struktur mit weiter gesteigerter negativer Ladungsdichte, da jedes zweite Rückgratatom eine Carboxylatgruppe trägt, so findet man in Wasser einen  $pK_a$ -Wert von 7.3 (Urry *et al.*, 1993).

Um die relative Stärke von elektrostatisch und hydrophob induzierten  $pK_a$ -Verschiebungen beurteilen zu können, wurden von Urry *et al.* (1993) Polytricosapeptide mit  $\beta$ -Spiralstruktur synthetisiert, die einen Aspartatrest und fünf hydrophobe Phenylalanine je Tricosamer enthalten. Je näher die Phenylalanine zum Aspartat im Raum unter Beibehaltung der Molekülstruktur stehen, desto höher ist die  $pK_a$ -Verschiebung. In diesem Fall wurden Werte bis zu  $pK_a = 10.0$  beobachtet, die nochmals 2.7 Einheiten höher als der Wert für die Polymethacrylsäure liegen.

Die Möglichkeit, eine  $pK_a$ -Verschiebung in Wasser zu induzieren, resultiert scheinbar aus einer Konkurrenz hydrophober und polarer Gruppen um die Hydratation, wobei die Gruppen keine gemeinsame Wasserhülle haben können. Das heißt, die Verschiebung des  $pK_a$ -Wertes kann nicht alleine auf elektrostatische Effekte zurückgeführt werden. Mitunter können hydrophobe Umgebungen größere Effekte auf eine lokal induzierte Verschiebung eines  $pK_a$ -Wertes haben (Urry *et al.*, 1993).

Die gemessenen Enthalpien für die Assoziationsreaktionen von Thrombin mit **3**, **4** und **5**, die Carboxylgruppen vergleichbarer Acidität besitzen, zeigen im Gegensatz zu **2** keine Abhängigkeit vom Puffer. Es werden somit keine Protonen zwischen Puffer und Komplex transferiert.



**Abbildung 4.2:** Überlagerungen von **2**, **3**, **4** und **5** bezüglich der Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102, Aspartat 189 und Serin 195 (Kapitel 6.7). Die Orientierung des Enzyms ist für alle Abbildungen identisch.

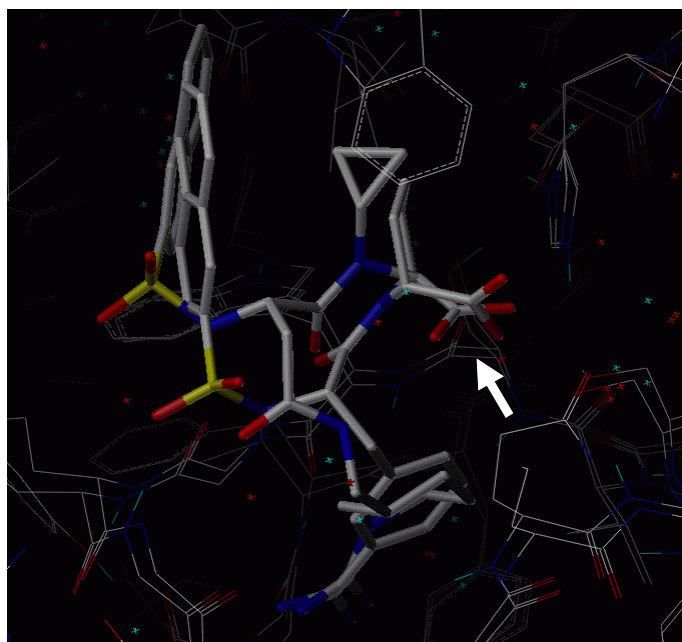
**A:** Überlagerung von **2** (weiß) und **3** (orange) in der Thrombinbindetasche. Während die Säuregruppe von **2** (schwarzer Pfeil) in Richtung der katalytischen Triade steht, orientiert sich die Carboxylatfunktion von **3** (weißer Pfeil) zum umgebenden Wasser. **B:** Überlagerung von **3** (orange, weißer Pfeil) und **4** (weiß, schwarzer Pfeil). Die jeweiligen Carboxylatgruppen orientieren sich zum umgebenden Wasser hin. **C:** Überlagerung von **2** (weiß) und **3** (orange). **D:** Überlagerung von **4** (weiß) und **5** (orange). Die beiden Pfeile deuten auf die beiden Säurefunktionen, die in Richtung des umgebenden Wassers zeigen.



Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, daß Inhibitoren mit ähnlichen funktionellen Gruppen ein stark unterschiedliches Verhalten bei der Komplexbildung zeigen. Allerdings wird diese Tatsache erklärbar, wenn man die Bindungsmodi gegenüber Thrombin und Trypsin betrachtet. In allen Fällen außer bei der Bindung von **2** an Thrombin orientieren sich die oben genannten Carboxylgruppen von der Proteinoberfläche weg und stehen deshalb in das umgebende Lösungsmittel hinein. Diese vollständige Hydratisierung bewirkt keine oder offensichtlich nur eine geringe  $pK_a$ -Verschiebung für diese Carboxylatgruppen. Die Gruppe von **2** wird dagegen vollständig vergraben und bindet benachbart zu den Aminosäuren Serin 195 und Histidin 57. Dort herrschen völlig veränderte dielektrische Eigenschaften. Die komplett unterschiedlichen Orientierungen der Säuregruppen von **2**, **3**, **4** und **5** sind in den Abbildungen 4.2 zu sehen.

**Trypsinbindung.** Ähnlich wie **2** nimmt **1b** mit einer freien Carboxylatgruppe in 2-Position des C-terminalen Piperidinrings während der Komplexbildung mit Trypsin ein Proton auf (Tabelle 3.14), während der Methylester **1bMe** auch nach der Assoziation in seinem Protonierungszustand verbleibt. Wie ein Vergleich der Komplexstrukturen zeigt, besetzen die Carboxylatfunktionen von **1b** und **2** sehr ähnliche Positionen in der Bindetasche des Enzyms (Abbildung 4.3).

Interessanterweise geht **1c** einen ähnlichen Bindungsmodus wie **1b** mit Trypsin ein (Abbildung 3.5), ohne daß in diesem Inhibitor die Carboxylatgruppe bei der Enzymbindung ein Proton aufnimmt. Der einzige Unterschied zwischen beiden liegt in der Position der C-terminalen Säuregruppe, die in **1c** die 4-Position des Piperidinrings einnimmt und deshalb keine Wasserstoffbrücken mit Serin 195 eingehen kann. Sowohl die Carboxylatgruppierung von **1c** als auch die Estergruppe von Inhibitor **1cMe**, der sich bezüglich der Proteinbindung wie **1c** verhält, zeigen nur schwache van-der-Waals-Kontakte zu der Trypsinoberfläche.

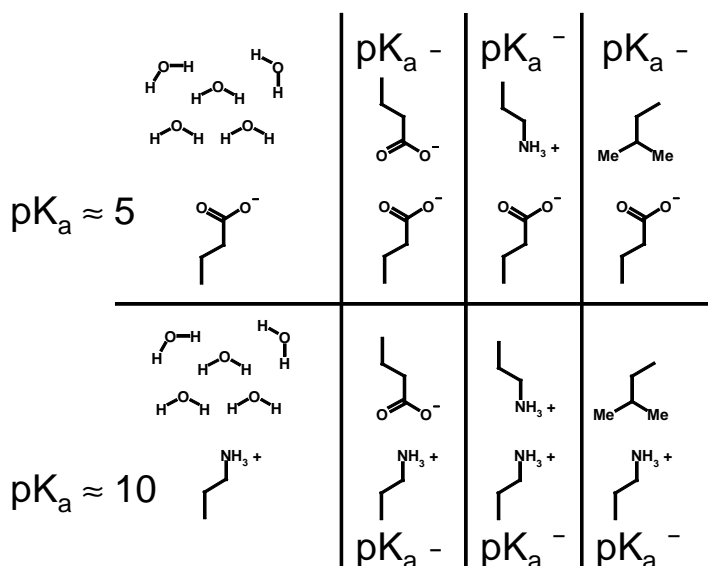


**Abbildung 4.3:** Überlagerung von **1b** und **2** bezüglich der Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102, Aspartat 189 und Serin 195 (Kapitel 6.7). Der weiße Pfeil deutet auf die beiden Säuregruppen der beiden Inhibitoren.

Demgegenüber werden bei der Bindung von **1d** an Trypsin Protonen abgegeben, während bei der Assoziation von **1dAc** mit Trypsin kein Protonentransfer beobachtet werden kann. Da in **1dAc** die freie ionisierbare Aminofunktion von **1d** durch eine Acetylgruppierung geschützt ist, muß die freie Aminogruppe am Piperazinring von **1d** diese Protonen abgeben. Die Aminogruppe steht nur in schwachem Kontakt mit der Trypsinoberfläche. Allerdings scheint die Beeinflussung der Aminogruppe durch Gruppen des Proteins auszureichen, den  $pK_a$ -Wert der Aminofunktion, der mit  $pK_a=7.49$  nahe am pH-Wert der verwendeten Pufferlösung liegt ( $pH=7.8$ ), so in Richtung niedrigerer Werte zu verschieben, daß die vorher partiell positiv geladene Aminogruppe ihr Proton vollständig abgibt. Bezogen auf molare Verhältnisse wurde die Abgabe von  $0.53\pm 0.04$  Protonen gemessen (Tabelle 3.14). Berücksichtigt man, daß die freie Aminofunktion von **1d** bei  $pH 7.8$  nur partiell protoniert ist, so entspricht die Abgabe von nur 0.53 mol Protonen pro mol Substanz dem Wert, den man aufgrund der Henderson-Hasselbalch-Beziehung erwarten würde.

Die Resultate, die in diesem Kapitel diskutiert wurden, demonstrieren, daß selbst innerhalb einer Serie homologer Verbindungen durchaus überraschende Ergebnisse und auf den ersten Blick nicht vorhersagbare Änderungen im Protonierungszustand auftreten. Das unterstreicht die Notwendigkeit, ITC-Messungen unter deutlich verschiedenen Pufferbedingungen aufzunehmen, da ansonsten Fehlinterpretationen die Folge wären.

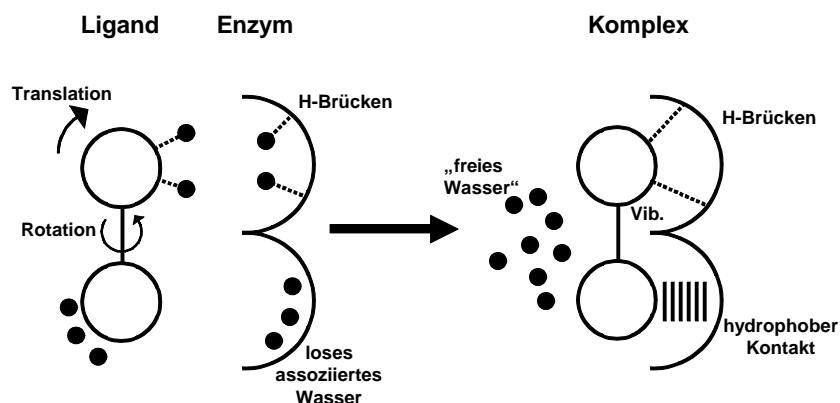
Abbildung 4.4 faßt die einzelnen Effekte, die eine Rolle bei der Verschiebung von  $pK_a$ -Werten spielen können, nochmals qualitativ zusammen. Als Beispiel sind eine Carboxylatfunktion ( $pK_a \approx 5$ ) und eine Aminofunktion ( $pK_a \approx 10$ ) in wäßriger Umgebung dargestellt. Identisch geladene Gegengruppen erhöhen den  $pK_a$ -Wert von sauren (d.h. unter Protonenabgabe zu negativ geladenen Gruppen) und erniedrigen den  $pK_a$ -Wert von basischen Gruppen wie Aminofunktionen, die nach der Protonenaufnahme positiv geladen sind. Gegensätzlich geladene Gruppierungen bewirken jeweils gegenteilige Effekte. Die Beispiele von Urry *et al.* (1993) zeigen, daß hydrophobe Umgebungen den  $pK_a$ -Wert von Carbonsäuren zu höheren Werten verschieben, während die Basizität (bzw. der  $pK_a$ -Wert) von Aminogruppen oder ähnlichen Stickstoffbasen entsprechend herabgesetzt wird.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung der Effekte, die Nachbargruppen auf die Verschiebung von  $pK_a$  Werten der Carbonsäure und Aminogruppierung ausüben können. Bei den dargestellten  $pK_a$ -Werten für Carbonsäure (oben) und Aminogruppierung (unten) handelt es sich um approximative Werte.

## 4.2 Enthalpische und entropische Beiträge

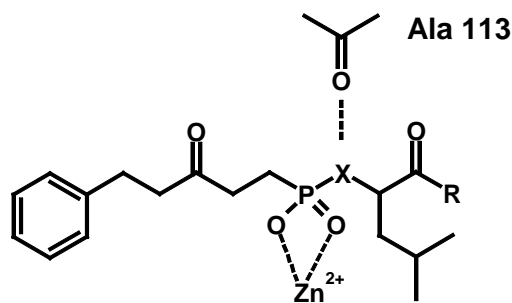
**Wasserstoffbrücken.** Schon vor der eigentlichen Bindungsreaktion sind die polaren Gruppen des Proteins und des Liganden durch Wasserstoffbrücken mit den Wassermolekülen in ihrer Umgebung abgesättigt. Durch Bindung des Liganden an das Protein gehen diese Wechselwirkungen zwar verloren, aber es werden auch neue intermolekulare polare Kontakte gebildet. Bei der Beschreibung der Energetik einer Bindungsreaktion sind daher immer zwei Zustände in Betracht zu ziehen und relativ miteinander zu vergleichen: sowohl der Zustand vor der Bindung als auch der Zustand nach der Bindung.



**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Vor der Bindung ist der Ligand frei beweglich und flexibel. Ligand und Enzym sind solvatisiert, wobei einige Wassermoleküle über Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) verknüpft, andere lose assoziiert sind. Bei der Bindung (rechts) gehen Rotations- und Translationsfreiheitsgrade verloren. Die Erniedrigung der Entropie ist dabei ungünstig für die Bindung. Die Bindung des Liganden führt zu neuen Wasserstoffbrücken und hydrophoben Kontakten. Wasser wird dabei freigesetzt. Zusätzlich entstehen niederfrequente Schwingungsmoden, die auf die neu gebildeten nichtkovalenten Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Nach Andrews et al., 1984.

Das größte Problem, genaue Werte für die Bindungsenergien von biophysikalischen Assoziationsreaktionen vorherzusagen, liegt darin, daß diese Bindungsenergien aus Energiedifferenzen zwischen Molekülen in Lösung, die mit freien Wassermolekülen wechselwirken,

und gebundenen Molekülen, die im Komplex miteinander wechselwirken, entstehen. Das heißt, daß eine aufgrund der Komplexbildung neu ausgebildete Wasserstoffbrücke nur dann konstruktiv zur Bindung beiträgt, wenn die Desolvatisierungsenthalpie der polaren Gruppe durch die Enthalpie der neu gebildeten intermolekularen Wasserstoffbrücken überkompensiert wird. Demgegenüber 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 Desolvatisierungsenergie kompensieren kann. Ein instruktives Beispiel, das die Bedeutung von Desolvatisierungseffekten anschaulich beschreibt, ist die Bindung von Thermolysininhibitoren, die eine Phosphonamid-, Phosphonat- oder eine Phosphinatgruppe enthalten, an die Metalloprotease Thermolysin (Morgan *et al.*, 1991).



K <sub>i</sub> -Werte (in μM)			
R	X=		
	-NH-	- O -	- CH <sub>2</sub> -
OH	0.76	660	1.4
Gly-OH	0.27	220	0.3

**Abbildung 4.6:** Wechselwirkungen zwischen den Inhibitoren und Thermolysin (links) und die Bindungskonstanten  $K_i$  (in μM, rechts). Die  $PO_2$ -Gruppe bindet an das Zinkion der Metalloprotease, und die Gruppe X bildet eine Wechselwirkung zur Carbonylgruppe von Alanin 113 aus.

Daß der Beitrag einer Wasserstoffbrücke entscheidend von der mikroskopischen Umgebung im Protein-Ligand-Komplex abhängt, veranschaulicht Abbildung 4.6 eindrucksvoll. Während die Phosphonamide (X = -NH-) gute Thermolysininhibitoren sind, weil die Aminogruppe als Wasserstoffbrückendonator mit dem Carbonylsauerstoffatom im Enzym eine neue Wasserstoffbrücke ausbildet, kann diese Wasserstoffbrücke bei den Phosphonaten (X = -O-) nicht eingegangen werden. Zudem ergibt sich eine energetisch ungünstige Abstoßung der

beiden benachbarten elektronegativen Sauerstoffatome. Der Austausch der NH-Gruppe durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe beeinflusst die Bindungsaffinität gegenüber Thermolysin kaum.

Die beiden polaren Gruppen (X = -NH- bzw. -O-) sind in Wasser hydratisiert. Bei der Bindung an Thermolysin müssen sie ihre Wasserhülle abstreifen, was energetisch ungünstig ist. Bei den Phosphonamiden wird der Enthalpieverlust durch die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrücke kompensiert, während die Phosphonate keine neuen Wasserstoffbrücken ausbilden können. Demgegenüber knüpfen die CH<sub>2</sub>-Gruppen der Phosphinate weder in Wasser noch im Protein Wasserstoffbrücken. Für die Phosphonamide (X = -NH-) und die Phosphinate (X = -CH<sub>2</sub>-) sind damit die Wasserstoffbrückenbilanzen ausgeglichen, für die Phosphonate tritt ein Defizit auf (Böhm & Klebe, 1996).

**Entropie.** Aufgrund der Assoziation zweier Moleküle kann erwartet werden, daß ein System Änderungen bezüglich der translatorischen, rotatorischen und internen Entropien durchläuft. Zum Beispiel kann während der Bindung ein definierter Teil des Proteins seine Konformation verändern und deshalb fester gefaltet werden, was zum Übergang zu höher frequenten Bindungsmodi führt, die durch ihre geringere energetische Anregung weniger zum Entropieinhalt des Systems beitragen. Die Reduzierung der Unordnung interner Freiheitsgrade ist ein entropisch ungünstiger Beitrag zur Freien Bindungsenthalpie  $\Delta G$ , d.h. die Entropie nimmt ab und ist deshalb negativ.

Andererseits kann eine Region des Biomoleküls nach der eigentlichen Bindungsreaktion auch flexibler sein. Das wiederum führt zu einem positiven  $\Delta S$ -Wert und begünstigt deshalb entropisch die Bindungsreaktion.

**Wasser.** Wassermoleküle organisieren sich in einer geordneten Struktur an der hydrophoben Oberfläche von Biomolekülen. Es wird angenommen, daß diese geordneten Wassermoleküle untereinander stärkere Wasserstoffbrücken ausbilden, als sie in hochgradig ungeordneten Wasserstrukturen gefunden werden. Das heißt, daß bei der Assoziation zweier Moleküle dieses Freisetzen von Wassermolekülen zur Freien Enthalpie des gesamten Prozesses beiträgt, weil das Wasserstoffbrückennetzwerk neu geordnet wird. Da die Freisetzung von Wasser-

molekülen in diesem Falle zwingend für die Reaktion ist, muß beachtet werden, daß ein Teil der gemessenen Enthalpie von der Freisetzung des Wassers herrührt.

Da zwangsläufig Oberflächenanteile bei einer Bindung vergraben werden, wird sich die Verteilung von an der Oberfläche gebundenen Wassermolekülen und freien Wassermolekülen verändern. 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.

**Komplexbildung mit Trypsin.** Ungünstige Solvatisierungseigenschaften der freien Säure **1c** im Vergleich mit denen des zugehörigen Esters **1cMe** sind verantwortlich für die geringer negative Enthalpie  $\Delta H$  der freien Säure **1c** (-26.8 kJ/mol für **1c** vs. -39.6 kJ/mol für **1cMe**, Tabelle 3.16). Die Desolvatisierung von **1c** sollte dabei einen größeren Beitrag erfordern als die Desolvatisierung von **1cMe**, zumal die Carboxylgruppe von **1c** und die Esterfunktion von **1cMe** nach der Bindung an das Enzym keinen Kontakt zu einer korrespondierenden polaren Gruppe des Proteins haben (siehe auch Kristallstruktur **1cMe**-Trypsin, Kapitel 3.3.1). Da die räumliche Nähe dieser terminalen Gruppen zur Proteinoberfläche eine Wasserhülle von energetisch günstig orientierten Wassermoleküle zerstört, können die verlorenen Wechselwirkungen mit dem Wasser im freien Liganden bzw. freiem Protein nicht kompensiert werden. Wahrscheinlich ist die Tatsache, daß **1c** vorteilhafte Wechselwirkungen zu zwei polaren Carboxylatsauerstoffatomen verliert, während **1cMe** nur das Carbonylsauerstoffatom als potentiellen Wasserstoffbrückenakzeptor besitzt, dafür verantwortlich, daß die exotherme Bindungsenthalpie von **1c** stärker reduziert wird als die von **1cMe**.

Ein anderes Bild ergibt sich für das Säure-Ester-Paar **1b/1bMe**. Während die gemessenen Enthalpien von **1b** abhängig von der verwendeten Puffersubstanz sind, zeigt sich, daß die Enthalpiewerte von **1bMe** unabhängig vom verwendeten Puffer sind. Das heißt, daß **1b** ein Proton aufnimmt (genauer  $0.90 \pm 0.06$  Protonen nach Kapitel 3.4.2.2) und bei der Bindung von **1bMe** kein Protonentransfer zwischen dem neu gebildetem Komplex und dem Puffer

stattfindet. Da sich beide Komplexe nur in der freien Säuregruppierung von **1b** und der Estergruppierung von **1bMe** unterscheiden, muß die Carboxylgruppe von **1b** für die Protonenaufnahme verantwortlich sein. Ein Sauerstoffatom der freien Carboxylfunktion, die jetzt aufgrund der Komplexbildung mit Trypsin elektrisch neutral ist, bildet mit der Hydroxylgruppe von Serin 195 eine Wasserstoffbrücke aus und formt über ein Wassermolekül drei weitere polare Kontakte zu funktionellen Gruppen des Enzyms. Der entsprechende Ester **1bMe** kann die äquivalente Wasserstoffbrücke nicht ausbilden. Der Energiegewinn durch die zusätzliche Wasserstoffbrücke spiegelt sich in den stark unterschiedlichen Enthalpiewerten  $\Delta H_{\text{bind}}$  ( $-45.6$  kJ/mol für **1b** vs.  $-16.9$  kJ/mol für **1bMe**, Tabelle 3.16) wieder. Allerdings wird der Unterschied in den Enthalpiewerten durch einen gleich großen Unterschied der entropischen Anteile  $-T\Delta S$  wieder kompensiert, da die Bindungskonstanten  $K$  für beide Inhibitoren nahezu gleich sind. Das heißt, daß bei einer Meßtemperatur von  $25^\circ\text{C}$  die Bindung des Esters **1bMe** entropisch günstiger ist als die der freien Säure **1b**. Bei der Bindung von **1b** an Trypsin verliert das System Entropie. Der Beitrag des Entropieterms  $-T\Delta S$  wird positiv (Tabelle 3.16).

Bei den Assoziationsreaktionen von **1b** und **1c** an Trypsin werden nahezu gleiche Werte für die Freien Bindungsenthalpien  $\Delta G$  gemessen ( $-36.4$  kJ/mol für **1b** und  $-35.5$  kJ/mol für **1c**, Tabelle 3.16). Allerdings setzt sich  $\Delta G$  für beide Substanzen aus völlig verschiedenen Enthalpie- und Entropiebeiträgen zusammen. Vergleicht man nach Korrektur der Beiträge um die Ionisierungsenthalpien von Puffersubstanz und Ligandengruppe die intrinsischen Enthalpien  $\Delta H_{\text{bind}}$  für **1b** ( $-45.6$  kJ/mol) und **1c** ( $-26.8$  kJ/mol), so kann die Differenz dieser beiden Enthalpien auf die zusätzliche Wasserstoffbrücke, die **1b** mit der Hydroxylgruppe von Serin 195 ausbildet, zurückgeführt werden. Da die C-terminale freie Carboxylatgruppe von **1c** im Gegensatz zur Gruppe in **1b** keine Wasserstoffbrücke mit dem Protein ausbildet, kann dieser Wasserstoffbrücke eine Enthalpie von ca.  $-18$  kJ/mol zugeschrieben werden (es darf angenommen werden, daß die Solvatationsbeiträge von **1b** und **1c** sehr ähnlich sind). Allerdings wird die günstige Enthalpiebilanz durch den ungünstigen Entropiebeitrag für die Bindung von **1b** an Trypsin kompensiert ( $-T\Delta S = 9.2$  kJ/mol für **1b** vs.  $-8.7$  kJ/mol für **1c**).



Betrachtet man das Paar **1d/1dAc**, so fällt auf, daß sich die Verbindung mit der freien Aminofunktion am Piperazinring (**1d**) bei der Assoziationsreaktion an Trypsin thermodynamisch ähnlich der Verbindung verhält, in der diese Aminofunktion durch eine zusätzliche Acetylgruppe geschützt ist (**1dAc**). Allerdings kann diese Aussage erst nach der Korrektur der Enthalpiewerte von **1d** um die Ionisierungsenthalpien getroffen werden. Würde man die gemessenen Werte  $\Delta H_{\text{ges}}$  aus der Tabelle 3.9 ohne die oben genannte Korrektur vergleichen, käme man zu falschen Schlußfolgerungen.

Sowohl die Enthalpie  $\Delta H$  als auch die Werte für  $\Delta G$  und  $-T\Delta S$  sind bei den beiden Verbindungen nicht signifikant unterschiedlich. Beide Inhibitoren **1d** und **1dAc** gehen mit ihrem C-terminalen Piperazinring keine direkten polaren Wechselwirkungen mit den funktionellen Gruppen im Protein ein, da die C-Termini circa 4.5 Å von der Proteinoberfläche entfernt liegen. Durch die räumliche Nähe zur Trypsinoberfläche müssen die beiden Inhibitoren einen Teil ihrer intakten Wasserhülle abstreifen. Offensichtlich unterscheiden sich aber die partiellen Desolvatisierungen der beiden Substanzen nicht so stark voneinander wie dies beim Paar **1c/1cMe** der Fall ist. Die Umstrukturierung der Wasserhülle um die freie Aminogruppe von **1d** entspricht von der Energiebilanz her scheinbar der Reorganisation der Hydrathülle von **1dAc** bei der Bindung an Trypsin. Zwar besitzt die C-terminale Aminofunktion von **1dAc** im Gegensatz zur partiell positiv geladenen freien Aminofunktion von **1d** kaum noch Wasserstoffbrückeneigenschaften und kann über diese Gruppe keine starke Wasserstoffbrücke im freien Zustand ausbilden, aber die zusätzliche Acetylfunktion in **1dAc** kann selbstverständlich dafür weitere polare Wechselwirkungen über ihre Carbonylgruppe eingehen. Die fehlenden Wasserstoffbrückeneigenschaften des Stickstoffatoms werden offensichtlich durch das zusätzlich eingebrachte Carbonylsauerstoffatom von **1dAc** kompensiert.

**Komplexbildung mit Thrombin.** Die Bindung der protonierten Säure **2**, die eine neue Wasserstoffbrücke bei der Bindung an das Protein eingeht, ist stärker exotherm als die Bindung des entsprechenden Ethylesters **2Et**. Sowohl für **1b/1bMe** gegenüber Trypsin als auch für **2/2Et** gegenüber Thrombin unterscheiden sich die entropischen Anteile der freien Säuren gegenüber denen der veresterten Verbindungen. Bei einer Meßtemperatur von 25°C sind die Bindungen der beiden Säuren an Thrombin bzw. Trypsin entropisch ungünstig

( $-T\Delta S = 9.2$  kJ/mol für **1b**-Trypsin und  $22.2$  kJ/mol für **2**-Thrombin), wohingegen jeweils die Bindungen der Ester entropisch begünstigt sind ( $-20.6$  kJ/mol für **1bMe**-Trypsin und  $-15.9$  kJ/mol für **2Et**-Thrombin, Tabellen 3.16 und 3.17). Möglicherweise kann diese Beobachtung mit der effizienteren Immobilisierung der freien Säuren **1b** und **2** durch die zusätzlich ausgebildeten Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Ligand erklärt werden.

Ein Blick auf die Kristallstrukturen unterstützt diese Argumentation. So kann die Konformation des Piperazinrings in **1b** aufgrund dieser Immobilisierung der Elektronendichte besser zugeordnet werden, während die Elektronendichten der aliphatischen Ringe von **1cMe**, **1d** und **1dAc** so wenig Feinstrukturierung zeigen, daß eine angenommene Sesselkonformation nicht gesichert eingepaßt werden kann. Auch die kleineren B-Faktoren der Atome des C-terminalen Piperazinrings in **1b** unterstützen diese Argumentation.

Ein weiteres interessantes Substanzpaar stellen **4** und **5** dar. Die Analyse ihrer Kristallstrukturen (Kapitel 3.3) im Komplex mit Trypsin offenbart ein kompliziertes Netzwerk von Wassermolekülen, die Wasserstoffbrücken zwischen Ligandatomen einerseits und zwischen Ligand- und Proteinatomen andererseits überbrücken. Vermutlich induzieren diese Wassermoleküle eine gewisse Präorientierung des Liganden für die eigentliche Bindung des Liganden in der Proteinbindetasche. Verglichen mit **5** ist die Bindung von **4** an Thrombin entropisch ungünstiger ( $-T\Delta S = 10.0$  kJ/mol für **4** und  $-10.9$  kJ/mol für **5**, Tabelle 3.17). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung mag die sterische Restriktion der flexiblen aliphatischen Kohlenwasserstoffkette von **4** sein, die entropisch ungünstiger ausfallen sollte als die Fixierung des vororientierten weniger flexiblen aromatischen Benzamidinrestes in **5**.

### 4.3 Natriumabhängigkeit der Thrombinbindung

Die Wechselwirkungen von Thrombin mit seinen stark bindenden Inhibitoren wird allosterisch durch die Anwesenheit von monovalenten Kationen wie Alkalimetallionen beeinflusst.

Die Anwesenheit von Natriumionen beeinflusst wesentlich die thermodynamischen Eigenschaften von Thrombin. Es wird in der Literatur beschrieben, daß Thrombin durch Natriumionen allosterisch zwischen zwei verschiedenen Formen reguliert wird: der prokoagulanten (*engl.* „*fast form*“) und der antikoagulanten (*engl.* „*slow form*“) Form (Ayala & DiCera, 1994; Lai *et al.*, 1997; Wells & DiCera, 1992). Man geht davon aus, daß die Natrium-gebundene Form (prokoagulant) bevorzugt Fibrinogen spaltet, während die Natrium-freie Form antikoagulant bevorzugt die Spaltung von Protein C bewirkt, welches wiederum die zusätzliche Freisetzung von Thrombin inhibiert. Für die Bindung der Natriumionen an Thrombin wird eine Bindungskonstante von 27 mM bei 25°C beschrieben (Guinto & DiCera, 1997).

Von vielen Enzymen wird berichtet, daß diese durch monovalente Kationen aktiviert werden (Suelter, 1970). Meistens handelt es sich dabei um Kaliumionen, weniger häufig um Natriumionen, da die Mehrheit der Enzyme innerhalb der Zelle aktiv ist, wo Kaliumionenkonzentrationen höher als Na<sup>+</sup>-Konzentrationen sind. Während kinetische Studien bezüglich der allosterischen Aktivierung von Enzymen durch Kationen für zahlreiche Systeme im Detail durchgeführt wurden, ist über die thermodynamischen Eigenschaften der Wechselwirkungen von Kationen mit Enzymen bisher nichts bekannt.

DiCera *et al.* (1995) beschreiben eine Bindestelle für Natriumionen, die etwa 15 Å vom aktiven Zentrum des Thrombins entfernt ist (Abbildung 4.7). Die genaue Lokalisation eines Natriumions in einer Proteinstruktur kann wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben nicht zwingend eindeutig zugewiesen werden, da die Streubeiträge eines Natriumions und eines Wassermoleküls aufgrund der gleichen Elektronenzahl in der Atomhülle sehr ähnlich sind. Die Natriumbindungsstelle im Thrombin kann nach Austausch des Natriumions durch das schwerere Rubidiumion in Kristallen des PPACK-Thrombin-Komplexes eindeutig identifiziert werden (DiCera *et al.*, 1995).



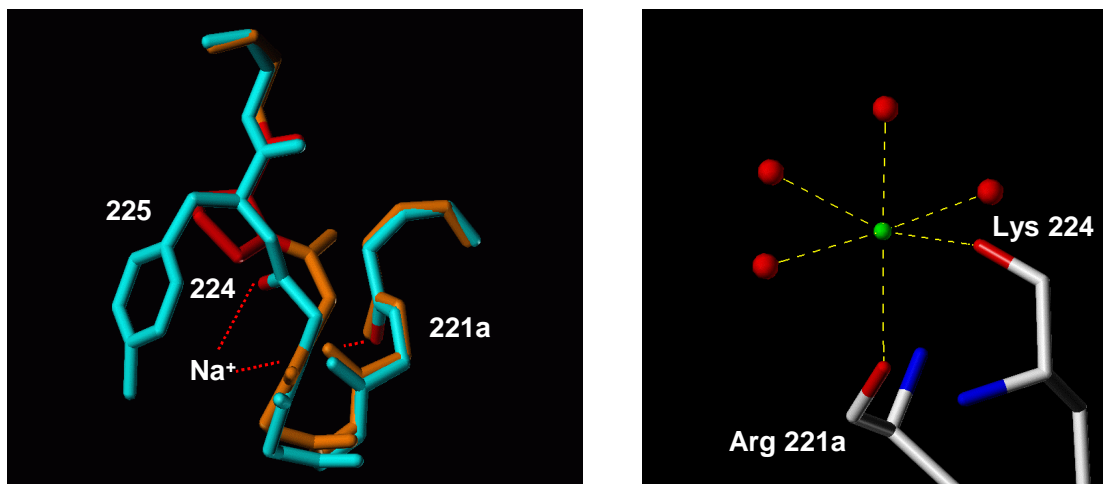
**Abbildung 4.7:** Sekundärstruktur des Thrombins (gelb) mit hervorgehobener Natriumbindungsstelle (rot). Die violett hervorgehobene Aminosäure neben der rot dargestellten Natriumbindungsstelle ist Aspartat 189. Die anderen drei eingezeichneten Aminosäuren gehören zur katalytischen Triade des Thrombins: Histidin 57, Aspartat 102 und Serin 195. Es ist nur die B-Kette des Thrombins dargestellt.

Zhang & Tulinsky (1997) postulieren einen konformativen Wechsel zwischen den zwei Formen des Thrombins. In ihrer Struktur verweisen sie auf zwei Bindungsstellen für Natrium. Die eine Bindungsstelle ist allerdings eine intermolekulare Position zwischen zwei Thrombinmolekülen, die durch Symmetrieoperationen miteinander in Beziehung stehen. Die andere Bindungsstelle wird als funktionell relevante Position angenommen.

Wie andere hoch spezifische Serinproteasen der Blutgerinnungskaskade und des Komplementsystems besitzt Thrombin an Position 225 ein Tyrosin anstelle eines Prolins, das man in den Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin aus dem Verdauungstrakt an dieser Stelle findet (Dang & DiCera, 1996). Das konformativ eingeschränkte Prolin 225 in Trypsin beschneidet die konformativen Eigenschaften der Carbonylgruppe von Lysin 224. Es wird daher postuliert, daß diese Carbonylgruppe nicht mehr in der Lage ist, dort ein Natriumion an Trypsin zu binden. Deshalb wird für Trypsin keine Natriumbindungsstelle beobachtet. Im Thrombin wird dagegen an dieser Stelle ein Natriumion oktaedrisch von den

Carbonylgruppen des Lysins 224 und des Arginins 221a und zusätzlich von vier Wassermolekülen koordiniert (Abbildung 4.8).

Weil Thrombinkristalle nach Zhang & Tulinsky (1997) nicht in Abwesenheit von Natriumionen wachsen, wurde das Kation durch Diffusion aus den Natrium-bindenden Kristallen entfernt. Obwohl sowohl Natrium als auch die koordinierenden Wassermoleküle nicht mehr beobachtet werden konnten, blieb die Reststruktur praktisch identisch. Der Mangel des eigentlich erwarteten konformativen Wechsels ist wahrscheinlich auf Effekte aufgrund der Kristallpackung zurückzuführen.



**Abbildung 4.8:** In Trypsin (orange) ist Tyrosin 225 durch Prolin 225 (rot hervorgehoben) ersetzt, so daß die Carbonylgruppe von Lysin 224 in Trypsin das Natriumion vermutlich nicht mehr koordinieren kann (Nach Dang & DiCera, 1996). Natriumbindungsstelle in Thrombin (rechts).

Betrachtet man die Kristallstrukturen der Trypsinkomplexe, so gibt es keinen Hinweis auf ein gebundenes Natrium an dieser Stelle. Scheinbar erfordert die Funktion des Verdauungsenzyms Trypsin keine vergleichbare Natriumionenbindung.

## 4.4 Wärmekapazitätsänderungen

### 4.4.1 Einführung

Direkte thermodynamische Messungen haben gezeigt, daß die meisten Bindungsprozesse, an denen Enzyme involviert sind, mit negativen Wärmekapazitätsänderung einhergehen. Frühe Studien vergleichen thermodynamische Eigenschaften der Proteinfaltung mit dem Transfer von hydrophoben Verbindungen aus Wasser in nicht-polare Solventien (Connelly & Thompson, 1992; Privalov & Gill, 1988; Sturtevant, 1977). Als erster machte Edsall (Edsall, 1935) den hydrophoben Effekt für die Wärmekapazitätsänderungen  $\Delta C_p$  verantwortlich. Später zeigte Sturtevant (1977), daß die Wärmekapazitätsänderungen der Proteinfaltung hauptsächlich durch den hydrophoben Effekt (Blokzijl & Engberts, 1993) und durch Änderung der internen Vibrationsmodi beeinflußt werden. Durch die Bindung wird der Zugang vom umgebenden Wasser zu den polaren und apolaren funktionellen Gruppen verändert. Dieser Vorgang geht einher mit der Freisetzung und Restrukturierung dort zuvor gebundener Wassermoleküle.

### 4.4.2 Wasser und Oberflächen

Es wurde beobachtet, daß es eine Beziehung zwischen der Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  und der Oberfläche gibt, die während des Bindungsvorganges vergraben wird (Livingstone *et al.*, 1991; Spolar & Record, 1994). Diese Beobachtung beruht auf der Tatsache, daß sich die Wassermoleküle (oder allgemeiner die Solvensmoleküle) an der Oberfläche eines Biomoleküls anders verhalten als im freien Zustand im Wasser. Das ist insbesondere der Fall bei der Wechselwirkung von Wassermolekülen mit einer hydrophoben Oberfläche des Proteins. Die Wärmekapazität für einen Zustand, in dem sich die Wassermoleküle praktisch frei bewegen können und nur Wechselwirkungen mit anderen Wassermolekülen erfahren („*bulk water*“), ist geringer verglichen mit einer Situation, in der sie mit einem Biomolekül wechselwirken bzw. an das Biomolekül gebunden sind. Folglich ist die Änderung der Wärmekapazität für einen Prozeß, bei dem Wasser freigesetzt wird, negativ und sollte außerdem mit der Größe der vergrabenen Oberfläche korrelieren.

Diese Beziehung bietet die Möglichkeit, thermodynamische Daten mit strukturellen Details zu verknüpfen. Wenn man die Struktur eines Proteins oder eines Protein-Ligand-Komplexes kennt, kann man die Oberflächen berechnen, die durch Komplexbildung vergraben werden und folglich auch die Wärmekapazitätsänderungen abschätzen. Umgekehrt kann bei bekanntem  $\Delta C_p$  auf die bei der Bindung vergrabene Oberfläche geschlossen werden.

Allerdings gibt es zahlreiche Ausnahmen, bei denen diese Korrelation nicht gilt bzw. es treten große Differenzen zwischen der so berechneten und der gemessenen Änderung der Wärmekapazität auf. Oft ist es beispielsweise gar nicht möglich, mit Hilfe der Kristallstruktur eines Proteins oder Komplexes die Oberfläche zu bestimmen, falls das System in Lösung sehr flexibel ist und deshalb einem „*induced fit*“-Mechanismus gehorcht. Bei Systemen, bei denen sich Wassermoleküle unmittelbar an der Schnittstelle zwischen Protein und Ligand befinden, ergibt die translatorische Restriktion dieser Wassermoleküle ein stärker negatives  $\Delta C_p$ , als zu erwarten wäre (Ladbury *et al.*, 1994). Auch muß berücksichtigt werden, daß die Freisetzung bzw. Restriktion von Wassermolekülen bei einer Assoziationsreaktion nicht den einzigen Anteil an dem gemessenen  $\Delta C_p$  darstellt. Diskutiert werden andere Mechanismen, die zur Änderung der Wärmekapazität eines Protein-Liganden-Komplexes beitragen (Sturtevant, 1977), wie z.B. die Population niederfrequenter Schwingungsmodi des neu ausgebildeten Protein-Ligand-Komplexes.

#### **4.4.3 Oberflächen und Wärmekapazitätsänderungen**

Weitere Beweise für den Einfluß des hydrophoben Effekts auf die Wärmekapazitätsänderungen liefern Makhatadze & Privalov (1990). Sie demonstrierten, daß die partiellen Wärmekapazitäten von Aminosäureseitenketten gut mit der Größe der durch die Proteinfaltung vergrabenen apolaren Oberflächen korreliert. Ha *et al.* (1989) schlagen vor, daß die stark negativen Wärmekapazitätsänderungen, die während des Assoziationsprozesses von DNA mit Proteinen gemessen werden, primär auf die beim Bindungsprozeß vergrabenen apolaren Oberflächen, die vorher in Kontakt mit Wasser standen, zurückzuführen sind.

Die Beziehung zwischen den Veränderungen der thermodynamischen Parameter und den strukturellen Eigenschaften der Moleküle, auf die diese energetischen Effekte zurückzuführen sind, zu erkennen, bedeutet, die treibenden energetischen Kräfte biochemischer Reaktionen zu enträtseln. Ein erstes allgemeines Verständnis dieser energetischen Kräfte entwickelt sich aus der entdeckten Beziehung zwischen der Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  und dem Vergraben von Oberflächenanteilen 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.

Spolar & Record (1994) beschreiben, daß die Wärmekapazitätsänderungen sowohl für den Transfer von Kohlenwasserstoffen oder Amidin aus Wasser in deren reine flüssige Phase als auch für die Proteinfaltung von den Veränderungen der lösungsmittelzugänglichen apolaren ( $\Delta A_{ap}$ ) und polaren ( $\Delta A_p$ ) Oberflächenanteile (in  $\text{\AA}^2$ ) abhängig sind. Sie etablierten folgende Beziehung für  $\Delta C_p$  (in  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ):

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

Für die Entfaltung einer Reihe von Proteinen, für die Wärmekapazitätsänderungen gemessen wurden und deren Strukturen kristallographisch aufgeklärt wurden, formulieren Murphy & Freire (1992) eine lineare empirische Beziehung zwischen  $\Delta C_p$  (in  $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ) und den vergrabenen lösungsmittelzugänglichen Oberflächen:

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

Thermodynamische Bindungsstudien von FK 506 und Rapamycin, zwei großen hydrophoben Immunsuppressiva, gegenüber FKBP-12 liefern weitere Hinweise für die Korrelation zwischen  $\Delta C_p$  und vergrabener Oberfläche (Connelly & Thompson, 1992). Nahezu die gesamte Oberfläche dieser beiden Inhibitoren, die aufgrund der Assoziationsreaktion von FKBP-12



vergraben wird, ist hydrophoben Gruppen zuzuordnen. Die flächennormierte Wärmekapazitätsänderung, die aus den vergrabenen unpolaren Oberflächen berechnet werden kann, beträgt in diesem Falle  $-1.67 \pm 0.08 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ . Dieser Wert entspricht den von Spolar & Record (1994), Livingstone *et al.* (1991) und Privalov & Gill (1988) beschriebenen Werten für die Freisetzung von Kohlenwasserstoffen aus Wasser in die Reinphase. Ähnliche Werte wurden für die Hydratationswärmekapazitäten der aromatischen und aliphatischen Anteile von Aminosäure beobachtet (Privalov & Makhatadze, 1990). Privalov & Makhatadze (1990) vermuten, daß die negative Wärmekapazitätsänderung für den Bindungsprozeß quantitativ mit der Änderung der lösungsmittelzugänglichen unpolaren und polaren Oberfläche korreliert ist. Weitere Effekte wie Veränderungen der Vibrationsmodi oder andere Phänomene scheinen von untergeordneter Bedeutung für  $\Delta C_p$  zu sein.

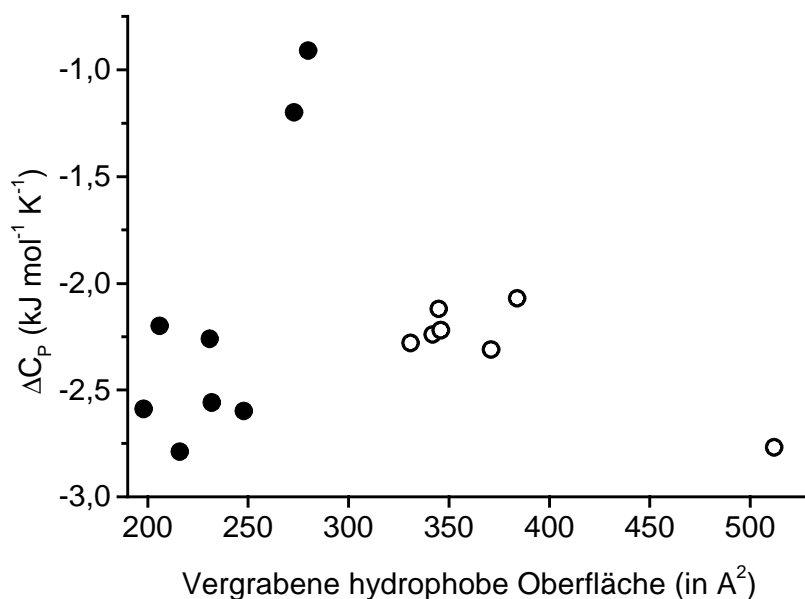
Andere Untersuchungen wiederum hegen Zweifel an der Tatsache, daß die einfache Korrelation zwischen der Wärmekapazitätsänderung und der Änderung der hydrophoben Oberfläche allgemeingültig ist (Connelly *et al.*, 1990; Ladbury & Chowdhry, 1996; Varadarajan *et al.*, 1992).

Ähnliche Hinweise für komplexere Korrelationen werden von Ladbury *et al.* (1994) beschrieben, die ITC-Daten für eine DNA/Protein-Assoziation am Beispiel des *trp*-Repressor-Operator-Komplexes sammelten. Die Berechnung der Wärmekapazitätsänderung für die Bindung des *trp*-Repressors an ein 20-Basen-Oligonucleotid ergibt nur die Hälfte ( $-1.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) des gemessenen Wertes von  $-4.0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Eine noch größere Diskrepanz ergibt sich für einen ähnlichen Komplex des Methionin-Repressor-Systems (Hyre & Spicer, 1995).

#### 4.4.4 Thrombin- und Trypsinbindungen

Für die Bindungsstudien von **1a-5** an Trypsin und Thrombin können keine einfachen linearen Korrelation zwischen  $\Delta C_p$  und der hydrophoben Oberfläche, die aufgrund des Bindungsprozesses vergraben wird, etabliert werden (Abbildung 4.9). Wendet man die oben beschriebene, anhand der FKBP-12 Bindungsstudien abgeleitete Beziehung (Connelly &

Thompson, 1992) auf die Thrombin- und Trypsininhibitoren **1a-5** an, so würden sich für die Trypsinbindung von **1a-1dAc** anhand der aus den Kristallstrukturen berechneten Oberflächenanteilen (ca. 200 Å<sup>2</sup> bis 250 Å<sup>2</sup>, siehe Tabelle 3.20) Wärmekapazitätsänderungen  $\Delta C_p$  zwischen -0.35 und -0.44 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> ergeben. Das heißt, daß nur ein Teil der gemessenen Wärmekapazitäten von -2.20 bis -2.79 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> (Tabelle 3.20) durch das Vergraben hydrophober Oberflächen erklärt werden kann. Ähnlich verhalten sich die aufgrund der vergrabenen Oberfläche berechneten Wärmekapazitätsänderungen für die Bindung von **2** bzw. **3** an Trypsin, obwohl hier die Diskrepanzen zwischen gemessenen und berechneten Werten nicht ganz so groß ausfallen: -0.91 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> gegenüber berechneten -0.49 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> für **2** und -1.20 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> gegenüber berechneten -0.48 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> für **3** (Tabelle 3.20).



**Abbildung 4.9:** Wärmekapazitätsänderungen  $\Delta C_p$  in Abhängigkeit von der vergrabenen hydrophoben Oberfläche (in Å<sup>2</sup>). ● - Bindung gegenüber Thrombin, ○ - Bindung gegenüber Trypsin.

Für die Thrombinbindungsstudien sehen die Verhältnisse ähnlich aus. Berechnet man aus den vergrabenen hydrophoben Oberflächen (ca. 330 bis 510 Å<sup>2</sup>, Tabelle 3.21) nach Connelly & Thomson (1992) die Wärmekapazitätsänderungen (-0.55 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> bis -0.85 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>),

ergibt sich wiederum ein großer Differenzbetrag zu den gemessenen Werten, die im Bereich von  $-2.12 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  bis  $-2.77 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  liegen (bezogen auf die Messungen aus NaCl-Lösung, Tabelle 3.21). Die Messungen von  $\Delta C_p$  für Thrombinbindungen zeigen wie die Enthalpiemessungen für Thrombin ebenfalls Salzabhängigkeiten, die später diskutiert werden (Kapitel 4.4.5). Für die Betrachtungen an dieser Stelle soll Bezug auf die Werte aus Natriumchlorid-Lösung genommen werden.

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. Die Inhibitoren **2** und **3**, die die größten durch die Bindung induzierten Oberflächenänderungen zeigen, besitzen überraschend die am wenigsten negativen Wärmekapazitätsänderungen für die Bindung an Trypsin.

Was kann der Grund für die Diskrepanzen zwischen den berechneten und gemessenen Wärmekapazitätsänderungen bei der Thrombin- und Trypsinbindung sein?

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 Inhibitorserie **1a-1dAc** bei der Bindung an Trypsin gegeben zu sein, auch wenn zusätzliche Beiträge, die noch nicht berücksichtigt sind, einen weiteren Teil der gemessenen Wärmekapazitätsänderung ausmachen. Möglicherweise sind die fehlenden Teile von  $\Delta C_p$  auf die Freisetzung oder Fixierung von Wassermolekülen, die Absorption oder Anregung von niederfrequenten Translations- und Vibrationszuständen (Sturtevant, 1977) oder die Immobilisierung von konformativen Freiheitsgraden zurückzuführen. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, daß **2** und **3** zwar die größten vergrabenen Oberflächenanteile bei der Bindung an Trypsin aufweisen, für diese beiden Substanzen aber signifikant weniger negative  $\Delta C_p$ -Werte im Vergleich mit der Substanzserie **1a-1dAc** gemessen werden können. Wegen der größeren Anzahl rotierbarer

Bindungen ist anzunehmen, daß **2** und **3** sowohl im ungebundenen Zustand in wäßriger Lösung wie auch gebunden in der Bindungstasche konformativ mehr Freiheitsgrade als **1a-1dAc** aufweisen. Ob deshalb die Trypsinkomplexe mit **1a-1dAc**, verglichen mit denen von **2** bzw. **3**, niederfrequente Vibrationszustände, die durch die bestehende Bewegungsfreiheit der Liganden im Protein mitbestimmt werden, in einer günstigeren Weise im interessierenden Temperaturbereich populieren können, ist schwer abzuschätzen. Allerdings kann dieser Aspekt eine wichtige Ursache für die absolute Größe der gemessenen Wärmekapazitätsänderungen sein.

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.

Mit steigender Temperatur wird die Bindung der Inhibitoren an Trypsin bzw. Thrombin entropisch immer ungünstiger, weil  $\Delta G$  nahezu temperaturunabhängig ist (Tabelle 3.3). Die Freisetzung von Wasser aus der Bindetasche eines Proteins ist entropisch bevorzugt. Dunitz (1994) postulierte ein oberes Limit von  $40 \text{ J K}^{-1} (\text{mol Wasser})^{-1}$  als entropischen Gewinn für die Freisetzung von stark fixierten Wassermolekülen. Auf der anderen Seite wird die Beteiligung von Wassermolekülen an Kontakten, die Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein vermitteln, mit dem Verlust an Entropie bestraft.

Die Komplexbildung geht mit dem Verlust an Translations-, Rotations- und Konformationsentropie einher, da die unabhängige Bewegung mehrerer Teilchen eingeschränkt wird. Diese Verluste werden in Abhängigkeit von der Stärke der Protein-Liganden-Bindung teilweise durch Beiträge kompensiert, die durch neu aktivierte, wärmeabsorbierende Vibrationszustände des gebildeten Komplexes entstehen.

Die unterschiedlichen Beiträge haben in Abhängigkeit von der Temperatur verschiedene Vorzeichen und Beträge. Zu einem gewissen Grad werden sie sich gegenseitig kompensieren, für die hier beschriebenen Thrombin- und Trypsinbindungsstudien (sowie für viele andere biophysikalische Bindungsreaktionen) offensichtlich in einer Art und Weise, daß der

Gesamtprozeß eine negative Wärmekapazitätsänderung aufweist und deshalb mit steigender Temperatur mit einem stetig anwachsenden Entropieverlust einhergeht.

Wenn diese Schlußfolgerungen generell für die meisten Komplexbildungen strukturell sehr unterschiedlicher Klassen wechselwirkender Moleküle gelten, erscheint es wahrscheinlich, daß die ubiquitär anwesenden und stets beteiligten Wassermoleküle eine vorherrschende Rolle spielen. Dies würde auch die teils nicht einfach zu beschreibende Korrelation zwischen gemessener Wärmekapazitätsänderung und vergrabener Oberfläche erklären.

#### **4.4.5 Abhängigkeit der Wärmekapazitätsänderung von zugesetzten Alkaliionen**

Es ist weitgehend akzeptiert, daß elektrostatische Wechselwirkungen die Bindung von geladenen Spezies gegenüber Enzymen beschreiben und daß die hydrophoben Oberflächenanteile, die aufgrund der Komplexbildung von der wäßrigen Umgebung entfernt werden, mit einer negativen Wärmekapazitätsänderung in Beziehung gebracht werden können.

Somit haben die elektrostatischen Wechselwirkungen den größten energetischen Anteil an der Bindung von monovalenten Kationen gegenüber Enzymen. Wenn Wärmekapazitätsänderungen mit vergrabenen Oberflächenanteilen korreliert sind, sollten Ionenbindungen aufgrund der geringen Fläche, die bei diesem Erkennungsprozeß vergraben wird, nur sehr klein sein.

Betrachtet man die Kristallstrukturen, die in Gegenwart von Natrium kristallisiert wurden, beträgt der vergrabene hydrophobe Oberflächenanteil für die Bindung von **2** und **3** gegenüber Thrombin  $371 \text{ \AA}^2$  bzw.  $512 \text{ \AA}^2$  (Tabelle 3.21). Die Differenzen zwischen den Wärmekapazitätsänderungen, die zum einen in Anwesenheit von Natriumionen, zum anderen in Anwesenheit von Rubidiumionen gemessen wurden (Tabelle 3.21), legen einen zusätzlichen vergrabenen hydrophoben Oberflächenanteil nahe. Nach der Beziehung von Connelly & Thomson (1992) würden diese  $\Delta C_p$ -Differenzen für zusätzlich vergrabene hydrophobe

---

Oberflächen von  $497\text{\AA}^2$  für **2** bzw.  $521\text{\AA}^2$  für **3** Anlaß geben. Diese Werte erscheinen unrealistisch hoch und müssen auf anderen molekularen Ursachen beruhen.

Zwei Erklärungen bieten sich an. Im Einklang mit der vorhergehenden Diskussion können Wärmekapazitätsänderungen nur zum Teil durch die Veränderung der Oberflächen erklärt werden. Andere Effekte, die strukturell auf ganz anderen Ursachen beruhen, sind dann für die stärker negativen Wärmekapazitätsänderungen in Gegenwart von Rubidiumionen verantwortlich.

Eine zweite Erklärung wären außergewöhnliche konformative Umlagerungen des Thrombins in Abwesenheit von Natriumionen, die Veränderungen der Proteinoberfläche bewirken. Thrombin wird jedoch als rigides Enzym beschrieben, das keinem „*induced fit*“-Mechanismus aufgrund der Bindung verschiedenster Inhibitoren folgt (Bode & Stubbs, 1995).

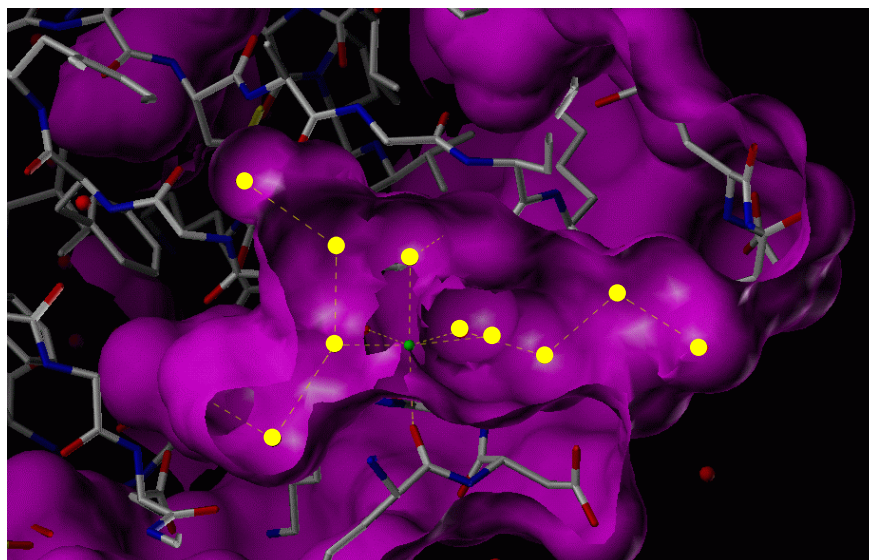
Offensichtlich kann man die Differenzen der Wärmekapazitätsänderungen in Anwesenheit von Natrium- bzw. Rubidiumionen nicht durch die üblichen linearen Korrelationen mit den Oberflächen beschreiben, die bei der Bindung vergraben werden. Auch eine Erklärung anhand von Domänenbeweglichkeiten, die durch Bindung niedermolekularer Inhibitoren an ein Makromolekül wie Thrombin ausgelöst werden, erscheint kaum plausibel.

Wie in Kapitel 4.3 diskutiert wird in den Kristallstrukturen von Thrombin eine Natrium/Rubidium-Bindestelle beschrieben, die etwa  $15\text{\AA}$  vom aktiven Zentrum des Thrombins entfernt ist. Bis heute gibt es keinen Beweis für eine signifikante konformative Änderung des Thrombins ausgelöst durch Inhibitoren oder Kationen (Zhang & Tulinsky, 1997). Ein „*induced fit*“ Mechanismus wird allerdings für die Bindung des makromolekularen Inhibitors Hirudin an Thrombin diskutiert (Ayala *et al.*, 1995).

Die Bindungen des Hirudins und anderer vom Hirudin abgeleiteter Inhibitoren an Thrombin wurden mit Hilfe kinetischer Daten durch van't Hoffsche Analyse untersucht. Interessant ist, daß in diesem Fall keine Abhängigkeit der Wärmekapazitätsänderungen von der Präsenz der Natriumionen beobachtet wird (Ayala *et al.*, 1995; Guinto & DiCera, 1996). Jeder Versuch einer Erklärungen dieser abweichenden Ergebnisse muß rein spekulativ bleiben. Bei der

Wechselwirkung von Thrombin mit hochmolekularen Inhibitoren wie Hirudin ist die Situation äußerst komplex und kann leicht zu sich wechselseitig kompensierenden Effekten führen.

Die Bindung von Alkaliionen an Thrombin hat auch einen Einfluß auf die Bindungsenthalpie (Kapitel 3.4.3). Es wäre interessant zu sehen, ob die Bindungen der verschiedenen Kationen selbst zu unterschiedlichen Wärmekapazitätsänderungen führen. Da die Bindungskonstante der Alkaliionen gegenüber Thrombin nur im millimolaren Bereich liegt, ist eine kalorimetrische Quantifizierung dieses Effekts jenseits des experimentellen Detektionslimits des verwendeten Kalorimeters.



**Abbildung 4.10:** Wasserstruktur (gelb) in der Nähe der Natriumionenbindestelle (grün). Die Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

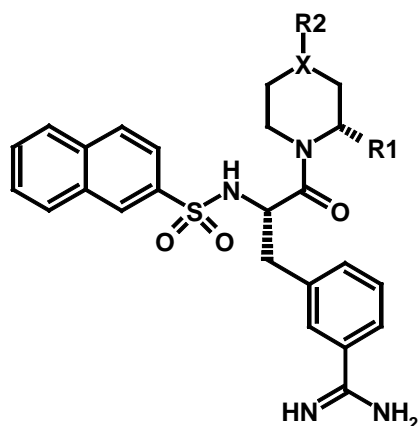
Möglicherweise ist die wiederum unterschätzte Rolle des Wassers während des Bindungsprozesses verantwortlich für die Differenzen zwischen den  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Rb}^+$ -abhängigen Wärmekapazitätsänderungen. Denn ein ausgedehntes Netzwerk von Wassermolekülen verbindet die Ionenbindestelle mit den  $\text{S}_1$ - und  $\text{S}_2$ -Bindetaschen des Thrombins (Guinto & DiCera, 1997; Krem & DiCera, 1998; Nayal & DiCera, 1996).

Dieses Wassernetzwerk steht außerdem in Wechselwirkung mit Tryptophan 60D in der *60er* Schleife des Thrombins (Kapitel 2.1.4). Die Beweglichkeit dieser Insertionsschleife ist nach Guinto & DiCera (1997) direkt mit den kinetischen Eigenschaften des Enzyms verknüpft. Beispielsweise verändert eine Mutation des Tryptophans 60D zu Serin die kinetischen Eigenschaften des Thrombins (Guinto & DiCera, 1997). Es wäre denkbar, daß der Austausch von Natriumionen durch andere Alkaliionen am Anfang dieses Wassernetzwerks einen signifikanten Einfluß auf dessen Eigenschaften nimmt und so zur vermutlich biologisch gewollten Modulation der thermodynamischen Eigenschaften des Thrombins bei der Substrat- und auch bei der Inhibitorbindung beiträgt.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wurden für zwei komplette Serien niedermolekularer Thrombin- und Trypsininhibitoren (**1a-1dAc** und **2-5**) thermodynamische Daten direkt gemessen. Parallel dazu wurden sieben Kristallstrukturen von Trypsin im Komplex mit den Inhibitoren **1b**, **1cMe**, **1d**, **1dAc**, **3**, **4** und **5** mit einer Auflösung von bis zu 1.9 Å röntgenkristallographisch aufgeklärt.

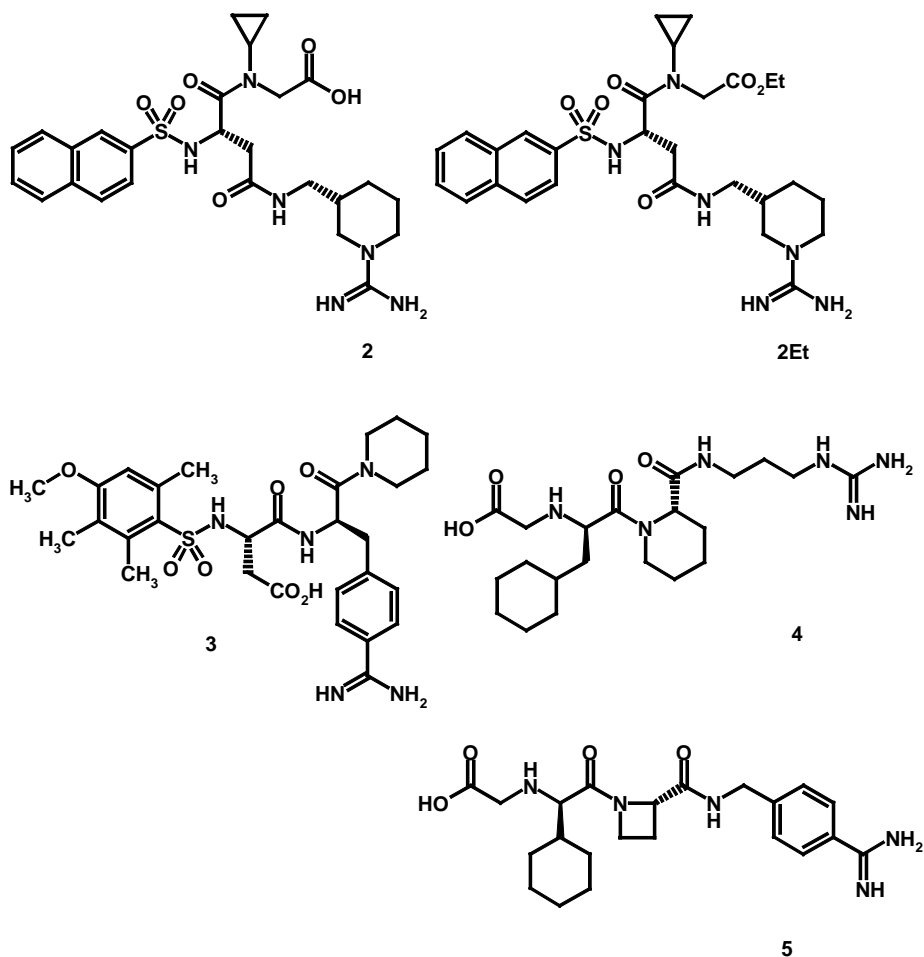


Substanz	Substituenten		
	R1	R2	X
<b>1a</b>	-H	-CH <sub>3</sub>	C
<b>1b</b>	-CO <sub>2</sub> H	-H	C
<b>1bMe</b>	-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	C
<b>1c</b>	-H	-CO <sub>2</sub> H	C
<b>1cMe</b>	-H	-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C
<b>1d</b>	-H	-H	N
<b>1dAc</b>	-H	-Ac	N

**Tabelle 5.1:** Übersicht der untersuchten Thrombin- und Trypsininhibitoren mit 3-Amidinophenylalaninstruktur.

Thrombin und Trypsin sind als Proteine leicht zugänglich, einfach in größeren Mengen aufzureinigen und unter den Meßbedingungen im beobachteten Temperaturbereich stabil. Für beide Enzyme wurde in den letzten Jahren eine Fülle von neuen Inhibitorstrukturen entwickelt und synthetisiert. Aufgrund der großen Anzahl an Inhibitoren und dem damit verbundenen tieferen strukturellen Verständnis waren beide Serinproteasen oft auch Gegenstand für Fallstudien im rationalen Wirkstoffdesign. Allerdings gibt es bis heute keine Veröffent-

lichungen über eine umfassende thermodynamische Charakterisierung der Ligandenbindung an insbesondere Thrombin und Trypsin mit Hilfe einer direkten Methode wie der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC).



**Abbildung 5.2:** Strukturformeln der kommerziellen Trypsin- und Thrombininhibitoren.

Die thermodynamischen Untersuchungen zeigen, daß auch innerhalb einer Serie von homologen Verbindungen **1a-1dAc** und **2-5** auf den ersten Blick überraschende, wohl kaum korrekt vorhersagbare Wechsel der Protonierungszustände vorkommen. Während **1b**, **1d** und **2** aufgrund der Komplexbildung ihren Protonierungszustand wechseln, ist kein Protonentransfer für die übrigen Substanzen zu beobachten. Dies erscheint um so

überraschender, da homologe Liganden betrachtet wurden, die äquivalente funktionelle Gruppen an ihrem Grundgerüst tragen.

Berücksichtigt man jedoch die etablierten Prinzipien der Natur, die physikochemischen Eigenschaften der zwanzig natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäuren maßzuschneidern, sind die lokal induzierten Verschiebungen der  $pK_a$ -Werte nicht mehr überraschend (Langsetmo *et al.*, 1991a; Langsetmo *et al.*, 1991b; Urry *et al.*, 1992; Urry *et al.*, 1993). Allerdings sind bis heute keine Fälle bekannt, in denen das Protein aufgrund der Bindungsreaktion den Ionisierungszustand des Liganden beeinflusst. Es ist aber zu vermuten, daß dieser Vorgang sehr häufig eintritt, bisher aber einfach übersehen wurde.

Die dazu nötigen  $pK_a$ -Verschiebungen können durch elektrostatische Effekte der Umgebung induziert werden. Allerdings können die hier beobachteten Verschiebungen nur teilweise durch elektrostatische Wechselwirkungen erklärt werden. Zunehmend wird angenommen, daß auch hydrophob induzierte  $pK_a$ -Verschiebungen von großer Wichtigkeit sind (Urry *et al.*, 1993).

Funktionelle Gruppen von Liganden und Enzymen können aufgrund der Ligandenbindung an das Enzym Änderungen in ihren Protonierungszuständen erfahren. Diese Protonierungs- bzw. Deprotonierungsschritte sind der eigentlichen Assoziationsreaktion zwischen Ligand und Protein überlagert und geben Anlaß zu zusätzlichen Wärmeeffekten. Sie rühren von der Protonierung bzw. Deprotonierung der funktionellen Gruppen sowohl des Liganden als auch des Proteins und des Puffers her. Um vergleichende Interpretationen der intrinsischen Bindungsenthalpien  $\Delta H_{\text{bind}}$  und der Entropiebeiträge  $\Delta S$  eines Bindungsprozesses anstellen zu können, müssen die Ionisierungsenthalpien vorher bestimmt und bei der Berechnung der intrinsischen Bindungsenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  berücksichtigt werden. Leider sind solche Korrekturen bisher in der Literatur nicht durchgeführt worden. Es ist daher zu befürchten, daß viele Studien aus diesem Grund zu falschen Korrelationen gelangt sind.

Sind die gemessenen Enthalpiewerte um die verschiedenen Effekte korrigiert worden, so ist es möglich, Trends in den enthalpischen und entropischen Termen der Bindungsreaktion anhand zusätzlicher struktureller Information aus den Kristallstrukturen zu interpretieren.

Unausgeglichene Wasserstoffbrückennetzwerke nach der Bindung des Liganden an das Enzym sind enthalpisch ungünstig. Demgegenüber ist eine starke Immobilisierung des Liganden in der Bindetasche entropisch weniger favorisiert als der Erhalt einer gewissen Restbeweglichkeit im gebundenen Zustand. Für alle untersuchten Inhibitoren wurden stark negative Wärmekapazitätsänderungen bei der Assoziation mit dem Protein beobachtet. Dies bedeutet, daß die Bindung mit steigender Temperatur stärker exotherm und entropisch zunehmend ungünstig wird. Wegen der Kompensation von entropischen und enthalpischen Effekten bleibt dabei die Freie Bindungsenthalpie  $\Delta G$  des Systems bei steigender Temperatur nahezu unverändert. Man muß daher bei der Diskussion enthalpie- oder entropiegetriebener Bindungsvorgänge berücksichtigen, daß das relative Verhältnis der Enthalpie/Entropie-Verteilung von der gewählten Meßtemperatur abhängt. Häufig werden in der Literatur enthalpisch und entropisch getriebene Bindungseigenschaften diskutiert, die bei 25°C ermittelt wurden, aber dann auf die Verhältnisse unter physiologischen Bedingungen übertragen werden. Dieses Vorgehen muß in Anbetracht der stark negativen  $\Delta C_p$ -Werte als unzulässig gelten.

Zu einem gewissen Anteil kann die negative Wärmekapazitätsänderung bei den Bindungsreaktionen durch das Vergraben hydrophober Oberflächenanteile des Enzyms und des Liganden von der wäßrigen Umgebung erklärt werden. Jedoch sind weitere Effekte wie die Modulation der Wasserstruktur, der Wechsel niederfrequenter Vibrationszustände und andere ordnende Phänomene für diese stark negativen Wärmekapazitätsänderungen zu berücksichtigen.

Im Fall von Thrombin werden Wärmekapazitätsänderungen bei der Bindungsreaktion durch die Anwesenheit von Alkaliionen beeinflusst. Sind Natriumionen bei der Thrombinbindung zugegen, fallen die gemessenen Wärmekapazitätsänderungen weniger negativ aus als in Gegenwart von Rubidiumionen oder völliger Abwesenheit von Natriumionen. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Differenz auf vergrabene hydrophobe Oberflächenanteile zurückzuführen ist. Wahrscheinlich sind andere Effekte wie die Modulation der Wasserstruktur im Thrombin für die abweichenden Wärmekapazitätsänderungen verantwortlich.

Natriumionen wird die Fähigkeit zugeschrieben, allosterische Eigenschaften des Thrombin zu beeinflussen. Diese Entdeckung ist im Einklang mit den gefundenen unterschiedlichen Bindungsenthalpien für die Präsenz oder das Fehlen von Natriumionen bei der Ligandenbindung an Thrombin.

Für viele Enzyme kann die Aktivierung durch monovalente Kationen, meistens Kaliumionen, weniger häufig Natriumionen, gefunden werden (Guinto & DiCera, 1996; Suelter, 1970). Das liegt daran, daß die meisten Enzyme im Inneren von Zellen wirken, wo die Kaliumionenkonzentration höher ist als die der Natriumionen.

Dementsprechend muß man in thermodynamischen Studien mögliche Abhängigkeiten der thermodynamischen Parameter von Salzbedingungen berücksichtigen, da sonst die Richtigkeit der späteren Interpretationen der thermodynamischen Daten mehr als fragwürdig erscheint.

Die beobachteten Abhängigkeiten, insbesondere die Veränderungen der Protonierungszustände, weisen auf die Bedeutung und Wichtigkeit hin, die Ionisierungszustände im Rahmen des rationalen Wirkstoffdesigns korrekt zu beschreiben. Die Vorhersage der Protonierungszustände des freien Liganden, des freien Proteins und des entstandenen Komplexes ist durch komplizierte theoretische Ansätze (Schaefer *et al.*, 1997; Schaefer *et al.*, 1998) möglich, die allerdings hydrophobe Effekte auf die Verschiebung von  $pK_a$ -Werten bis heute nicht berücksichtigen. Für Anwendungen des rationalen Wirkstoffdesigns und für das Durchsuchen großer Datenbanken im Rahmen des „*virtual screening*“ sind diese theoretischen Berechnungen nur wenig praktikabel, weil sie zu zeitaufwendig und zu rechenintensiv sind.

Lokal induzierte, dielektrische Veränderungen in der Proteinumgebung können eine neutrale Wasserstoffbrücke in eine ladungsunterstützte Salzbrücke oder eine Donorgruppe in eine Akzeptorgruppe verwandeln. Solche experimentell nur schwer faßbaren Zustände, die in Kristallstrukturen kaum zu beobachten sind, führen leicht zu fehlerhaften Designansätzen, die durch falsch modellierte Bindungsmodi und durch inkorrekt vorhergesagte Affinitäten während des „*virtual screening*“ enthüllt werden. Daher müssen weniger rechenintensive Methoden entwickelt werden, die zumindest approximativ die Konsequenzen der Umgebung

auf die Ionisierungszustände der funktionellen Gruppen durch empirische Ansätze schnell und einfach vorhersagen.

Analog dem „*induced fit*“, der die sterische Anpassung des Enzyms auf den gebundenen Liganden beschreibt, ist der in dieser Arbeit beobachtete Einfluß des Proteins auf den Ionisierungszustand des Inhibitors mit dem Begriff „*induced dielectric fit*“ zu beschreiben.

## 6 EXPERIMENTELLER TEIL

### 6.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

#### Reagenzien.

Soweit es nicht explizit erwähnt wird, wurden die Reagenzien in der Qualität „pro analysi“ (p.a.) oder höherer Qualität bezogen.

#### Wasser.

Das verwendete Wasser war entionisiert, für Kristallansätze wurde es zusätzlich noch zweimal destilliert.

#### Maßlösungen.

Für die Herstellung von Maßlösungen wurden Titrisolampullen der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

#### Abkürzungen.

Folgende Abkürzungen werden in diesem Kapitel benutzt:

BSA	Bovines Serumalbumin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethansulfonsäure
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
PEG 8000	Polyethylenglykol 8000
pNPGb	p-Nitrophenylguanidinbenzoat
TRICINE	N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	N-Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Veronal	5,5-Dimethylbarbitursäure

## 6.2 Proteinreinigung

### 6.2.1 Herstellung der Affinitätssäule

10 g CH Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) wurden in 100 ml Wasser gequollen und danach über einer G3-Glasfritte gründlichst mit 1 Liter Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 50 ml Wasser aufgeschlämmt. Langsam tropfte man eine Lösung von 5 g N-Dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid in 5 ml Wasser zur Sepharose-aufschlammung, die während der Reaktion mit einem Flügelrührer langsam gerührt wurde. Dabei wurde der pH-Wert der Aufschlammung mit 0.5 M-Salzsäure zwischen 4.0 und 5.5 gehalten. Man ließ weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur rühren und wusch die aktivierte Sepharose anschließend über einer G3-Glasfritte mit 1.5 Liter Wasser. Der Ansatz wurde dann in zwei gleiche Teile geteilt.

Jeder Teilansatz wurde in 100 ml Wasser in einem Erlenmeyerkolben aufgeschlämmt und in einer Portion mit einer Lösung von 20 mg Hirudin HBW023 in 2.3 ml Wasser versetzt. Über Nacht wurden die Teilansätze mit Hilfe eines automatischen Schüttlers bei 5°C im Kühlraum geschüttelt.

Es wurde jeweils mit 500 µl Ethanolamin versetzt und anschließend über einer G3-Glasfritte abgesaugt. Das Säulenmaterial wusch man mit 2 Litern Wasser und anschließend mit 20 ml 0.25 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.7). Zum Schluß wurde das Säulenmaterial mit einem Liter 0.025 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.7) eingestellt. Das fertige Säulenmaterial wurde in eine Säule (Ø1.3 cm x 54 cm) gefüllt, die im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt wurde.



## 6.2.2 Reinigung von Thrombin

### Lösungen.

<b>Phosphatpuffer</b>	0.025 M Natriumdihydrogenphosphat mit Natronlauge auf pH 6.7 eingestellt
<b>Benzamidinlösung</b>	4.70 g Benzamidiniumhydrochlorid in 2 M Natriumphosphatpuffer, pH 6.7
<b>Phosphatpuffer mit NaCl</b>	0.025 M Natriumdihydrogenphosphat und 0.3 M Natriumchlorid mit Natronlauge auf pH 6.7 eingestellt

**Gerät.** GradiFrac System der Firma Amersham Pharmacia Biotech mit Peristaltikpumpe, Durchflußzelle mit Detektor bei 254 nm Wellenlänge, automatischem Schreiber und automatischem Fraktionssammler.

**Durchführung.** Es wurden 100 mg Rohthrombin, isoliert aus Rinderblut nach Furton *et al.* (1972), in 3 ml Phosphatpuffer (0.025 M Natriumphosphatlösung auf pH 6.7 eingestellt) gelöst. Dann wurde die Thrombinlösung bei einer Auftragesgeschwindigkeit von 0.7 ml/min mit Hilfe der Pumpe auf die Affinitätssäule aufgetragen, nochmals mit 2 ml Phosphatpuffer nachgespült und anschließend die Laufmittelgeschwindigkeit auf 1 ml/min erhöht. Alle 4 Minuten wurde eine neue Fraktion genommen, so daß diese jeweils ein Volumen von 4 ml Lösung hatten. Nach der 20. Fraktion wurde der Phosphatpuffer als Laufmittel durch Phosphatpuffer (pH 6.7) mit Natriumchlorid als neues Laufmittel ersetzt. Ab der 40. Fraktion wurde das Thrombin durch einen linearen Laufmittelgradienten aus 15 ml Benzamidinlösung und 15 ml 2 M Phosphatpuffer (pH 6.7) eluiert. Anschließend wurde der zuerst verwendete Phosphatpuffer wieder als Laufmittel verwendet. Die Elution des Thrombins verfolgte man durch einen UV-Vis –Detektor bei 254 nm Wellenlänge.

Die Thrombin enthaltenden Fraktionen wurde auf PD-10 Entsalzungssäulen (Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt, vereinigt und über Nacht gefriergetrocknet.

### 6.3 Aktivitätsbestimmung

#### Lösungen.

<b>Veronalpuffer</b>	0.1 M 5,5-Dimethylbarbitursäure (20.6 g/l) mit verdünnter Salzsäure auf pH 8.3 eingestellt
<b>pNPGB-Lösung</b>	0.01 M p-Nitrophenylguanidinbenzoat (3.36 mg/ml) in Dimethylformamid (haltbar bis zur Gelbfärbung)
<b>Thrombinlösung</b>	0.1 mg bovines $\alpha$ -Thrombin in 1 ml 0.9 %-iger Natriumchloridlösung
<b>Trypsinlösung</b>	0.1 mg bovines $\beta$ -Trypsin (Merck) in 1ml 0.9 %-iger Natriumchloridlösung

**Messung.** In zwei 1 cm Küvetten wurden jeweils 200  $\mu$ l Thrombinlösung (bzw. 150  $\mu$ l Trypsinlösung) und 800  $\mu$ l Veronalpuffer (bzw. 850  $\mu$ l Veronalpuffer) gemischt. Danach wurde in die Probenküvette 10  $\mu$ l pNPGB-Lösung gegeben, der Inhalt gemischt und die Probenküvette schnell in ein Zweistrahlenspektrophotometer gebracht. Bei 410 nm wurden die Absorptionsänderung in der Probenküvette gegen die Referenzküvette solange gemessen, bis die Absorptionsänderung geradlinig verlief.

Den Extinktionssprung  $\Delta E$  („*initial burst*“) bestimmte man durch Interpolation auf den Zeitpunkt der Zugabe von pNPGB-Lösung. Die Konzentration  $c$  (in mol/l) des aktiven Enzyms ergibt sich aus:

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

wobei  $\epsilon$  der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenylguanidinbenzoat ( $\epsilon = 17300$ ) und  $d$  die Länge des Strahlungsweges durch die Küvette ( $d = 1$  cm) ist (Kézdy & Kaiser, 1970).

**Ergebnisse.** Die Konzentrationen an aktivem Enzym ergaben im folgenden:

Trypsin: 37.6 nmol / mg Einwaage

Thrombin: 19 nmol / mg Einwaage

## 6.4 Inhibitor Datensatz

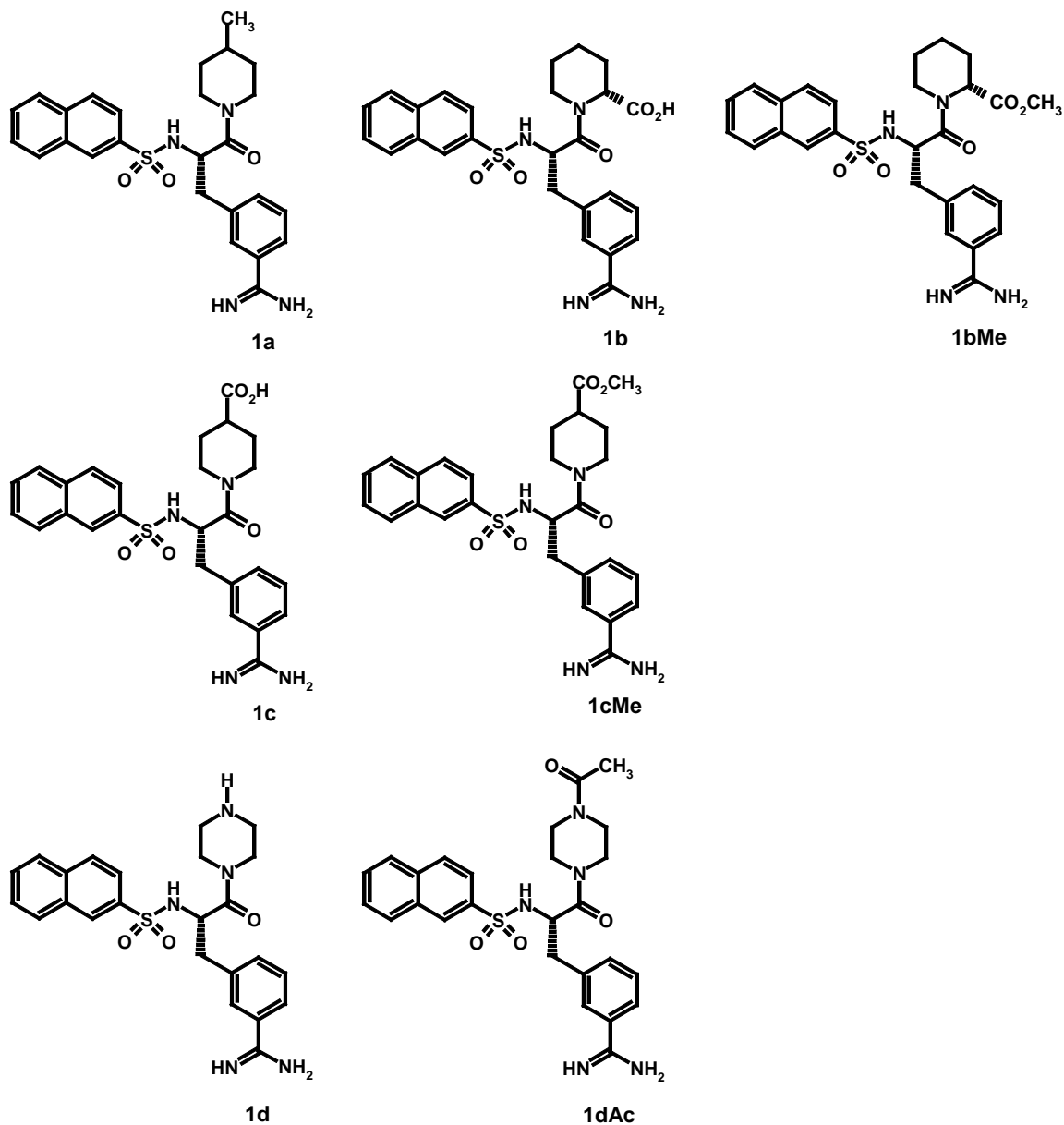


Abbildung 6.1: Strukturformeln der Trypsin- und Thrombininhibitoren.

Die Inhibitoren N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-4'-methylpiperidid **1a**, N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-R-pipecolinsäure **1b**, N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-R-pipecolinsäuremethylester **1bMe**, N-(2-Naphthyl-

sulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-*iso*-nipecotinsäure **1c**, N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-*iso*-nipecotinsäuremethylester **1cMe**, N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-piperazid **1d**, N-(2-Naphthylsulfonyl)-S-3-amidinophenylalanin-4'-acetylpiperazid **1dAc** wurde von J. Stürzebecher (Friedrich-Schiller-Universität Jena, Hauptklinikum Erfurt) zur Verfügung gestellt (Stürzebecher *et al.*, 1995). Die Inhibitionskonstanten  $K_i$  wurden von Stürzebecher *et al.* (1995) veröffentlicht.

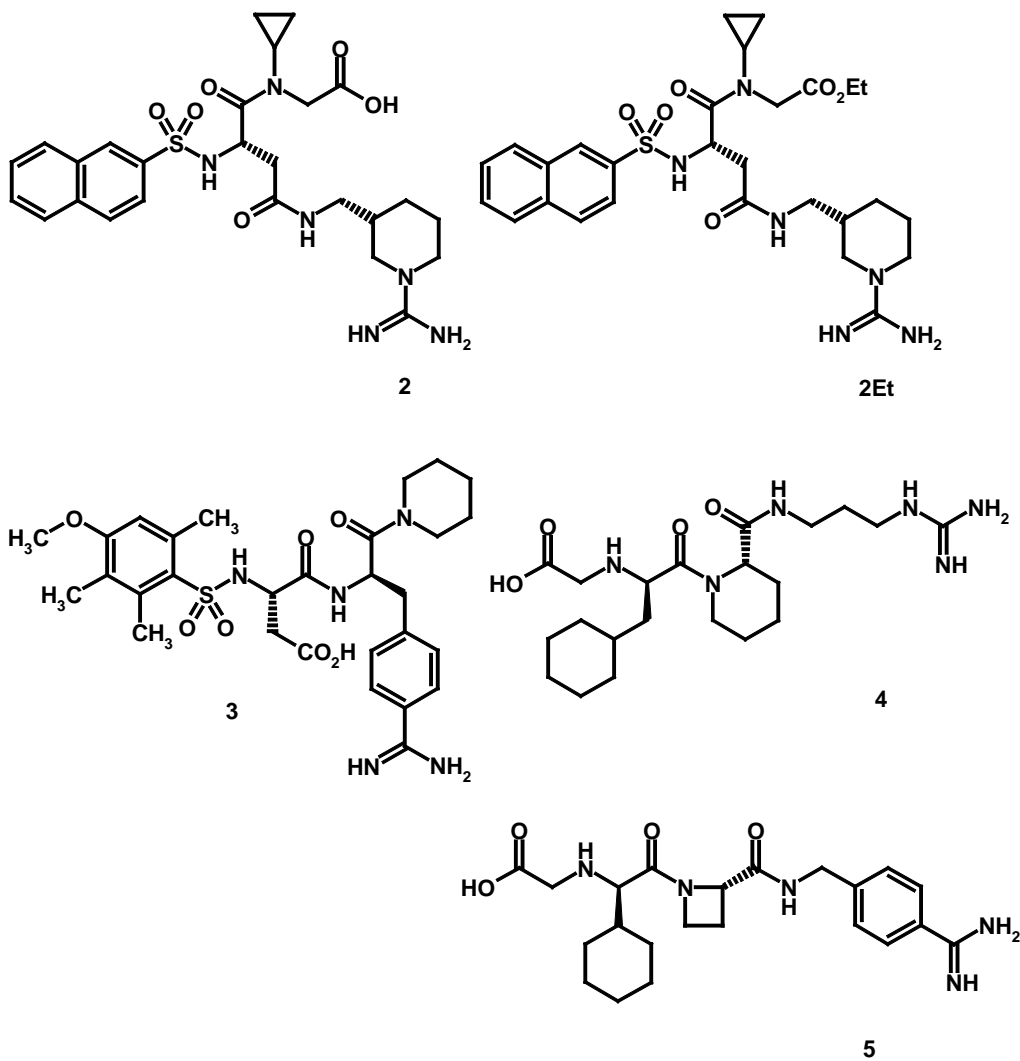


Abbildung 6.2: Strukturformeln der kommerziellen Trypsin- und Thrombininhibitoren.

Die Inhibitoren Napsagatran **2** und Napsagatranethylester **2Et** wurden von Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt (Hilpert *et al.*, 1994). CRC 220 **3** (Reers *et al.*, 1995) ist ein Thrombininhibitor der Firma Chiron-Behring (Marburg). Die Firma Astra Haessle (Möln dal, Schweden) stellte die beiden Inhibitoren Inogatran **4** (Weltpatent WO9311152-A1) und Melagatran **5** (Weltpatent WO9429336-A) zur Verfügung (Gustafsson *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1998).

## 6.5 Messung der Inhibitionskonstanten $K_i$

Die Messungen wurden auf einem Mikroplattenreader iEMS Reader MF der Firma Labsystems (Finnland) durchgeführt. Die Temperatur betrug 25°C, soweit nichts anderes angegeben wurde. Die Meßdaten wurden mit der Software Ascent Software 2.4 prozessiert.

### Lösungen.

<b>Puffer</b>	50 mM TRIS, 154 mM Natriumchlorid (oder Kaliumchlorid für Sondermessungen), 5 Vol-% Ethanol mit Salzsäure auf pH 7.8 eingestellt
<b>Substrat</b>	Lösungen von Pefachrome tPA (Pentapharm Ltd., Schweiz), Methansulfonyl-D-Hexahydrotyrosyl-Gly-Arg-p-nitroanilid in Wasser (0.5, 1 und 2 mM)
<b>Inhibitor</b>	Angelöst mit 5 % Ethanol und in Puffer verdünnt

**Proteine.**

<b>Trypsinlösung</b>	Stammlösung: ca. 50 µg/ml in 1mM Salzsäure (bei 4°C einen Monat lang haltbar), Verdünnung 1:100 in 154 mM Natriumchloridlösung
<b>Thrombinlösung</b>	Stammlösung: ca. 50 µg/ml in 154 mM Natriumchloridlösung (bei 4°C eine Woche lang haltbar), Verdünnung 1:40 (1:100 für Vorschrift nach Morrison & Stone (1985)) in 154 mM Natriumchloridlösung mit 1 Gew-% BSA

Der Meßansatz bestand aus 200 µl Inhibitor/Puffer, 50 µl Enzymlösung und 25 µl Substratlösung. Drei verschiedene Konzentrationen der Substratlösung und fünf unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors wurden für die Meßansätze benutzt. Nach einer Meßdauer von drei Minuten wurden die Reaktionen durch Zugabe von 25 µl Essigsäure (50%) abgebrochen und die optische Dichte jedes Meßansatzes bei 405 nm vermessen. Die Inhibitionskonstanten  $K_i$  wurde durch lineare Regression nach Dixon (Dixon, 1953) bestimmt.

Die Bestimmung der Inhibitor konstanten  $K_i$  von **2** und **3** für die Bindung an Thrombin (Tabelle 3.3) wurde nach der Vorschrift von Morrison & Stone (1985) durchgeführt („*tight binding kinetics*“). Eine Konzentration der Substratlösung (2 mM) und 11 unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors (im Bereich von 0.4 nM bis 4 nM) wurden für die Meßansätze benutzt. Nach einer Meßdauer von fünf Minuten wurde optische Dichte jedes Meßansatzes bei 405 nm vermessen.

## 6.6 Kristallisation

### 6.6.1 Kristallisation von Trypsinkomplexen durch „Soaking“

Die Trypsinkomplexe der Inhibitoren **1cMe**, **1d** und **1dAc** wurden durch Kristallisation von Trypsin und anschließendem „soaking“ der Inhibitoren erhalten.

#### Lösungen.

<b>Azidlösung</b>	0.2 %-ige Natriumazidlösung
<b>Benzamidinlösung</b>	100 mM Benzamidiniumhydrochlorid
<b>Erntepuffer</b>	2.5 M Ammoniumsulfat und 100 mM MES mit verdünntem Ammoniak auf pH 6.0 eingestellt
<b>Trypsinlösung</b>	60 mg Trypsin aus Rinderpankreas (Sigma-Aldrich) gelöst in 1 ml einer wäßrigen Lösung aus 10 mM Calciumchlorid und 1mM Salzsäure
<b>Kristallisationspuffer</b>	1.9 M Ammoniumsulfat und 50 mM MES mit verdünntem Ammoniak auf pH 5.5 (Puffer A), pH 6.0 (Puffer B) bzw. pH 6.5 (Puffer C) eingestellt
<b>Reservoirlösung</b>	2 Volumenanteile der Pufferlösung und 1 Volumenanteil Azidlösung

**Kristallisation.** Es wurden 100 µl Trypsinlösung mit 100 µl Benzamidinlösung gemischt. Die angesetzte Kristallisationslösung wurde zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. In einer Kristallisationsplatte wurden 500 µl der Reservoirlösung vorgelegt, während auf einem Deckgläschen 5 µl der Kristallisationslösung und 5 µl der Reservoirlösung vermischt wurden, bevor das Gefäß mit Deckgläschen abgeschlossen wurde



(Silikonfett zum Abdichten), so daß der Tropfen mit der Protein-Inhibitorlösung über der Reservoirlösung zu hängen kam („*hanging drop*“). Bei Raumtemperatur ließ man über Nacht äquilibrieren. Anschließend wurde die Reservoirlösung gegen 500 µl des Kristallisationspuffers ausgetauscht. Man ließ eine weitere Stunde äquilibrieren, ehe der Tropfen der Protein-Inhibitor-Lösung mit einem Impfkristall (Kantenlänge kleiner als 0.05 mm) angeimpft wurde. Ein teilweise entstandenes Präzipitat löste sich nach kurzer Zeit wieder auf.

Nach einer Woche zeigten sich bei drei verschiedenen pH-Werten (5.5, 6.0 und 6.5) Kristalle. Für das anschließende „*soaking*“ wurden die Kristalle verwendet, die bei pH 6.0 gewachsen waren, weil diese Kristalle groß genug waren und keine sichtbaren Baufehler zeigten.

**Soaking.** Es wurden 1 mg des betreffenden Inhibitors in 1 ml Erntepuffer mit Hilfe eines Ultraschallbades bei Raumtemperatur gelöst. Danach zentrifugierte man und überführte den Überstand in ein neues Gefäß. Man legte auf einem Deckgläschen 10 µl der zentrifugierten Inhibitorlösung vor, überführte einen geeigneten Trypsin-Benzamidinkristall in diese Inhibitorlösung und schloß ein Gefäß auf der Kristallierplatte, in dem 500 µl Erntepuffer vorgelegt worden waren, mit dem Deckgläschen, so daß der Tropfen durch Adhäsionskräfte gehalten über dem Erntepuffer hing („*hanging drop*“). Nach fünf Stunden wurde die Pufferlösung des Tropfens gegen neue 10 µl der zentrifugierten Inhibitorlösung ausgetauscht, ohne den Kristall austrocknen zu lassen oder zu zerstören.

**Kristallpräparation.** Innerhalb von drei Tagen wurde der so behandelte Kristall für die Datensammlung auf dem Diffraktometer verwendet. Der Kristall wurde in eine 0.5 mm dicke Kapillare eingeführt und mit Hilfe einer dünn ausgezogenen Pasteurpipette von der Pufferlösung befreit, so daß der Kristall durch Adhäsionskräfte an der Glaswand der Kapillare gehalten wurde. Gleichzeitig verblieb etwas Pufferlösung in der Kapillare, wodurch der Kristall nicht austrocknen konnte. Die beiden Enden der Glaskapillare wurden mit Wachs verschlossen.

### 6.6.2 Kokristallisation von Trypsinkomplexen

Die Trypsinkomplexe der Verbindungen **1b**, **3**, **4** und **5** wurden durch Kokristallisation der Inhibitoren mit Trypsin erhalten.

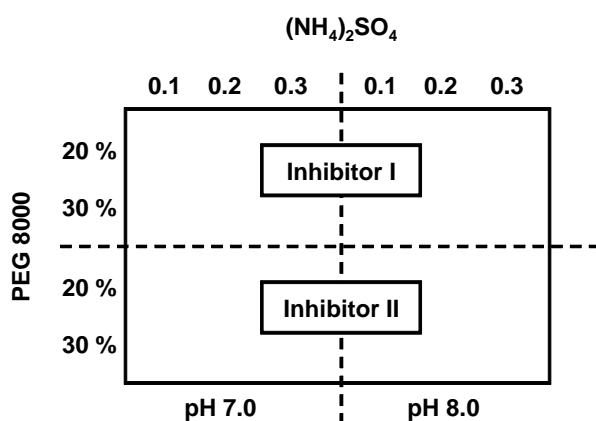
#### Lösungen.

<b>Trypsinlösung</b>	20 mg Trypsin aus Rinderpankreas (Sigma) gelöst in 1 ml einer wäßrigen Lösung aus 10 mM CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O und 1mM Salzsäure	
<b>Kristallisationspuffer</b>	0.1 M Imidazol, 0.1 M (0.2 M, 0.3 M) Ammoniumsulfat und 20 Gew-% (30 Gew-%) Polyethylenglycol 8000 mit verdünntem Ammoniak auf pH 7.0 (8.0) eingestellt, mit 0.1 % Natriumazid	
<b>Inhibitorlösungen</b>	<b>Inhibitor 1b</b>	0.5 mg Inhibitor in 10 µl Wasser und 10 µl Dimethylsulfoxid gelöst
	<b>Inhibitor 3</b> (CRC 220)	0.5 mg Inhibitor in 15 µl Wasser und 5 µl Dimethylsulfoxid gelöst
	<b>Inhibitor 4</b> (Inogatran)	0.5 mg Inhibitor in 15 µl Wasser und 10 µl Dimethylsulfoxid gelöst
	<b>Inhibitor 5</b> (Melagatran)	0.5 mg Inhibitor in 15 µl Wasser und 5 µl Dimethylsulfoxid

**Kokristallisation.** Um die optimalen Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden in den Gefäßen der Kristallisationsplatte jeweils 500 µl verschiedener Kristallisationspuffer vorgelegt. Die genaue Aufteilung auf der Platte ist in Abbildung 6.3 schematisch dargestellt.

Es wurden 50 µl Trypsinlösung und 10 µl Inhibitorlösung gemischt und mit Wasser auf 100 µl Lösungsvolumen aufgefüllt. Auf einem Deckgläschen mischte man anschließend 5 µl dieser neuen Lösung mit 5 µl der jeweiligen Bodenlösung und verschloß das Gefäß so mit diesem Deckgläschen, daß der Tropfen mit der Trypsin-Inhibitor-Lösung über der Bodenlösung zu hängen kam („*hanging drop*“).

Nach einer Woche zeigten sich bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (7.0 bzw. 8.0) Kristalle. Während bei den Bodenlösungen mit 20 % Polyethylenglykol nur vereinzelt kleinere Kristalle wuchsen, zeigten sich bei den Lösungen mit 30 % Polyethylenglykol Kristalle, die keine sichtbaren Baufehler hatten und für die anschließende Röntgenstrukturanalyse geeignet waren. Für die Kristallstrukturbestimmung wurden folglich Kristalle verwendet, die in Gegenwart von 30 % Polyethylenglykol gewachsen waren.



**Abbildung 6.3:** Schematische Aufteilung der Kristallisationsplatte für die Kokristallisation von Trypsin. Von links nach rechts wird die molare Konzentration von Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und von oben nach unten die molare Konzentration von Polyethylenglykol (PEG 8000) in der Bodenlösung variiert. Die Imidazolkonzentration wird konstant gehalten, während auf der linken Hälfte pH 7.0 und auf der rechten Hälfte der Platte pH 8.0 eingestellt ist. Durch diese Plattenaufteilung ist es möglich zwei unterschiedliche Trypsin-Inhibitor-Komplexe auf einer Platte zu kristallisieren.

**Kristallpräparation.** Kristalle ohne sichtbare Baufehler wurden in eine 0.5 mm dicke Kapillare aufgenommen und mit Hilfe einer dünn ausgezogenen Pasteurpipette von der Pufferlösung befreit, so daß der Kristall durch Adhäsionskräfte an der Glaswand der Kapillare gehalten wurde. Gleichzeitig verblieb etwas Pufferlösung in der Kapillare, damit der Kristall nicht austrocknen konnte. Die beiden Enden der Glaskapillare wurden mit Wachs verschlossen.

## 6.7 Röntgenstrukturanalyse

Die Beugungsbilder wurden auf einem Meßplatz der Firma MSC (Texas, USA) aufgenommen. Die Glaskapillare mit dem Kristall montierte man auf dem Goniometerkopf und justierte diesen so im Röntgenstrahl, 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 Drehanode aus Kupfer verwendet. Die Spannung der Röntgenröhre betrug 50 kV bei 100 mA. Die Cu-K $\alpha$  Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ) wurde durch Nickel-Platin-Doppelspiegel monochromatisiert. Der Flächendetektor war ein RAXIS-IV Bildplattensystem („*image plate*“) mit zwei Bildplatten zur Aufnahme der Beugungsbilder. Der Abstand zwischen Kristall und Flächendetektor betrug bei allen Messungen 100 Millimeter.

Das Röntgengerät wurde durch die UNIX-Software RIGAKU R-AXIS Control Program MSC Release Version 4.3.1 angesteuert. Die Aufnahmezeiten für ein Beugungsbild betragen zwischen 5 und 10 Minuten. Dabei wurde der Kristall für eine Aufnahme jeweils um  $1^\circ$  gedreht.

Die Prozessierung der Daten erfolgte mittels des HKL Package Version 1.9x, das die Programme XDisplayF, DENZO und SCALEPACK beinhaltet (Otwinowski & Minor, 1997). Die Beugungsbilder wurden mit XDisplayF visualisiert. Die Datenreduktion und –integration der einzelnen Beugungsbilder wurde mit DENZO durchgeführt, während die Skalierung und

Zusammenführung („*global refinement*“) der mit DENZO erzeugten Dateien mittels SCALEPACK erfolgte.

Die Berechnung der Strukturamplituden aus den von SCALEPACK prozessierten Intensitäten wurde mit dem Programmpaket CCP4 Version 3.4 (CCP4, 1994) durchgeführt.

Für die Strukturverfeinerung wurde XPLOR Version 3.851 (Brünger, 1992) verwendet. Die Inhibitorstrukturen wurden in SYBYL Version 6.6 (Tripos Inc., St. Louis, USA) aufgebaut und minimiert. Das Strukturmodell wurde mit dem Programm O Version 6.2.1 (Jones *et al.*, 1991) aufgebaut und sukzessive mit XPLOR verfeinert.

Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte auf Basis des Topologiefiles TOPHCSDX.PRO und des Parameterfiles PARHCSDX.PRO (Engh & Huber, 1991), die die Originalfiles (TOPH19X.PRO und PARAM19X.PRO) von XPLOR ersetzen. Für die Wasserparameter verwendete man das Parameterfile PARAM19.SOL.

Als Startstrukturen für die Trypsinkomplexe wurden folgende veröffentlichte Strukturen verwendet:

Für **1cMe**, **1d** und **1dAc**: PDB Code 1MTS (Stubbs *et al.*, 1995)

Für **4** und **5**: Struktur **3A** aus Renatus *et al.* (1998)

Für **1b** und **3**: Struktur **5aB** aus Renatus *et al.* (1998)

Die Koordinaten von sämtlichen hier beschriebenen Kristallstrukturen sind als elektronisches Datenmaterial verfügbar.

**Vergleich der Röntgenstrukturen.** Der direkte Vergleich der Trypsinkomplexe erfolgte durch die Kleinste-Quadrate-Überlagerung aller Atome der Aminosäuren Histidin 57, Aspartat 102, Aspartat 189 und Serin 195. Die Modellierung des Bindungsmodus von Inhibitoren in Thrombin, von denen nur die Trypsinkomplexe röntgenkristallographisch gelöst wurden, erfolgte nach dem gleichen Protokoll. Bei dieser Übertragung der Inhibitoren in Thrombin ergaben sich keine Kollisionen zwischen den Inhibitoratomen und den Atomen des Thrombins.

	<b>1cMe</b>	<b>1d</b>	<b>1dAc</b>
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a (Å)	62.9	63.3	63.5
b (Å)	68.9	68.8	68.9
c (Å)	63.6	63.7	63.8
α (deg)	90	90	90
β (deg)	90	90	90
γ (deg)	90	90	90
Auflösung (Å)	2.2	2.5	2.2
R-Faktor (%)	16.8	16.7	16.3
gemessene Reflexe	101490	123027	74045
unabhängige Reflexe	14388	11273	12028
Vollständigkeit (%)	98.4	76.7	81.4
R <sub>merge</sub> (%)	13.0	11.0	22.1
#Atome (Protein)	1629	1629	1629
Ionen	Ca <sup>2+</sup> ,SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Ca <sup>2+</sup> ,SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Ca <sup>2+</sup> ,SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
#Atome (Wasser)	115	106	127
#Atome (Inhibitor)	37	33	36
RMS (Bindungslängen)	0.008	0.007	0.007
RMS (Winkel)	1.801	1.711	1.672

**Tabelle 6.1:** Statistik für Röntgenstrukturen von Trypsinkomplexen, die durch „soaking“ nach der Kristallisationsvorschrift aus Kapitel 6.6.1 erhalten wurden. #Atome: Nicht-Wasserstoffatome pro asymmetrischer Einheit.

	<b>1b</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a (Å)	54.9	54.8	55.2	55.6
b (Å)	58.9	58.3	55.2	55.6
c (Å)	67.1	67.3	109.7	110.2
$\alpha$ (deg)	90	90	90	90
$\beta$ (deg)	90	90	90	90
$\gamma$ (deg)	90	90	120	120
Auflösung (Å)	2.2	2.0	2.0	1.9
R-Faktor (%)	16.5	16.8	16.5	17.0
gemessene Reflexe	94190	154539	109363	146307
unabhängige Reflexe	11422	14371	12832	15363
Vollständigkeit (%)	98.6	94.8	93.9	94.7
R <sub>merge</sub> (%)	11.1	14.7	7.1	12.0
#Atome (Protein)	1629	1629	1629	1629
Ionen	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
#Atome (Wasser)	145	140	179	180
#Atome (Inhibitor)	36	42	31	31
RMS (Bindungslängen)	0.007	0.008	0.008	0.007
RMS (Winkel)	1.719	1.842	1.833	1.789

**Tabelle 6.2:** Statistik für Röntgenstrukturen von Trypsinkomplexen, die durch Kokristallisation nach der Kristallisationsvorschrift aus Kapitel 6.6.2 erhalten wurden. #Atome: Nicht-Wasserstoffatome pro asymmetrischer Einheit.

## 6.8 Kalorimetrische Messungen

### Puffer.

<b>HEPES-Puffer</b>	50 mM Hepes, 100mM Natriumchlorid, 0.1 % PEG 8000, mit verdünnter Natronlauge auf pH 7.8 eingestellt
<b>Pyrophosphat-Puffer</b>	50 mM tetra-Natriumpyrophosphat Decahydrat, 100mM Natriumchlorid, 0.1 % PEG 8000, mit verdünnter Salzsäure auf pH 7.8 eingestellt
<b>TRICINE-Puffer</b>	50 mM Tricine , 100mM Natriumchlorid, 0.1 % PEG 8000, mit verdünnter Natronlauge auf pH 7.8 eingestellt
<b>TRIS-Puffer</b>	50 mM TRIS , 100mM Natriumchlorid, 0.1 % PEG 8000, mit verdünnter Salzsäure auf pH 7.8 eingestellt

**Gerät.** Alle Messungen wurden mit dem isothermen Titrationskalorimeter MCS-ITC von MicroCal (Northampton, USA) durchgeführt (Wiseman *et al.*, 1989). Das Volumen der Meßzelle betrug 1.3513 ml. Gesteuert wurde das Gerät mit der WINDOWS<sup>TM</sup>-Software MicroCal OBSERVER.

Die Spritzen für die Messung 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 Reaktanden in der Meßzelle zu gewährleisten. Die Meßzelle wurde mit langnadeligen Hamilton-Spritzen gefüllt, die vor jeder Benutzung gründlichst mit Aceton gespült und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet wurden. Am Ende des Tages wurde die Meßzelle zuerst mit 100 ml 1%-iger TritonX100-Lösung und anschließend mit einem Liter Wasser gespült.



**Kalibrierung.** Das Kalorimeter wurde halbjährlich kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte mittels sieben elektrischer Standardpulse. Die beiden Zellen waren dabei mit Wasser gefüllt.

Nummer des Pulses	Wärmepuls ( $\mu\text{cal}/\text{sec}$ )	Dauer (sec)	Zeit zwischen den Pulsen (sec)
1	25	60	300
2	-25	60	300
3	15	60	300
4	-15	60	300
5	10	60	300
6	-10	60	300
7	25	300	600

**Tabelle 6.3:** Übersicht für die Wärmepulse zur Kalibrierung des MCS-ITC Kalorimeters.

Aus den Verhältnissen von gemessener Wärmemenge zu theoretisch erwarteter Wärmemenge für alle sieben Impulse wurde ein Mittelwert gebildet, der zur Anpassung der Kalibrierungskonstanten diente. Dabei wurde die neue Kalibrierungskonstante durch Multiplikation der alten Konstante mit diesem durchschnittlichen Verhältnis von erwarteter Wärmemenge zu gemessener Wärmemenge erhalten.

$$\text{NeueKonstante} = \text{AlteKonstante} \cdot \frac{\sum \frac{\text{erwartete Wärmemenge}}{\text{gemessene Wärmemenge}}}{7} \quad (\text{Gleichung 6.2})$$

**Allgemeine Meßvorschrift.** Soweit nichts anderes beschrieben ist, wurden die Messungen bei 25°C durchgeführt. Dazu wurde der Thermostat des Kalorimeters auf 25°C eingestellt.

Für die Messungen mit Thrombin als Protein wurden 0.2 bis 0.4 mg Thrombin eingewogen, die in 2 ml eines oben beschriebenen Standardpuffers gelöst wurden. Man entgaste die Lösung im Wasserstrahlvakuum unter Rühren und füllte diese dann blasenfrei mit einer Hamiltonspritze langsam in die Meßzelle, die vorher mit dem gleichen Puffer zweimal vorgespült worden war. Die Thrombinkonzentration betrug 1.9 bis 3.8  $\mu\text{mol/l}$ .

Für die Trypsinmessungen wurden 1.0 bis 1.2 mg eingewogen, die in 2 ml eines Standardpuffers gelöst wurden. Die Trypsinkonzentration betrug daher 18.8 bis 22.6  $\mu\text{mol/l}$ . Die weitere Probenaufbereitung entspricht der für Thrombin beschriebenen Aufbereitung.

Der zu messende Ligand wurde in demselben Standardpuffer wie das Protein gelöst und im Ultraschallbad bzw. im Wasserstrahlvakuum unter Rühren entgast.

Man zog die Spezialspritze für die kalorimetrische Messung blasenfrei mit der Ligandenlösung auf. Bei Benutzung der 250  $\mu\text{l}$  Spritze war die Konzentration des Liganden in Lösung ca. 22-fach höher als die Konzentration des Proteins in der Meßzelle, bei Benutzung der 100  $\mu\text{l}$  Spritze ca. 9-fach höher, damit die Gesamtkonzentration des Liganden (gebunden und ungebunden) in der Meßzelle am Ende der Messung zweimal größer als die Gesamtkonzentration an Protein (frei und komplexiert) war und so das Protein nach den letzten Injektionen vollständig gesättigt war. Die einzelnen Injektionsvolumina betragen für die 100  $\mu\text{l}$  Spritze 8 bis 10  $\mu\text{l}$  und für die 250  $\mu\text{l}$  Spritze 15 bis 20  $\mu\text{l}$  in Abhängigkeit von der Größe der gemessenen Wärmetönung. Als Injektionszeiten wurden jeweils die von der MicroCal OBSERVER Software vorgegebenen Werte übernommen. Die Meßzeit zwischen zwei Injektionen betrug 240 Sekunden und die Rührgeschwindigkeit 300 Umdrehungen pro Minute.

Zur Auswertung der Meßergebnisse wurde die mitgelieferte Software MicroCal ORIGIN Version 2.9 mit Auswertungsskripten für die Meßdateien verwendet. Die Anpassung der Bindungsisothermen an die Meßpunkte erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate („*least squares fit*“). Dabei wurde jede Messung dreimal durchgeführt. Für die

endgültige Bestimmung der thermodynamischen Parameter des Protein-Inhibitor-Komplexes nahm man den Durchschnitt der drei Messungen. Die Abweichung zwischen den Messungen betrug maximal 10 Prozent.

Die Wärmemenge, die durch die Verdünnung des Inhibitors entstand, lag wegen der geringen Inhibitorkonzentration unterhalb des Detektionslimit. Daher brauchte keine spezielle Korrektur bezüglich der Verdünnungswärmen zu erfolgen.

Die Verdünnungswärme für den Inhibitor wurde durch Injektion der Inhibitorlösung in die Meßzelle, in der die Pufferlösung (ohne Protein) vorlag, ermittelt. Als weitere Kontrolle dienten bei jeder Messung die Wärmemengen der letzten Injektionen, die nach vollständiger Sättigung des Proteins erfolgten.

Die Verdünnungswärme für das Protein in der Meßzelle wurde durch Injektion von Pufferlösung in die Meßzelle, in der das Protein in derselben Pufferlösung gelöst vorlag, ermittelt. Auch die Verdünnungswärme für das Protein war unterhalb der Sensitivität des Gerätes.

**Messung von Wärmekapazitätsänderungen.** Zur Bestimmung der Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_p$  durch die Komplexbildung wurden die Enthalpiewerte wie oben beschrieben bei verschiedenen Meßtemperaturen gemessen: für Thrombinmessungen bei 20, 25, 30 und 35°C, für Trypsinmessungen bei 15, 20, 25 und 30°C. Für die Messung bei 15 °C wurde das Kalorimeter mit Hilfe des Wasserbads auf 10 °C gekühlt und der Thermostat des Gerätes auf 15 °C eingestellt. Die Lösungen und Spritzen kühlte man für einige Minuten kurz vor der Messung im Kühlschrank bei etwa 5°C vor.

Der  $\Delta C_p$ -Wert wurde durch Auftragung der gemessenen Enthalpie gegen die Temperatur und anschließender linearer Regression bestimmt.

**Messungen des Protonenaustausches.** Um die Anzahl der Protonen zu messen, die während der Komplexbildung aufgenommen oder abgegeben wurden, führte man die Messungen in vier verschiedenen Standardpuffern (HEPES-, Pyrophosphat-, TRICINE- und TRIS-Puffer, siehe oben) bei konstantem pH-Wert durch.

Durch Auftragung der gemessenen Gesamthalpien gegen die Ionisierungsenthalpien der Puffersubstanzen und anschließender linearer Regression wurde aus der Steigung der resultierenden Gerade die Anzahl  $n$  der Protonen, die aufgenommen bzw. abgegeben wurden, und aus dem Achsenabschnitt der Ordinate die korrigierte Enthalpie  $\Delta H_x$  bestimmt (siehe auch Kapitel 2.3.5).

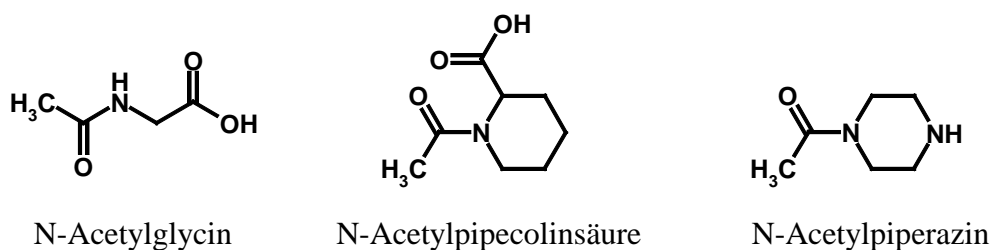
Die genauen Ionisierungsenthalpien der unterschiedlichen Puffersubstanzen wurden der Literatur entnommen.

Puffersubstanz	Ionisierungsenthalpie $\Delta H_{\text{ion}}$ (kJ/mol)	Literaturquelle
Pyrophosphat	5.12	Fukada & Takahashi, 1998
HEPES	21.07	Fukada & Takahashi, 1998
TRICINE	31.97	Fukada & Takahashi, 1998
TRIS	48.07	Christensen <i>et al.</i> , 1976

**Tabelle 6.4:** Übersicht über die verwendeten Ionisierungsenthalpien (Protonenabgabe der Puffersubstanz) mit Angabe der Literaturquelle.

**Bestimmung von Ionisierungsenthalpien.** Eine 50 mM Lösung der Modellverbindung wurde auf den pH-Wert eingestellt, der dem  $\text{pK}_a$ -Wert der Verbindung entsprach (Kapitel 6.9). Man entgaste die Lösung und legte diese in der Meßzelle des ITC-Gerätes vor. Anschließend wurden mit der 100  $\mu\text{l}$  Spritze 10 Aliquote je 10  $\mu\text{l}$  Volumen einer 1 mM Salzsäure injiziert. Aus den gemessenen Enthalpien je Injektion bildete man den Mittelwert. Zur Bestimmung der Verdünnungsenthalpie injizierte man die 1 mM Salzsäure nach dem gleichen Protokoll in eine mit Wasser gefüllte Zelle. Die gemessene Ionisierungsenthalpie wurde danach um den Betrag der Verdünnungsenthalpie korrigiert.

Für die Korrektur der gemessenen Enthalpien um dem Wärmebeitrag, der durch die Protonierung bzw. Deprotonierung der Gruppe des Liganden entstand, wurden die Ionisierungsenthalpien von folgenden Modellverbindungen bestimmt:



**Abbildung 6.4:** Modellsubstanzen für die Messung der Ionisierungsenthalpien der Inhibitoren **1b**, **1d** und **2**. Die Substanz N-Acetylpipecolinsäure wurde nach einer Vorschrift von Zalucky et al. (1995) aus Pipecolinsäureethylester synthetisiert.

N-Acetylglycin diente als Modellsubstanz für die Säuregruppe von **2** (Napsagatran), N-Acetylpipecolinsäure als Modell für die Carboxylatgruppe von **1b** und N-Acetylpiperazin als Modellverbindung für die sekundäre Aminogruppe von **1d**.

Modellverbindung	pK <sub>a</sub> -Wert	Ionisierungsenthalpie ΔH <sub>i</sub> (kJ/mol)
N-Acetylglycin	3.31±0.04	0.84±0.34
N-Acetylpipecolinsäure	3.45±0.01	2.26±0.56
N-Acetylpiperazin	8.10±0.01	35.16±0.98

**Tabelle 6.5:** Drei Modellverbindungen für die Bestimmung von Ionisierungsenthalpien in einer Übersicht. Die pK<sub>a</sub>-Werte wurden entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 6.9 gemessen.

**Sonstige Messungen.** Messungen in anderen als den oben beschriebenen Standardpuffern wurden entsprechend der allgemeinen Meßvorschrift durchgeführt. Die Pufferzusammensetzungen werden explizit in den betreffenden Kapiteln dieser Arbeit beschrieben.

## 6.9 Potentiometrische Messungen

Die Messung der Ionisierungskonstanten ( $pK_a$ -Werte) erfolgte mit dem potentiometrischen Titrationsmeßgerät PCA 101 der Firma Sirius Analytical Instruments (Forest Row, England). Die Silber-Silberchlorid-Elektrode wurde mittels pH 7-Phosphatpuffer als Standard und der FOUR PLUS<sup>TM</sup> Standardisierung (Avdeef & Bucher, 1978) von Sirius Analytical Instruments (Forest Row, England) täglich vor Beginn der Messungen kalibriert. Die genaue Konzentration der verwendeten 0.5 M Kalilauge wurde durch dreifache Titration gegen den Standard Kaliumhydrogenphthalat ermittelt. Anschließend bestimmte man die genaue Konzentration der 0.5 M Salzsäure durch Titration gegen die eingestellte Kalilauge.

Die zu messende Substanz löste man in 0.15 M Kaliumchloridlösung, so daß die Konzentration der Substanz in Lösung etwa 1mM oder höher war. Nachdem ein niedriger pH-Wert mit 0.5 M Salzsäure eingestellt worden war, wurde mit der eingestellten 0.5 M Kalilauge in Richtung höherer pH-Werte titriert und so eine Titrationskurve aufgenommen. Alle Messungen wurden bei 25°C und unter einer Argonschutzgasatmosphäre durchgeführt.

Die mitgelieferte WINDOWS<sup>TM</sup>-Software pKalogP prozessierte die Daten durch Kurvenanpassung an die Bjerrum-Differenzkurve (Avdeef *et al.*, 1982) mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Alle Werte wurden dreifach gemessen, um die Mittelwerte zu berechnen. Der Meßfehler betrug maximal 0.02 Einheiten.

## 6.10 Berechnung der Oberflächen

Bei allen berechneten Oberflächen in dieser Arbeit handelt es sich um lösungsmittelzugängliche Oberflächen („*Connolly surfaces*“, „*solvent accessible surfaces*“). Für die Berechnung der Connolly-Oberflächen durch das Programm MS (Connolly, 1983) wurde ein Probenradius von 1.5 Å benutzt.

Der Anteil der polaren Oberfläche beinhaltet alle Sauerstoff- und Stickstoffatome mit den an ihnen gebundenen Wasserstoffatomen, während sich der nicht-polare Oberflächenanteil aus der Differenz von Gesamtoberfläche und polarem Oberflächenanteil ergibt. 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 Bondi (1968) entnommen.

## 7 LITERATUR

- Andrews, P. R., Craik, D.J. & Martin, J.L. (1984). Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **27**, 1648-1657.
- Avdeef, A. & Bucher, J.J. (1978). Accurate measurements of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: calibrations using the Prideaux and other universal buffer solutions and a computer-controlled automatic titrator. *Anal. Chem.* **50**, 2137-2142.
- Avdeef, A., Kearney, D.L., Brown, J.A. & Chemotti, A.R. (1982). Bjerrum plots for the determination of systematic concentration errors in titration data. *Anal. Chem.* **54**, 2322-2326.
- Ayala, Y. & DiCera, E. (1994). Molecular recognition by thrombin. Role of slow-fast transition, site-specific ion binding energetics and thermodynamic mapping of structural components. *J. Mol. Biol.* **235**, 733-746.
- Ayala, Y. M., Vindigni, A., Nayal, M., Spolar, R., Record, M.T. & DiCera, E. (1995). Thermodynamic investigations of hirudin binding to the slow and fast forms of thrombin: Evidence for folding transitions in the Inhibitor and protease coupled to binding. *J. Mol. Biol.* **253**, 787-798.
- Baker, B. M. & Murphy, K.P. (1996). Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* **71**, 2049-2055.
- Bergner, A., Bauer, M., Brandstetter, H., Stürzebecher, J. & Bode, W. (1995). The X-ray crystal structure of thrombin in complex with N- $\alpha$ -2naphthylsulfonyl-L-3amidino-phenylalanyl-4-methylpiperidide: the beneficial effect of filling out an empty cavity. *J. Enzyme Inhib.* **9**, 101-110.
- Berliner, L. J. (1992). *Thrombin: Structure and function*, Plenum Press, New York, USA.
- Blokzijl, W. & Engberts, J.B.F.N. (1993). Hydrophobe Effekte - Ansichten und Tatsachen. *Angew. Chem.* **105**, 1610-1648.
- 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 the significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion. *EMBO J.* **8**, 3467-3475.



- 
- Bode, W., Turk, D. & Stürzebecher, J. (1990). Geometry of binding of the benzamidine- and arginine-based inhibitors NAPAP and MQPA to human  $\alpha$ -thrombin. X-ray crystallographic determination of the NAPAP-trypsin complex and modeling of NAPAP-thrombin and MQPA-thrombin. *European Journal of Biochemistry* **193**, 175-182.
- 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, structure-function relationships. *Protein Sci.* **1**, 426-471.
- Bode, W. & Stubbs, M.T. (1995). Die Raumstruktur des Thrombins: ein Wegweiser zu seinen vielfältigen Funktionen. *Hämostasologie* **15**, 1-13.
- Böhm, H. J. & Klebe, G. (1996). Was läßt sich aus der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen? *Angew. Chem.* **108**, 2750-2778.
- Bondi, A. (1968). *Physical properties of molecular crystals, liquids and glasses*, John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Brandstetter, H., Turk, D., Hoeffken, H.W., Grosse, D., Stürzebecher, J., Martin, P.D., Edwards, B.F.P. & Bode, W. (1992). Refined 2.3 Å X-ray crystal structure of bovine thrombin complexes formed with the benzamidine and arginine-based thrombin inhibitors NAPAP, 4-TAPAP and MQPA. *J. Mol. Biol.* **226**, 1085-1099.
- Brünger, A. (1992). *X-PLOR (Version 3.1). A system for X-ray crystallography and NMR*, Yale University Press, New Haven, USA.
- CCP4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst. Section D* **50**, 760-763.
- 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.
- 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. *Biochem.* **29**, 6108-6114.
- Connelly, P. R. & Thompson, 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**, 4781-4785.

- 
- Connelly, P. R. (1994). Acquisition and use of calorimetric data for prediction of the thermodynamics of ligand-binding and folding reaction of proteins. *Curr. Opin. Biotech.* **5**, 381-388.
- Connolly, M. L. (1983). Solvent accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* **221**, 709-713.
- Dang, Q.D. & DiCera, E. (1996). Residue 225 determines the Na<sup>+</sup>-induced allosteric regulation of catalytic activity in serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10653-10656.
- Davies, T. G., Hubbard, R.E. & Tame, J.R.H. (1999). Relating structure to thermodynamics: The crystal structures and binding affinity of eight OppA-peptide complexes. *Protein Sci.* **8**, 1432-1444.
- DiCera, E., Guinto, E.R., Vindigni, A., Dang, Q.D., Ayala, Y.M., Wuyi, M. & Tulinsky, A. (1995). The Na<sup>+</sup> binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.* **270**, 22089-22092.
- Dixon, M. (1953). Determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* **1953**, 170-171.
- Dotz, J. (1995). Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: von Hirudin zu Hirudinmimetica. *Angew. Chem.* **107**, 948-962.
- Doyle, M. L. (1997). Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Biotech.* **8**, 31-35.
- Dunitz, J. D. (1994). The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules. *Science* **264**, 670.
- Edsall, J. T. (1935). Apparent molal heat capacities of amino acids and other organic compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1506-1507.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure-refinement. *Acta Cryst. Section A* **47**, 392-400.
- Fischer, E. (1894). Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **27**, 2985-2992.
- Fukada, H. T., K. (1998). Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Prot. Struct. Funct. Gen.* **33**, 159-166.
- Furton, J. (1972). Human thrombins: production, evaluation and peptide of a-thrombin. *J. Biol. Chem.* **252**, 2587-3598.

- 
- Glusker, J. P., Lewis, M. & Rossi, M. (1994). *Crystal structure analysis for chemists and biologists*, VCH, Weinheim, Deutschland.
- Gómez, J. & Freire, E. (1995). Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin. *J. Mol. Biol.* **252**, 337-350.
- Guinto, E. R. & DiCera, E. (1996). Large heat capacity change in a protein-monovalent cation interaction. *Biochem.* **35**, 8800-8804.
- Guinto, E. R. & DiCera, E. (1997). Critical role of W60d in thrombin allostery. *Biophys. Chem.* **64**, 103-109.
- Gustafsson, D., Antonsson, T., Bylund, R., Eriksson, U., Gyzander, E., Nilsson, I., Elg, M., Mattsson, C., Deinum, J., Karlsson, O., Nilsson, A. & Sörensen, H. (1998). Effects of melagatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, on thrombin and fibrinolytic enzymes. *Thromb. Haemost.* **79**, 110-118.
- Ha, J.-H., Spolar, R.S. & Record, M.T. (1989). Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *J. Mol. Biol.* **209**, 801-816.
- Hauptmann, J. & Stürzebecher, J. (1999). Synthetic inhibitor of thrombin and factor Xa: From bench to bedside. *Thromb. Res.* **93**, 203-241.
- Hilpert, K., Ackermann, J., Banner, D.W., Gast, A., Gubernator, K., Hadvary, P., Labler, L., Müller, K., Schmid, G., Tschopp, T.B. & van de Waterbeemd, H. (1994). Design and synthesis of potent and highly selective thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.* **37**, 3889-3901.
- Hyre, D. E. & Spicer, L.D. (1995). Thermodynamic evaluation of binding interactions in the methionine repressor system of *E. coli* using isothermal titration calorimetry. *Biochem.* **34**, 3212-3221.
- Inoue, M., Yamada, H., Yasukochi, T., Kuroki, R., Miki, T., Horiuchi, T. & Imoto, T. (1992). Multiple role of hydrophobicity of tryptophan-108 in chicken lysozyme: Structural stability, sacciride binding ability, and abnormal pKa of glutamic acid-35. *Biochem.* **31**, 5545-5553.
- Jones, T. A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building rotein models in electron density maps and location of errors in these models. *Acta Cryst.* **5**, 802-810.
- Kézdy, F. J. & Kaiser, E.T. (1970). Principles of active site titration of proteolytic enzymes. *Meth. Enzym.* **19**, 3-27.

- 
- Kimball, S. D. (1995). Challenges in the development of orally bioavailable thrombin active site inhibitors. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **6**, 511-519.
- Krem, M. M. & DiCera, E. (1998). Conserved water molecules in the specificity pocket of serine proteases and the molecular mechanism of Na<sup>+</sup> binding. *Prot. Struct. Funct. Gen.* **30**, 34-42.
- Ladbury, J. E., Wright, J.G., Sturtevant, J.M. & Sigler, P.B. (1994). A thermodynamic study of the *trp* repressor-operator interaction. *J. Mol. Biol.* **238**, 669-681.
- 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.
- Ladbury, J. E. & Chowdhry, B.Z. (1998). *Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences*, John Wiley & Sons, Chicester, England.
- Lai, M.-T., DiCera, E. & Shafer, J.A. (1997). Kinetic pathway for the slow to fast transition of thrombin. *J. Biol. Chem.* **48**, 30275-30282.
- Langsetmo, K., Fuchs, J.A. & Woodward, C. (1991a). The conserved, buried aspartic acid in oxidized *E. coli* thioredoxin has a pK<sub>a</sub> of 7.5. Its titration produces a related shift in global stability. *Biochem.* **30**, 7603-7609.
- Langsetmo, K., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Sharp, K.A. (1991b). Linkage of thioredoxin stability to titration of ionizable groups with perturbed pK<sub>a</sub>. *Biochem.* **30**, 7609-7614.
- Liu, Y. & Sturtevant, J. M. (1995). Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. II. *Prot. Sci.* **4**, 2559-2561.
- Livingstone, J. R., Spolar, R.S. & Record, M.T. (1991). Contribution of the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area. *Biochem.* **30**, 4237-4244.
- Massa, W. (1996). *Kristallstrukturbestimmung*, Teubner-Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- 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.
- Morrison, J.E. & Stone, S.R. (1985) Approaches to the study and analysis of the inhibition of enzymes by slow- and tight-binding inhibitors. *Comments Mol. Cell. Biophys.* **2**, 347-368

- 
- Murphy, K. P. & Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behaviour in proteins. *Adv. Protein Sci.* **43**, 313-361.
- Naghibi, H., Tamura, A. & Sturtevant, J.M. (1995). Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5597-5599.
- Nayal, M. & DiCera, E. (1996). Valence screening of water in protein crystals reveals potential Na<sup>+</sup> binding sites. *J. Mol. Biol.* **256**, 228-234.
- Nilsson, T., Sjöling-Erickson, A. & Deinum, J. (1998). The mechanism of binding of low-molecular-weight active site inhibitors to human a-thrombin. *J. Enzyme Inhib.* **13**, 11-29.
- Obst, U. (1997). *De-novo-Design und Synthese neuartiger, nichtpeptidischer Thrombin-Inhibitoren*. Dissertation Nr. 12037, ETH Zürich, Schweiz.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzym.* **276**, 307-326.
- Privalov, P. L. & Gill, S.J. (1988). Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv. Prot. Chem.* **39**, 191-234.
- 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**, 385-391.
- 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.
- Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Stürzebecher, J. & Stubbs, M.T. (1998). Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: Implications for the inhibition of factor Xa, tPA and urokinase. *J. Med. Chem.* **41**, 5445-5456.
- Ripka, W. C. (1997). New thrombin inhibitors in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 242-253.
- Rydell, T. J., Tulinsky, A., Bode, W. & Huber, R. (1991). Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J. Mol. Biol.* **221**, 583-601.
- Schaefer, M., Sommer, M. & Karplus, M. (1997). pH-Dependence of protein stability: absolute electrostatic free energy differences between conformations. *J. Phys. Chem. B* **101**, 1663-1683.

- 
- Schaefer, M., Van Vlijmen, H.W.T. & Karplus, M. (1998). Electrostatic contributions to molecular free energies in solution. *Adv. Prot. Chem.* **51**, 1-57.
- Schechter, I. & Berger, O. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157.
- Sleigh, S. H., Seavers, P.R., Wilkinson, A.J., Ladbury, J.E. & Tame, J.R.H. (1999). Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein. *J. Mol. Biol.* **291**, 393-415.
- Spolar, R. S. & Record, M.T. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **263**, 777-784.
- Stubbs, M. T., Huber, R. & Bode, W. (1995). Crystal Structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: Structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin. *FEBS Lett.* **375**, 103-107.
- Sturtevant, J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2236-2240.
- Stürzebecher, J., Walsmann, P., Voigt, B. & Wagner, G. (1984). Inhibition of bovine and human thrombins by derivatives of benzamidine. *Thromb. Res.* **36**, 457-467.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., Wikström, P. & Vieweg, H. (1995). Structure-activity relationships of inhibitors derived from 3-amidinophenylalanine. *J. Enzyme Inhib.* **9**, 87-99.
- Suelter, C. H. (1970). Enzymes activated by Monovalent Cations. *Science* **168**, 789-795.
- Tame, J. R. H. (1999). Scoring functions: A view from the bench. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **13**, 99-108.
- Turk, D., Stürzebecher, J. & Bode, W. (1991). Geometry of the binding of the Na-tosylated piperidides of m-amidino, p-amidino and p-guanidino phenylalanine to thrombin and trypsin. X-ray crystal structures of their trypsin complexes and modeling of their thrombin complexes. *FEBS Lett.* **287**, 133-138.
- Urry, D. W., Gowda, D.C., Peng, S.Q., Parker, T.M. & Harris, R.D. (1992). Design at nanometric dimensions to enhance hydrophobic-induced pK<sub>a</sub> shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8716-8717.
- Urry, D. W., Peng, S.Q., Parker, T.M., Gowda, D.C. & Harris, R.D. (1993). Die relative Bedeutung elektrostatisch und hydrophob induzierter pK<sub>a</sub>-Verschiebungen in modellproteinen: der Asparaginsäuretest. *Angew. Chem.* **105**, 1523-1525.

- Varadarajan, R. V., Connelly, P.R., Sturtevant, J.M. & Richards, F.M. (1992). Heat capacity changes for protein-peptide interactions in the ribonuclease S system. *Biochem.* **31**, 1421-1426.
- Wells, C. M. & DiCera, E. (1992). Thrombin is a Na<sup>+</sup> activated enzyme. *Biochem.* **31**, 11721-11730.
- 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**, 131-137.
- Zalucky, T. B., Malspeis, L., Patel, H. & Hite, G. (1995). Chemistry of some 3-Benzoyl-piperidines. *J. Pharm. Sci.* **54**, 687-691.
- Zhang, E. & Tulinsky, A. (1997). The molecular environment of the Na<sup>+</sup> binding site of thrombin. *Biophys. Chem.* **63**, 185-200.

## Lebenslauf

Geburtstag:	31. Dezember 1971
Geburtsort:	Osterholz-Scharmbeck (Niedersachsen)
1978 – 1984	Grundschule und Orientierungsstufe in Hambergen
1984 – 1991	Gymnasium in Osterholz-Scharmbeck
Mai 1991	Allgemeine Hochschulreife
1992 / 1993	Grundwehrdienst
1991 – 1996	Studium der Chemie an der Universität Bremen
1992 – 1996	Stipendiat der Begabtenförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung
Juli-Dezember 1996	Anfertigung der Diplomarbeit „ <i>Synthese von donor-substituierten Chlorinen nach dem Thiadiazolinverfahren</i> “ am Institut für Organische Chemie der Universität Bremen (Betreuer: Prof. Dr. F.-P. Montforts)
Dezember 1996	Verleihung des akademischen Grades „Diplom-Chemiker“
1997 – 2000	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg (Betreuer: Prof. Dr. G. Klebe)
	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am selbigen Institut



## **Erklärung**

Ich versichere, daß ich die vorliegende Arbeit 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, im Mai 2000