

Strukturbasierte Entwicklung allosterischer Inhibitoren der Myosin Motorfunktion

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Matthias Preller

geboren am 10.03.1980 in Wolfenbüttel

2011

Referent: Prof. Dr. Dietmar J. Manstein

Korreferent: Prof. Dr. Markus Kalesse

Tag der Promotion: 28.06.2011

Erklärung:

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet

Meinen Eltern gewidmet
und für Bérénice

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2007 bis März 2011 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Dietmar J. Manstein

angefertigt. Für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit dieses am Institut für Biophysikalische Chemie zu bearbeiten und die Betreuung möchte ich mich bei Prof. Dr. Dietmar J. Manstein herzlich bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Kalesse für die Übernahme des Korreferats, sowie die Möglichkeit in seinen Laboren die chemischen Synthesen durchführen zu können.

Für die gute Zusammenarbeit am Antimalariaprojekt möchte ich Prof. Markus Kalesse und Dr. Nina Díaz-Gómez danken, sowie allen Mitgliedern im Arbeitskreis von Prof. Kalesse, die mich so gut im Labor aufgenommen haben. Insbesondere danke ich meinen Laborpartnern während dieser Zeit an der LUH, Nadine Bluhm, Olaf Hartmann und Michael Richter.

Ich bedanke mich bei Judith Straimer und Prof. Dr. Steffen Borrmann, sowie Stephan Hegge und Prof. Dr. Freddy Frischknecht für die Einführung in den Wachstumsassay und den *in vitro* Sporozoenmotilitätsassay, die Durchführung der Experimente und die Zusammenarbeit.

Bei Dr. Roman Fedorov bedanke ich mich für die gemeinsamen Fahrten zum Synchrotron und die Aufnahme von Beugungsdaten.

Für die Bereitstellung der halogenierten Pseudoline und die Kooperation möchte ich mich bei Dr. René Martin und Prof. Dr. Hans-Joachim Knölker bedanken.

Weiterer Dank gilt Dr. Nancy Adamek und Prof. Dr. Michael A. Geeves für die Zusammenarbeit am G680-Projekt.

Ich danke den Mitarbeitern der NMR-Spektroskopieabteilung der LUH, besonders Dagmar Körtje und Monika Rettstadt.

Dr. Joachim Greipel, Andreas Blaskowitz und Klaus Stieglitz danke ich für die Pflege des ComputerClusters und die Unterstützung in computertechnischen Fragen.

Für die Bereitstellung von aufgereinigten Proteinen möchte ich auch Dr. Manuel Taft (*Dd* Myosin-5b, *Dd* Myosin-1b), Krishna Chinthalapudi (*Hs* Myosin-7FN3), Dr. Sarah Heißler (*Hs* nichtmuskuläres Myosin-2a) und Dr. Daniela Kathmann (*Dd* Myosin-1e) herzlich danken.

Allen Mitgliedern der Biophysikalischen Chemie und meiner Arbeitsgruppe möchte ich für die gemeinsame Zeit danken. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Krishna Chinthalapudi, Anne Hennig, Dr. Sarah Heißler, Dr. Mirco Müller, Jayashankar Selvadurai, Dr. Lena Schaal, Gunnar Weninger, Dr. Amrita Rai und Christian Waßmann für die fachliche und private Bereicherung. Zudem möchte ich meinem Laborpartner Krishna Chinthalapudi

meinen speziellen Dank ausdrücken, für die vielen Diskussionen, die Ratschläge und Hilfeleistung, und die Freundschaft.

Herzlich danken möchte ich Dr. Mirco Müller und Tobias Preller für das kurzfristige und sorgfältige Korrekturlesen.

Mein größter Dank geht an meine Familie, meine Eltern und Brüder, die mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben, für die stete Unterstützung, das Interesse an meiner Arbeit, den Rückhalt und die Geduld.

Ein ganz besonderer Dank gilt zudem Bérénice, für das unverwüsthche mir entgegengebrachte Vertrauen, die Ermutigung, Unterstützung und den Beistand während der Promotion und in allen Lebenslagen.

„Merkwürdig ist es immer, dass all diejenigen, die diese Wissenschaft ernstlich studieren, eine Art Leidenschaft dafür fassen.“

Carl Friedrich Gauß, 1808

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen bekannter allosterischer Modulatoren der Myosinfunktion durch den kombinierten Einsatz kristallographischer, biophysikalischer und computerchemischer Methoden untersucht. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse dienen der rationalen, strukturbasierten Entwicklung neuer allosterischer Inhibitoren der infektionsrelevanten Myosin-Motoraktivität des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum*.

Die Myosinaktivität ist für viele biologische Funktionen von entscheidender Bedeutung. Mitglieder dieser Superfamilie molekularer Motoren sind an einer Vielzahl verschiedener Bioprozesse beteiligt. Das Fehlverhalten bestimmter Myosinisoformen steht im Zusammenhang mit der Ausbildung schwerer Erkrankungen, wie der Entstehung und Verbreitung von Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, oder Störungen der Sinnesorgane und des zentralen Nervensystems. Demzufolge besitzt die gezielte Aktivierung oder Inhibition bestimmter Myosinisoformen ein großes therapeutisches Potential. Um Einsicht in die atomaren Details der Wirkungsweise von Myosineffektoren und die allosterische Beeinflussung der Myosinfunktion zu erhalten, wurden die Mechanismen bekannter allosterischer Effektoren am Modellsystem *Dd* Myosin-2 untersucht. Zu den getesteten Modulatoren gehört die kürzlich als potente Inhibitoren der Myosinaktivität identifizierte Gruppe der halogenierten Pseudiline, der Ca^{2+} -Sensitizer EMD 57033, sowie die G680-Punktmutation in der Myosin-Motordomäne. Während die G680-Mutation zur Entkopplung der reaktiven Thiolregion vom Rest des Motorsystems führt, wodurch das Myosin in einem spezifischen Zustand des chemomechanischen Zyklus' gefangen gehalten wird, entfalten die halogenierten Pseudiline ihre Wirkung durch einen direkten Signalrelaismechanismus, der schließlich in der allosterischen Beeinflussung des aktiven Zentrums resultiert, sowie durch das Herabsetzen der globalen, intrinsischen Flexibilität der Myosin-Motordomäne. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen der halogenierten Pseudiline deckten zudem den Einfluss der Halogensubstituenten auf die inhibitorische Wirkung auf und gaben Aufschluss über die entropischen und enthalpischen Beiträge zur Aktivität. Der Fluoreszenzfarbstoff Prodan hingegen besitzt keine inhibitorische Aktivität und zeigte keine Veränderungen der Myosinstruktur, obwohl er an die gleiche Bindungstasche bindet, wie die Pseudiline. Kristallographische Studien des inotropen Ca^{2+} -Senzitizers EMD 57033 führten zur Identifizierung einer neuen, bisher nicht bekannten Bindungsstelle in der N-terminalen Domäne der Myosin-Motordomäne. Die Bindung von EMD 57033 an diese Bindungsstelle erhöht wahrscheinlich die Spannung im Myosin und führt so zu einem Anstieg der erzeugten Kraft des Motors.

Die Translation der Erkenntnisse auf die rationale *de novo* Entwicklung neuer Inhibitoren des parasitären *Pf* Myosin A führte zur erfolgreichen Darstellung potenter und vielversprechender Myosininhibitoren mit antiparasitärer und Antimalariaaktivität. Die biomimetisch synthetisierten Substanzen wiesen eine inhibitorische Aktivität auf die enzymatische ATPase- und Motoraktivität von Myosin auf und zeigten sowohl gegen Leber- als auch Blutstadien des Malariaparasiten eine hemmende Wirkung.

Schlüsselwörter: Myosin, Strukturbasiertes *De Novo* Design, Allosterische Effektoren

Abstract

The present study deals with the analysis of known allosteric modulators of the myosin function and their mode of action by applying a combination of crystallographic, biophysical and computational approaches. The insights and concept derived from these studies are used for the rational, structure-based drug design of novel allosteric inhibitors against the myosin motor activity of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

Myosin activity is crucial for many biological functions. Members of the superfamily of molecular motors participate in a large number of bioprocesses. The malfunction of certain myosins can lead to severe diseases such as cancer, cardiovascular failure, and disorders of sensory organs and the central nervous system. Therefore, the activation or inhibition of specific myosin isoforms holds a strong therapeutic potential. To gain insights into the mechanisms of myosin effectors and the allosteric modulation at an atomic level, the effects of known allosteric modulators on the model system *Dd* myosin-2 are analyzed. The tested effectors include the congeneric series of halogenated pseudilin that were recently identified to exhibit a high inhibitory potency on myosin, the Ca^{2+} -sensitizer EMD 57033, and the G680 single point mutation in the myosin motor domain. While the G680 mutation leads to a decoupling of the reactive thiol region from the rest of the engine, which in turn traps the myosin in a certain state of the chemomechanical cycle, the halogenated pseudilins act via a direct signal relay mechanism, which influences the active site in an allosteric manner, as well as by reducing the global intrinsic flexibility of the myosin motor domain. Furthermore, structure-activity relationship studies revealed the influence of the different halogen substituents on the inhibitory activity and gave information about the entropic and enthalpic contributions to pseudilin action. In contrast, the fluorescent dye prodan exhibits no inhibitory potency and showed no changes in myosin structure, despite the fact, that it binds to the same binding pocket as the halogenated pseudilins. Crystallographic analysis of the inotropic Ca^{2+} -sensitizer EMD 57033 revealed a new, previously unknown binding site in the N-terminal domain of the myosin motor domain. Binding of EMD 57033 to that particular site presumably increases the strain in the myosin and leads to an increased active force of the motor.

Translation of the findings with the model system to the rational *de novo* design of novel inhibitors of the parasitic *Pf* Myosin A, leads to the successful development of potent and promising myosin inhibitors with antiparasitic and antimalarial activity. The biomimetically synthesized compounds showed an inhibitory potency on the enzymatic ATPase and motor activity of isolated myosins, as well as inhibitory effects on both, the liver and blood stages of the malaria parasite.

Keywords: Myosin, Structure-based *De Novo* Design, Allosteric Effectors

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
COSY	korrelierte Spektroskopie
<i>Dd</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DMSO	<i>N,N</i> -Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)- <i>N,N</i> -tetraessigsäure
ELC	essentielle leichte Kette
ESI	Elektrospray-Ionisation
F-Aktin	filamentöses Aktin
<i>Gg</i>	<i>Gallus gallus</i> (Huhn)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMM	schweres Meromyosin
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i> (Mensch)
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
L50 kDa	untere 50 Kilodalton Domäne
LCBR	Bindungsregion der leichten Ketten
LDH	Laktatdehydrogenase
LIE	<i>linear interaction energy</i>
LMM	leichtes Meromyosin
M1b-2R-YFP	Myosin-1 mit künstlichem Hebelarm, bestehen aus 2 α -Aktininrepeats und dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP)
M765-SSB	Myosin-2 mit einer Länge von 765 Aminosäuren und C-terminalem SSB- <i>tag</i>
M7FN3	Myosin-7 mit einem C-terminalem Fibronectinfragment
MD	Moleküldynamik
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHC	Myosin schwere Kette
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert
Ni-NTA	Nickel-Nitrilacetat
NM-2a	nichtmuskuläres Myosin-2a
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PBP	Pentabrompseudilin
PCA	Hauptkomponentenanalyse

PCIP	Pentachlorpseudilin
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
P _i	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvatkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
QH	quasiharmonische Näherung
RLC	regulatorische leichte Kette
RMSD	mittlere quadratische Abweichung
RMSF	mittlere quadratische Fluktuationen
S1	Subfragment-1
S2	Subfragment-2
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSB	<i>single-stranded DNA-binding protein</i>
TBDCIP	Tribromdichlorpseudilin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TLCK	<i>N</i> _α -Tosyl-L-lysinchloromethylketon·Hydrochlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin B-isothiocyanat
U50 kDa	obere 50 Kilodalton Domäne

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Myosine – Molekulare Motoren	1
1.1.1 Struktureller Aufbau der Myosin-Motordomäne.....	6
1.1.1.1 Der ATPase-Zyklus	9
1.1.1.2 Die Aktinbindungsregion	11
1.1.1.3 Die Nukleotidbindungsstelle / Das aktive Zentrum	13
1.1.1.4 Der Konverter	15
1.1.2 Intrinsische Allosterie.....	16
1.1.3 Allosterische Inhibitoren der Myosin-Motoraktivität	17
1.2 Malaria und Apicomplexa Parasiten	20
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	20
1.2.2 Der Erreger – Apicomplexa	21
1.2.2.1 <i>Pf</i> Myosin A.....	24
1.2.3 Bekannte Antimalaria-Wirkstoffe.....	24
1.3 Zielsetzung.....	29
2. Material und Methoden.....	31
2.1 Materialien	31
2.1.1 Chemikalien.....	31
2.1.2 Geräte.....	33
2.1.3 Enzyme	33
2.1.4 Antikörper	34
2.1.5 Organismen	34
2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.2.1 UV-spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	34
2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.2.3 Präparative Aufreinigung von <i>Dictyostelium discoideum</i> Myosin-2.....	35
2.2.4 Präparation von F-Aktin	37
2.3 Organisch-chemische Methoden	38
2.3.1 Lösemittel.....	38
2.3.2 Instrumentelle Analytik	38
2.3.3 Synthese der Verbindungen.....	39
2.3.3.1 Darstellung von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (1)	39
2.3.3.2 Darstellung von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (3)	40
2.3.3.3 Darstellung von Bis(pyridin-3-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxybiphenyl-3,3'-diyl)diacetat (8)	41
2.3.3.4 Darstellung von Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis(benzyloxy)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (10)	42
2.3.3.5 Darstellung von Di- <i>tert</i> -butyl-4,4'-(2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-bis(acetyl))-bis-(piperazine-1-carboxylat) (13).....	43
2.3.3.6 Darstellung von Bis(naphthalen-1-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (15)	44
2.3.3.7 Darstellung von Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidat-Hydrochlorid (17).....	46
2.3.3.8 Darstellung von <i>N</i> -Benzyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidamid-Hydrochlorid (19)	46

2.3.3.9	Darstellung von 2,2'-(6,6'-Dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetonitril (20)	47
2.3.3.10	Darstellung von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetimidat (21) ..	48
2.3.3.11	Darstellung von 2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(<i>N</i> -benzylacetimidamid) (22)	49
2.4	Biophysikalische Methoden.....	49
2.4.1	Proteinkristallographie	49
2.4.1.1	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von <i>Dd</i> Myosin-2·ADP·VO ₃ · 33 (TBDCIP) .	52
2.4.1.2	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von <i>Dd</i> Myosin-2·ADP·VO ₄ · 25 (PBP)	53
2.4.1.3	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von <i>Dd</i> Myosin-2·ADP·VO ₃ · 36 (EMD 57033).....	53
2.4.1.4	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von <i>Dd</i> Myosin-2·ADP·VO ₃ · 35 (Prodan) .	54
2.4.1.5	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung der <i>Dd</i> Myosin-2 G680A-Mutante	54
2.4.1.6	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung der <i>Dd</i> Myosin-2 G680A·ADP-Mutante ..	55
2.4.1.7	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung der <i>Dd</i> Myosin-2 G680V-Mutante	55
2.4.1.8	Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von <i>Dd</i> Myosin-2·ADP·VO ₄ · 3 (BIP1)	55
2.4.2	<i>Steady-state</i> Kinetik	56
2.4.3	<i>In vitro</i> Motilität	57
2.5	Computerchemische Methoden	59
2.5.1	Homologiemodellierung.....	59
2.5.2	Molekulares Docking.....	60
2.5.3	Moleküldynamik-Simulationen	62
3.	Ergebnisse.....	65
3.1	Strukturelle Untersuchung der Auswirkung der G680-Mutation	65
3.1.1	Thermodynamische Untersuchung der Myosin-Nukleotid-Interaktion	66
3.1.2	Strukturelle Auswirkung der G680-Mutation	70
3.1.3	Dynamische Untersuchung der G680-Mutation	73
3.2	Untersuchung von <i>Dd</i> Myosin-2 Effektoren	76
3.2.1	Struktur-Aktivitätsbeziehung halogenierter Pseudoline	76
3.2.1.1	Strukturelle Analyse	77
3.2.1.2	Struktur-Aktivitätsbeziehung.....	83
3.2.1.3	Moleküldynamik.....	84
3.2.2	Strukturelle Untersuchung des Ca ²⁺ -Sensitizers EMD 57033	88
3.2.3	Strukturelle Studien des Fluoreszenzfarbstoffes Prodan	92
3.3	<i>De Novo</i> Entwicklung von <i>Pf</i> Myosin A Inhibitoren.....	95
3.3.1	Erstellen struktureller Modelle des Zielproteins	95
3.3.2	Untersuchung der allosterischen Bindungstasche, <i>De Novo</i> Design und Docking	97
3.3.3	Synthese der Leitstrukturen	101
3.3.3.1	Synthese von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (1)	102
3.3.3.2	Synthese von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (3).....	103
3.3.3.3	Synthese von Bis(pyridin-3-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxybiphenyl-3,3'-diyl)diacetat (8) .	103
3.3.3.4	Synthese von Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis(benzyloxy)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (10)	105
3.3.3.5	Synthese von Di-tert-butyl-4,4'-(2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis-(acetyl))-bis-(piperazine-1-carboxylat) (13).....	106
3.3.3.6	Synthese von von Bis(naphthalen-1-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (15)	108
3.3.3.7	Synthese von Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidat-Hydrochlorid (17)	110

3.3.3.8	Synthese von <i>N</i> -Benzyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidamid-Hydrochlorid (19).....	111
3.3.3.9	Synthese von 2,2'-(6,6'-Dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetonitril (20).....	112
3.3.3.10	Synthese von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetimidat (21).....	113
3.3.3.11	Synthese von 2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(<i>N</i> -benzylacetimidamide) (22).....	114
3.3.4	Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen.....	115
3.3.4.1	Inhibierung der enzymatischen ATPase-Funktion.....	115
3.3.4.2	Inhibierung der Myosinmotorfunktion.....	116
3.3.4.3	Untersuchung der Antimalariaaktivität.....	118
3.3.5	Strukturelle Validierung der Bindungsstelle.....	121
4.	Diskussion.....	124
4.1	Allosterische Beeinflussung der <i>Dd</i> Myosin-2 Funktion durch G680-Mutationen.....	124
4.2	<i>Dd</i> Myosin-2 Inhibitoren.....	126
4.3	Der Ca ²⁺ -Sensitizer EMD57033.....	130
4.4	<i>De Novo</i> Entwicklung antiparasitärer Myosininhibitoren.....	131
5.	Literaturverzeichnis.....	134
6.	Anhang.....	143
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse.....	145
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	145
7.2	Tabellenverzeichnis.....	147
8.	Publikationen und Präsentationen.....	148
9.	Lebenslauf.....	150

1. Einleitung

Bewegung hat das Leben erst ermöglicht und ohne Bewegung würde es kein Leben geben. Kein Vogel würde am Himmel fliegen, kein Lebewesen auf Erden wandeln, kein Herz würde schlagen. Viele der Bewegungsprozesse, die in unserer makroskopischen Welt beobachtet werden können, werden durch das abwechselnde Kontrahieren und Entspannen von Muskeln erzeugt. Auf atomarer Ebene verrichten sogenannte Molekulare Motoren die kraft erzeugende Arbeit. Sie sind fähig, chemische Energie in gerichtete mechanische Kraft umzuwandeln. Dabei werden grundsätzlich zwei Typen von Molekularen Motoren unterschieden, die Rotationsmotoren, wie die F_0F_1 -ATPase, sowie die Linearmotoren. Linearmotoren zeichnen sich durch eine gerichtete Bewegung entlang von Proteinfilamenten aus und werden bisher in drei Klassen unterteilt: Kinesine, Dyneine und Myosine. Ihre Motorfunktion wird angetrieben durch die Freisetzung chemischer Energie aus der enzymatischen Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP). ATP wird häufig als der Treibstoff des Lebens bezeichnet, da die ATP-Hydrolyse an viele Prozesse in lebenden Systemen gekoppelt ist, die Energieeinsatz benötigen.¹ Im Gegensatz zu Dyneinen und Kinesinen, die sich auf Mikrotubuli bewegen, interagieren Myosine zyklisch mit Aktinfilamenten, was zu einem Gleiten der Myosine entlang der Aktinfilamente führt. In Muskelgewebe erzeugt diese wiederholte Wechselwirkung einer Vielzahl von Myosin Motorproteinen, dem sogenannten dicken Filament, mit filamentösem Aktin, dem dünnen Filament, die Muskelkontraktion. Allerdings ist Bewegung in der Natur nicht beschränkt auf Muskelarbeit, und ebenso sind Myosine dies nicht.

1.1 Myosine – Molekulare Motoren

Die ersten Myosine ($\mu\psi\sigma$, *mys*, *griech.*, Muskel) wurden 1859 entdeckt und aus Skelettmuskeln isoliert.² Der Begriff „Myosin“ wurde ursprünglich für eine Gruppe ähnlicher, aber nicht identischer ATPasen aus Zellen gestreifter und glatter Muskulatur verwendet.³ Heutzutage sind mehr als 140 Myosinisoformen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen und mit diverser Funktionalität bekannt. Diese Superfamilie Molekularer Motoren wurde auf Basis phylogenetischer Analysen der hochkonservierten Kopfdomäne zunächst in 18 Klassen eingeteilt⁴ (Abbildung 1.1) und später durch 6 zusätzliche Klassen erweitert, die hauptsächlich Myosine mit Ursprung aus niederen eukaryotischen Lebewesen (Protisten) beinhalten⁵. Die filamentbildenden Myosine aus Skelettmuskeln, kardialer und glatter Muskulatur, sowie aus Nichtmuskelzellen werden als „konventionelle Myosine“ (Klasse-2 Myosine) bezeichnet, alle anderen Myosine als „unkonventionelle Myosine“. Diese Bezeichnung ist historisch begründet, da Myosin-2 nicht nur das erste Myosin darstellt, das entdeckt wurde, jahrzehntelang war es die einzige Klasse von Myosinen, die bekannt war. Sowohl konventionelle Myosine, als auch einige Klassen der unkonventionellen Myosine zeigen die Tendenz zur Bildung von zweiköpfigen Motoren oder größeren Aggregaten, andere Vertreter erfüllen ihre Motorfunktion im monomeren Zustand, oder dimerisieren

aufgrund der Bindung ihrer Fracht. Etwa 20 verschiedene Myosinisoformen werden durch eine einzelne Zelle exprimiert. Diese Vielfalt wird ebenfalls durch das menschliche Genom reflektiert, welches Myosine aus mehr als 12 Klassen von etwa 40 Myosingenen enkodiert. Dreizehn davon werden allein in Muskeln exprimiert.

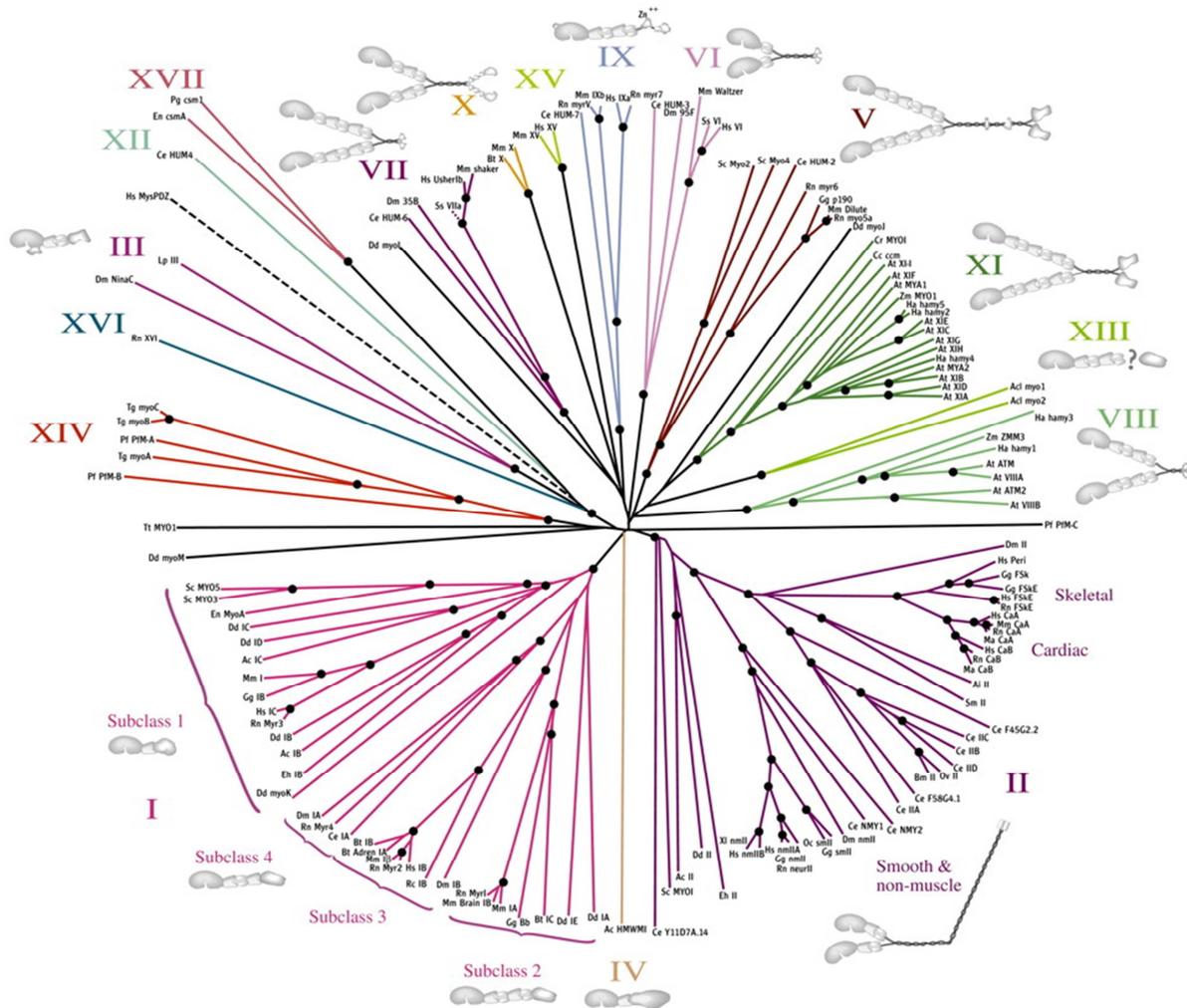


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der originalen 18 Myosinklassen.⁴

Die zellulären Aufgaben und Funktionen von Myosinen in ihren spezifischen Organismen sind divers und jede Zelle besitzt eine Vielzahl verschiedener Myosintypen, wovon jede einzelne eine einzigartige Rolle in der Erzeugung aktinbasierter Bewegung spielt.⁶ Abgesehen von der entscheidenden Rolle bei der Muskelkontraktion, wurde in der Literatur die Beteiligung von Myosinen an verschiedensten zellulären Bewegungsvorgängen berichtet, einschließlich Chemotaxis, die Bildung von Zellprotrusionen, intrazellulärer Transport von Vesikeln und Organellen, Vorgängen an der Membran, wie Exozytose und Endozytose, und ihrer Funktionen während der Zelldifferenzierung (Zytokinese), sowie Aufgaben in der Struktur und Funktion des Zytoskeletts.

Die Ausbildung verschiedenster Krankheiten im Menschen wurde in Zusammenhang mit Mutationen, bzw. der Fehlfunktion bestimmter Myosinisoformen gebracht und macht diese zu attraktiven und vielversprechenden Zielen der medizinischen Forschung. Insbesondere die Beteiligung von Myosinen unterschiedlicher Klassen, wie Myosin-1, -2, -3, -6, -7, oder Klasse 15, an Hör- und Sehvorgängen im menschlichen Organismus, führt zu Taubheit oder Taub-Blindheit durch Mutationen in den entsprechenden Myosingenen.⁷⁻¹⁴ So sind über 80 Mutationen im humanen Myosin-7a verantwortlich für das Auftreten des Usher-Syndroms 1B, einer autosomal rezessiven Hörbehinderung, verbunden mit Gleichgewichtsstörungen und dem progressiven Verlust der Sehfähigkeit.¹⁵ Krankheiten wie die May-Hegglin Anomalie, Fechtner, Sebastian, Epstein und Alport-ähnliche Syndrome stehen in Zusammenhang zu Mutationen in den menschlichen Genen, die nichtmuskuläres Myosin-2a enkodieren.¹⁶ Neben Behinderungen des Hör- und Sehvermögens, sind auch andere Krankheiten, wie die familiäre hypertrophe Kardiomyopathie, ausgelöst durch Mutationen in den Genen, die das menschliche β -kardiale Myosin enkodieren^{17,18}, sowie das tödliche Griscelli-Syndrom durch Mutation des *Hs* Myosin-5a¹⁹, oder die Entstehung und Verbreitung von Krebszellen über Mutationen in den nichtmuskulären Myosinen-2a und -2b²⁰, durch Dysfunktion von Myosinen ausgelöst.

Der Aufbau von Myosin Motorproteinen ist höchst asymmetrisch. Konventionelle Myosine liegen vorrangig als Hexamere vor, wobei jeweils zwei schwere Ketten (MHC; *engl.*, myosin heavy chain) dimerisieren, an die zwei Paare leichter Ketten (LC; *engl.*, light chains) gebunden sind. Die schweren Ketten von Myosinen sind aus drei Hauptdomänen aufgebaut:

- (1) Die hochkonservierte, N-terminale Motordomäne, welche die katalytische Aktivität besitzt und an Aktin bindet.
- (2) Die Nackendomäne, die die Bindungsregion der leichten Ketten ausmacht und die als Hebelarm fungiert, um die Kraft für die Bewegung zu erzeugen.
- (3) Die Schwanzdomäne, die zuständig ist für das Binden von Fracht, bzw. die Wechselwirkung mit anderen Myosinen oder weiteren Proteinen.

Während die Motordomäne hochkonserviert ist innerhalb der Myosin-Superfamilie, wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung der Fähigkeit zur Bindung an Aktin und zur Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP), der Energiequelle der Motoren, variiert die Nackendomäne in Länge und Anzahl von Subdomänen zwischen den Mitgliedern der unterschiedlichen Myosinklassen.

Die Nackenregion verschiedener Myosinisoformen, auch Hebelarmdomäne oder Bindungsregion der leichten Ketten (LCBR; *engl.*, light chain binding region) genannt, besitzt eine unterschiedliche Anzahl an sogenannten IQ Motiven (von 0 bis 7) in ihrer Aminosäuresequenz, die als Bindungsstellen für Calmodulin oder Calmodulin-verwandte leichte Ketten dient. Die IQ Motive haben eine Länge von etwa 24 Aminosäuren und besitzen die Kernsequenz [I,L,V]QXXXRGXXX[R,K]. Konventionelle Myosine haben zwei IQ Motive und können aus diesem Grund zwei leichte Ketten binden, die essentielle leichte Kette (ELC;

engl., essential light chain), die näher an der Motordomäne bindet, und die regulatorische leichte Kette (RLC; *engl.*, regulatory binding chain), die weiter von der Motordomäne entfernt ist. Grundsätzlich wird angenommen, dass die Bindung der leichten Ketten an den Hebelarm die Festigkeit der Nackendomäne während der Kraftentwicklung im Motor erhöht. Des Weiteren spielen die leichten Ketten eine entscheidende Rolle in der Regulation der schweren Myosinketten.

Die Schwanzdomäne weist die größte Varianz zwischen Myosinen verschiedener Quellen oder Klassen auf, höchstwahrscheinlich um die einzelnen Myosinisoformen zur Bindung und zum Transport ihres spezifischen Cargos oder zur Wechselwirkung mit bestimmten Proteinen zu befähigen. In konventionellen Myosinen ist die Schwanzregion vorrangig aus α -helikalen coiled-coil-Abschnitten aufgebaut, die zur Maximierung der intermolekularen Wechselwirkungen dienen und somit die Dimerisierung zweier MHCs ermöglichen. Die α -helikalen coiled-coil-Strukturen werden dabei durch wiederholt auftretende hydrophobe Reste in der ersten (a) und vierten (d) Position eines Septetts von Aminosäuren der grundlegenden Form abcdefg erzeugt. Andere Myosinklassen weisen mitunter sehr unterschiedliche Schwanzregionen auf, mit einer Vielzahl verschiedener funktioneller Untereinheiten, die zur Interaktion mit Wechselwirkungspartnern oder ihrer Fracht dienen (Abbildung 1.2). So können z.B. Klasse-10 Myosine, neben der Interaktion mit F-Aktin über die Motordomäne, mittels der MyTH4/FERM Domäne zusätzlich an Mikrotubuli binden, oder Klasse-9 Myosine sind über die GTPase-Aktivatorprotein für Rho-ähnliche GTPasen (RhoGAP) Domäne an der Regulation von Rho, einem GTP-bindenden Protein, beteiligt.

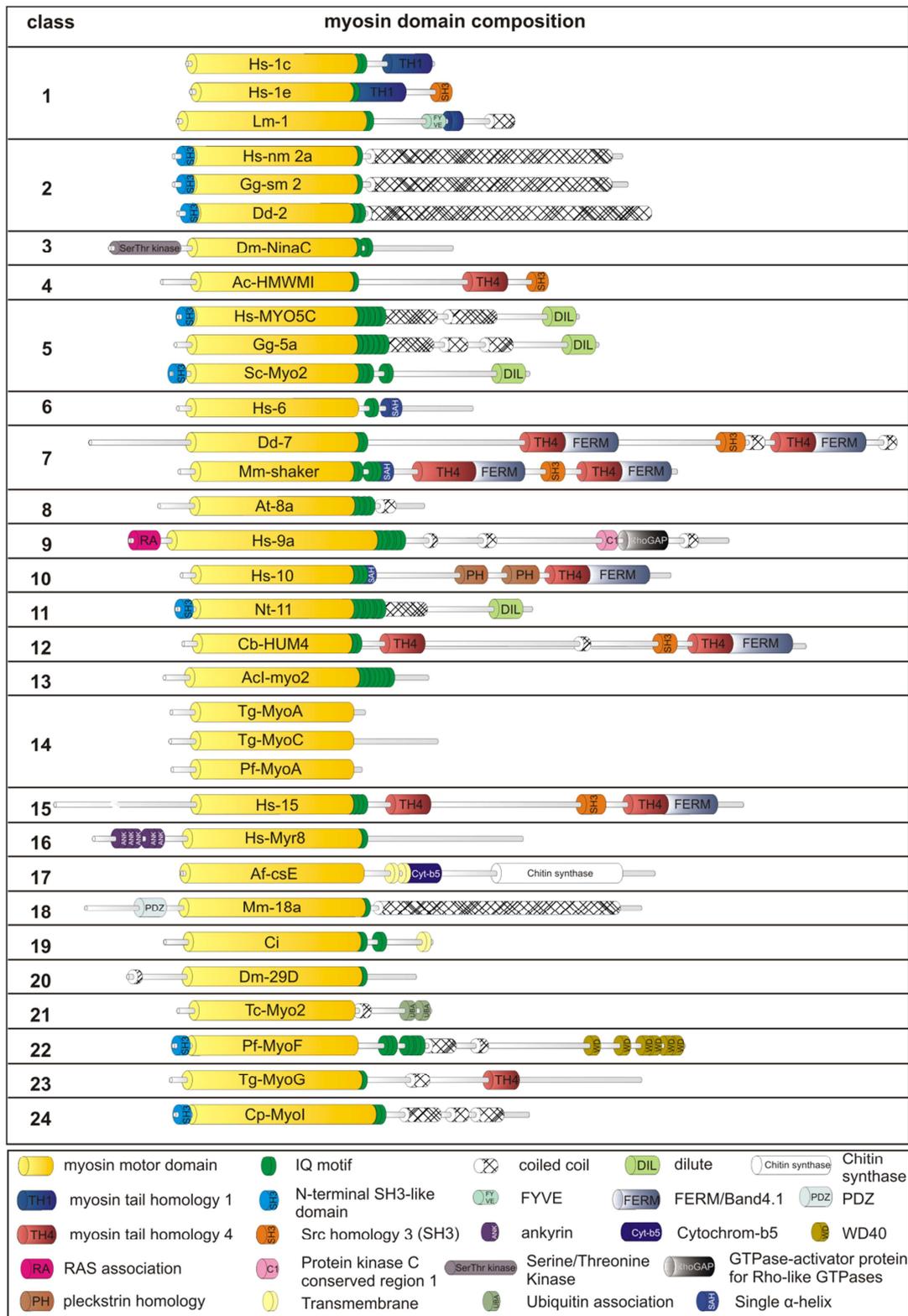


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der gegenwärtigen Myosinklassen und ihrer spezifischen Anordnung der Domänen. Die Vorhersagen der Proteindomänen basieren hauptsächlich auf SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) und CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Ac = *Acanthamoeba castellanii*, Acl = *Acetabularia cliftonii*, Af = *Aspergillus fumigatus*, At = *Arabidopsis thaliana*, Cb = *Caenorhabditis briggsae*, Ci = *Ciona intestinalis*, Cp = *Cryptosporidium parvum*, Dd = *Dictyostelium discoideum*, Dm = *Drosophila melanogaster*, Gg = *Gallus gallus*, Hs = *Homo sapiens*, Lm = *Leishmania major*, Mm = *Mus musculus*, Nt = *Nicotiana tabacum*, Pf = *Plasmodium falciparum*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*, Tc = *Trypanosoma cruzi*, Tg = *Toxoplasma gondii*.

In Abbildung 1.3 sind die Hauptdomänen eines schematisch dargestellten zweiköpfigen Klasse-2 Myosins gezeigt, sowie Angaben zu weiteren Fragmenten gemacht, wie die Subfragmente-1 (S1) und -2 (S2), oder das schwere Meromyosin (HMM; *engl.*, heavy meromyosin) und das leichte Meromyosin (LMM; *engl.*, light meromyosin), die durch Proteolyse erhalten werden können.

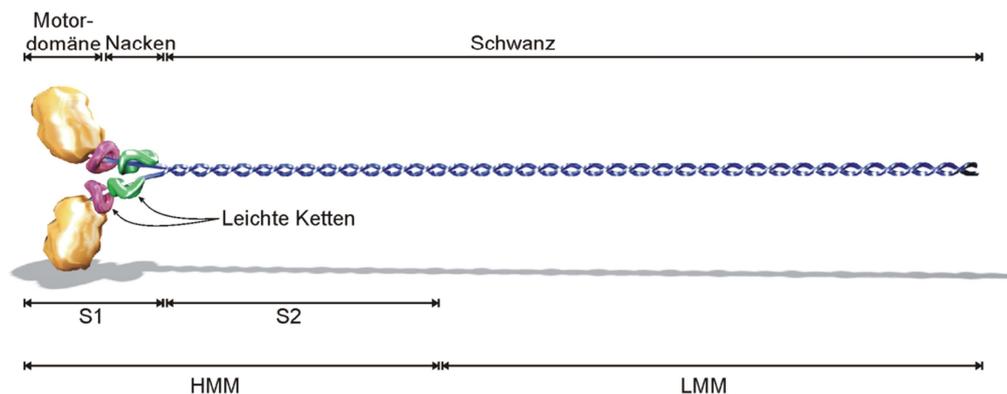


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des doppelköpfigen Myosin-2. Die Längen der proteolytischen Fragmente sind durch Pfeile angegeben. S1 = Subfragment-1, S2 = Subfragment-2, HMM = schweres Meromyosin und LMM = leichtes Meromyosin.

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl das S1, als auch das HMM Fragment, sowie die Motordomäne allein, bzw. erweitert durch einen künstlichen Hebelarm, die Motoreigenschaften ihrer Muttermoleküle erhalten, werden diese Fragmente extensiv als Einzelmolekülmodelle für biophysikalische und strukturelle Untersuchungen der Myosin-Motorfunktion verwendet.

1.1.1 Struktureller Aufbau der Myosin-Motordomäne

Die Myosin-Motordomäne besitzt eine globuläre Struktur und ist zu einem Großteil aus α -Helices aufgebaut, die um ein zentrales 7-strängiges β -Faltblatt angeordnet sind. Sie wird klassisch in drei strukturell definierte Untereinheiten eingeteilt:

- (1) Die N-terminale Subdomäne.
- (2) Die 50 kDa Domäne, die den Großteil der Nukleotid- und Aktinbindungsstellen ausmacht. Sie ist zusätzlich in die obere (U50 kDa, *engl.*, upper 50 kDa) und untere 50 kDa (L50 kDa, *engl.*, lower 50 kDa) Subdomänen unterteilt.
- (3) Die C-terminale Konverter Domäne.

In Abbildung 1.4 sind die einzelnen Subdomänen des S1 Fragments von *Gg* Myosin-2, sowie eine schematische Topologiekarte der Myosin-Motordomäne gezeigt.

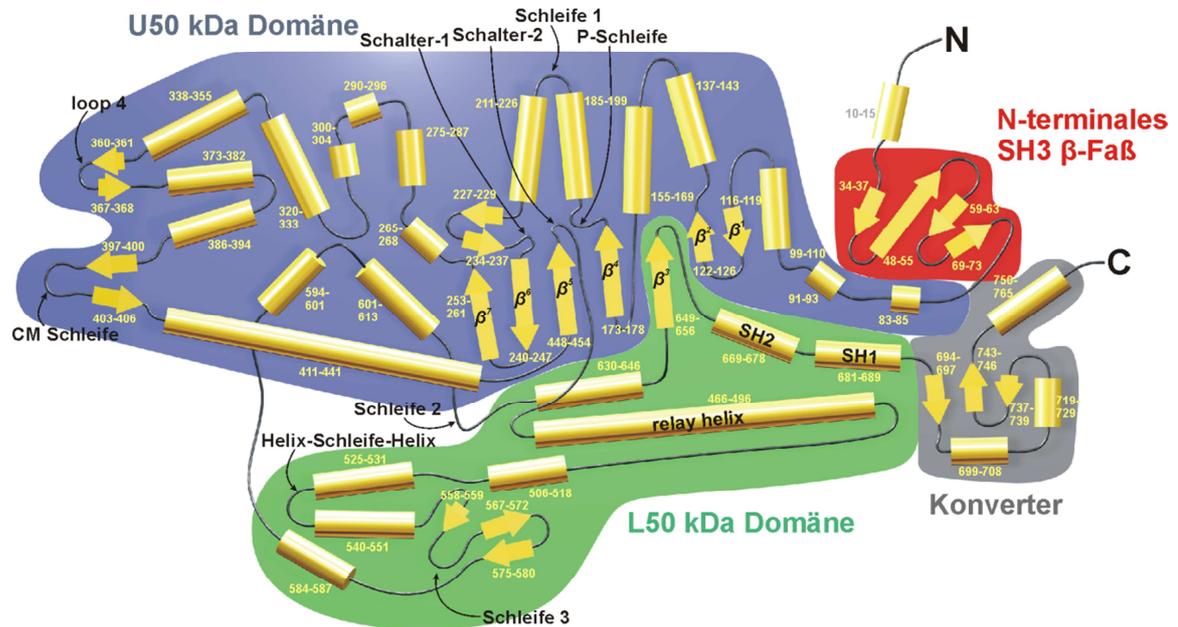
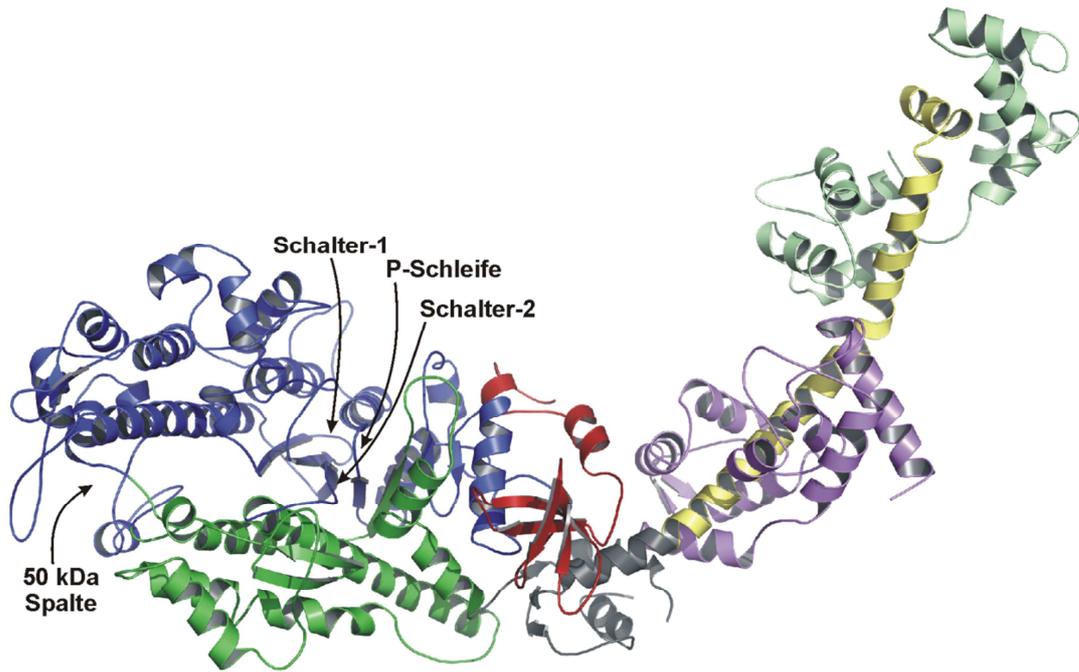


Abbildung 1.4: (A) Bänderdarstellung der Kristallstruktur des Myosin S1 aus Huhn (PDB Code: 2MYS). Farblich angegeben sind die proteolytischen Subdomänen. Rot = N-terminale SH3 Domäne, Blau = U50 kDa Domäne, Grün = L50 kDa Domäne, Grau = Konverter, Lila = essentielle leichte Kette, hellgrün = regulatorische leichte Kette, Gelb = Nackenregion. (B) Topologiekarte der Myosin-2 Motordomäne. Helices sind als Zylinder dargestellt und β -Stränge als Pfeile.

Die N-terminale Subdomäne in Klasse-2 Myosinen besitzt eine Länge von etwa 80 Aminosäuren und beinhaltet eine SH3-ähnliche β -Fass Untereinheit. Die Funktion dieser kleinen Subdomäne ist bisher nicht bekannt und Klasse-1 Myosinen fehlt diese Domäne vollständig. Nichtsdestotrotz zeigten Untersuchungen, dass das Entfernen der gesamten N-terminalen Subdomäne in *Dd* Myosin-2 zum vollständigen Funktionsverlust führt.²¹ Ein charakteristischer langer Spalt, der sich von der Aktinbindungsregion bis zum aktiven Zentrum zieht, teilt die 50 kDa Domäne in die obere (U50 kDa, *engl.*, upper 50 kDa) und untere 50 kDa (L50 kDa, *engl.*, lower 50 kDa) Subdomäne. Sechs der sieben Stränge des zentralen β -Faltblattes befinden sich im U50 kDa Segment. Da der größte Teil der Aktinbindungsregion in der L50 kDa Subdomäne lokalisiert ist, wird dieser Teil auch als Aktinbindungsdomäne bezeichnet. Auf der anderen Seite des Proteins, in der U50 kDa Subdomäne, etwa 40-50 Å entfernt von der Aktinbindungsregion, befindet sich das aktive Zentrum des Motorproteins. Diese enzymatische Bindungstasche wird durch verschiedene Sekundärstrukturelemente des Proteins gebildet und besitzt die Aufgabe das Nukleotid zu binden und die Hydrolysereaktion von ATP durchzuführen, um die darin gespeicherte chemische Energie für die Myosin-Motorfunktion freizusetzen. Drei wichtige Motive im aktiven Zentrum sind die P-Schleife (Aminosäuren 179-186, Konsensus Sequenz: GESGAKT), Schalter-1 (Aminosäuren 233-238, Konsensus Sequenz: NXN SSR) und Schalter-2 (Aminosäuren 454-459, Konsensus Sequenz: DXSGFE), alle beteiligt an der molekularen Erkennung und Bindung des γ -Phosphates (γ -Phosphatsensoren), welches während der Hydrolysereaktion abgespalten wird. Diese konservierten Schleifenstrukturen besitzen eine hohe Ähnlichkeit zur Nukleotidbindungstasche in Kinesinen und G-Proteinen, weshalb angenommen wird, dass diese drei Proteinklassen gemeinsame Vorfahren haben und ihre Hydrolysereaktion auf ähnliche Weise durchführen.²² Die Oberflächenschleifen Schleife-1 und Schleife-2 weisen die höchste strukturelle Varianz, sowohl in der Länge, als auch in der Aminosäuresequenz, in der 50 kDa Domäne innerhalb der verschiedenen Myosinklassen auf. Die Aminosäurereste 411-441 bilden eine lange α -Helix, die von der Aktinbindungsregion bis zum 5. Strang des zentralen β -Faltblattes reicht. Ein gebrochenes Helixmotiv ist durch die Reste 669-689 gegeben. Die beiden Segmente dieser gebrochenen Helix tragen jeweils ein reaktives Cystein und werden deshalb häufig als SH1- und SH2-Helices bezeichnet. Die SH1/SH2-Region geht direkt in die Konverterdomäne über, welche als Drehpunkt für den C-terminalen Hebelarm fungiert. Zusammen mit der Nackenregion wird die kleine Konverterdomäne häufig als Verstärkerregion bezeichnet und rotiert während des Kraftschlags um etwa 60°, was zur Erzeugung der mechanischen Kraft führt und die Basis der Hypothese des schwingenden Hebelarms (*swinging lever arm hypothesis*) ausmacht (Abbildung 1.5). Die Relayhelix (Aminosäuren 466-496; *relay, engl.*, Relais), eine lange α -Helix, die von Schalter-2 ausgeht, interagiert mit der SH1-Helix. Wie der Name schon beinhaltet, besitzt die Relayhelix die Funktion die konformellen Informationen zwischen der Aktinbindungsregion, der Nukleotidbindungsstelle und der mechanischen Verstärkereinheit zu vermitteln.

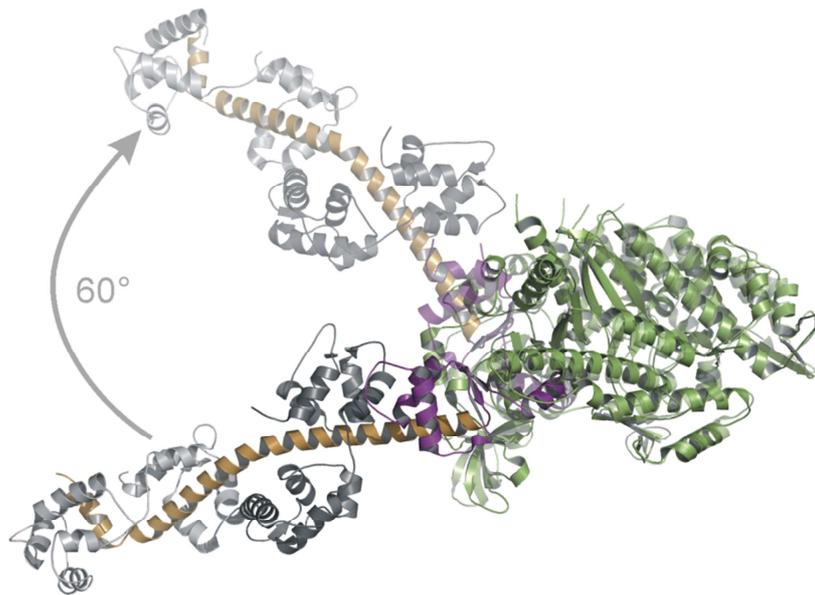


Abbildung 1.5: Schwingen des Hebelarms um etwa 60° während des Kraftschlages (*swinging lever arm hypothesis*). Überlagerung der Kristallstrukturen des Muschel Myosin-2 Subfragments-1 im *rigor* Zustand (opak, PDB Code: 2OVK) und im *pre-power stroke* Zustand (transparent, PDB Code: 1QVI).

1.1.1.1 Der ATPase-Zyklus

Die Motorfunktion von Myosinen ist ein komplexer Prozess, der eine Vielzahl einzelner Vorgänge zu einem extrem effektiven Zyklus der Krafterzeugung und Motilität vereint. Ein Modell, das die kinetischen und mechanischen Zustände während der zyklischen Wechselwirkung von Myosinen mit ATP und F-Aktin verbindet, wurde zunächst von Lynn und Taylor im Jahr 1971 aufgestellt.²³ Auf der Basis von experimentell gelösten Röntgenkristallstrukturen, Elektronenmikroskopie-Experimenten und kinetischen Versuchen wurde dieser chemomechanische Zyklus weiter verfeinert und erweitert über die Jahre. Entlang dieses Zyklus' durchläuft der Myosinmotor eine Anzahl von an F-Aktin gebundenen, sowie ungebundenen Zuständen mit unterschiedlicher Bindungsstärke (Abbildung 1.6).

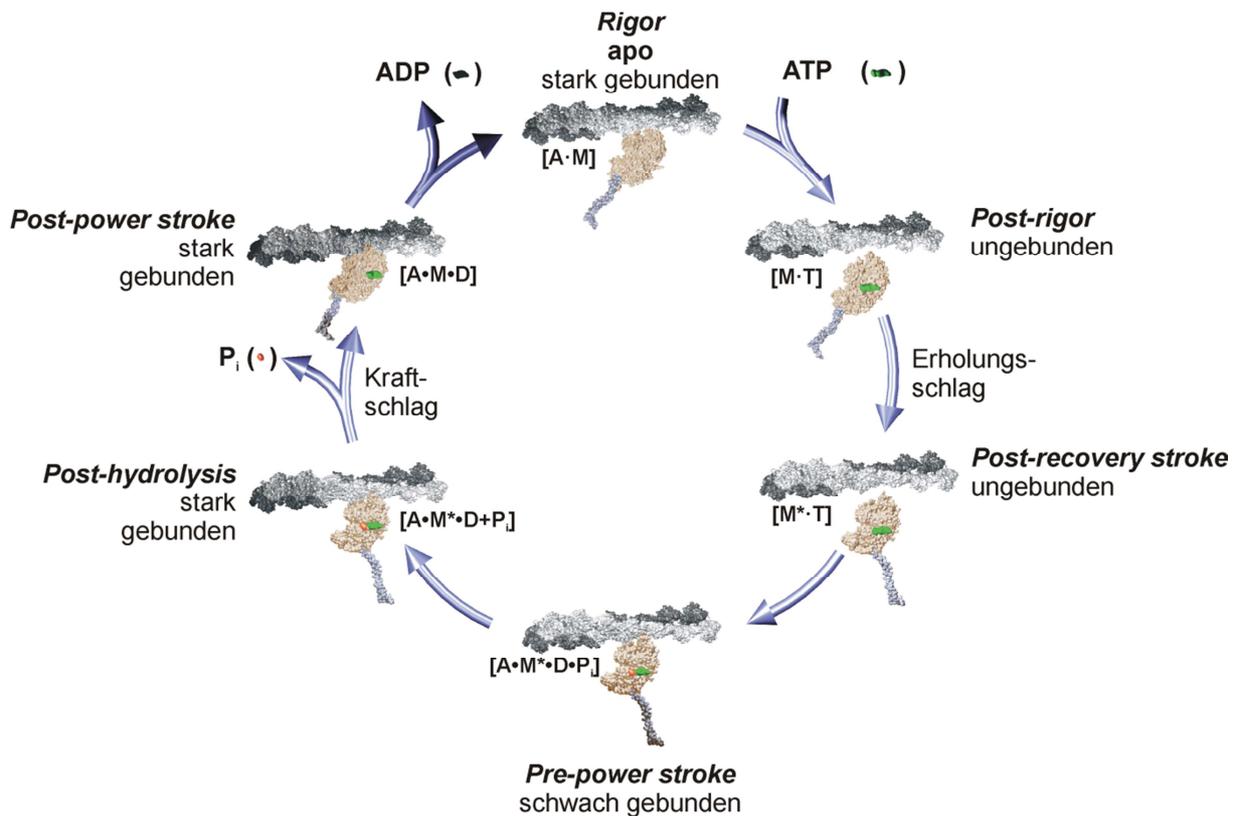


Abbildung 1.6: Der ATPase-Zyklus. Das Myosin durchläuft eine Reihe von an Aktin gebundenen und ungebundenen Zuständen. Gelb = Myosin-Motordomäne, Blau = Nackenregion (zur Übersichtlichkeit sind die leichten Ketten nicht gezeigt), Grau = Aktinfilament.

Ausgehend von einem nukleotidfreien Myosin-Zustand (apo-Zustand) ist das Motorprotein stark an das Aktinfilament im sogenannten *rigor* Komplex gebunden [A·M]. Die Bindung von ATP an das aktive Zentrum des Myosins initiiert die Dissoziation des Aktomyosinkomplexes, aufgrund der antagonistischen Effekte von Aktin und ATP, und überführt den Motor in den *post-rigor* Zustand. Dieser Prozess ist an eine Reihe von Konformationsänderungen im Myosinmolekül gebunden, die zur Ausrichtung des Hebelarms führt (Erholungsschlag; *engl.*, *recovery stroke*) und die Motordomäne in einen Hydrolyse-kompetenten Zustand versetzt (*post-recovery stroke* Zustand) [M*·T]. In diesem, von Aktin gelösten Zustand, findet die hydrolytische Spaltung von ATP zu ADP·P_i statt. Anschließend interagiert Myosin erneut mit F-Aktin, zunächst mit geringer Affinität im *pre-powerstroke* Zustand [A·M*·D·P_i] und anschließend sehr stark im *post-hydrolysis* Zustand [A·M*·D+P_i]. Das erneute Binden von Aktin löst die Abgabe des abgespaltenen anorganischen Phosphates (P_i) aus der Nukleotidbindungstasche aus und somit eine weitere Konformationsänderung des gesamten Proteins: den Kraftschlag (*power stroke*) des Motors [A·M·D], der zum motilen Ereignis führt. Schließlich wird das noch im aktiven Zentrum verbliebene ADP abgegeben, was eine weitere leichte Arretierung des Hebelarms auslöst, um zum *rigor* Komplex zurückzukehren.

1.1.1.2 Die Aktinbindungsregion

Die exakten Details der Aktomyosin-Wechselwirkungsfläche und der Modulation der Interaktion zwischen der Myosin-Motordomäne und dem Aktinfilament während der Nucleotidumsetzung sind von entscheidender Relevanz für die Kraftentwicklung und die chemomechanische Kopplung. Ein hohes Maß an funktioneller Konserviertheit wurde entdeckt, in der Art, wie Aktin und unterschiedliche Myosinisoformen miteinander interagieren. Aus diesem Grund wird angenommen, dass der Andockprozess und die molekularen Details der Aktomyosin-Wechselwirkungsfläche sich für den Großteil der Myosine aus unterschiedlichen Organismen und Klassen ähneln. Die Gesamtkontaktfläche zwischen dem Aktinfilament und Myosin beträgt etwa 2000 \AA^2 und die Aktinbindungsregion ist aus topologisch getrennten Strukturen der Myosin-Motordomäne aufgebaut. Schleife 3 und das Helix-Schleife-Helix Motiv der L50 kDa Domäne, die CM Schleife und Schleife 4 der U50 kDa Domäne, sowie Schleife 2, die die L50 und U50 kDa Domänen verbindet, sind an der Aktinbindung beteiligt (Abbildung 1.7).

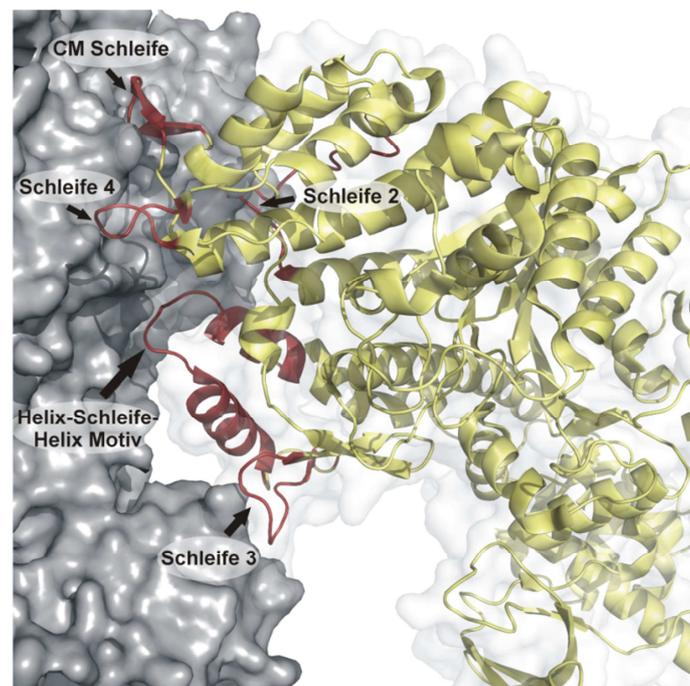


Abbildung 1.7: Die Aktomyosin-Wechselwirkungsfläche. Die Myosin-Motordomäne (Gelb) ist als Bändermodell dargestellt, F-Aktin (Grau) in einer Oberflächendarstellung. Die Aktinbindungsregion (Rot) besteht aus einer Reihe von Strukturelementen, einschließlich der Kardiomyopathieschleife (CM Schleife), Schleife 2, Schleife 3, Schleife 4, sowie das Helix-Schleife-Helix Motiv.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen²⁴⁻²⁷, spektroskopische Studien²⁸⁻³¹ und Röntgenkristallographie³²⁻³⁴ haben bewiesen, dass der große 50 kDa Spalt in der Myosin-Motordomäne sich aufgrund der Bindung an Aktin schließt. Dabei besteht eine reziproke Beziehung zwischen der Aktin- und Nucleotidaffinität. Tatsächlich herrscht eine starke Kopplung zwischen dem Zustand der Nucleotidbindungstasche und dem Öffnen und Schließen des Aktinbindungsspalt vor. Vergleichende Studien der hochaufgelösten

Röntgenstrukturen von Myosin mit offenem und geschlossenem 50 kDa Spalt, d.h. *rigor* und *post-rigor/pre-power stroke* Zustand, geben einen Einblick in die Grenzzustände dieses Kommunikationspfades (Abbildung 1.8). Ein konsistentes Merkmal aller *rigor* Strukturen der Myosin-Motordomäne ist die veränderte Position von Schalter-1 der Nukleotidbindungs-tasche. Die hydrolytische Spaltung des γ -Phosphates destabilisiert die Wechselwirkung des Nukleotids mit der P-Schleife und führt zu einem Entfernen der P-Schleife weg vom Nukleotid. Diese Umlagerung induziert das Öffnen der kritischen Salzbrücke zwischen Schalter-1 und Schalter-2 (vergleiche Kapitel 1.1.1.3), indem es Schalter-2 mit sich zieht. Während dieses Zustandes findet die Rückbindung der Motordomäne an Aktin statt und löst eine Rotation der U50 und L50 kDa Domänen aus, was zum Schließen des großen 50 kDa Spaltes führt. Zusätzlich wird durch die Rotation das zentrale β -Faltblatt in eine verdrehte Konformation gezwungen, da die Interaktionen des β -Faltblattes zu den umliegenden Strukturelementen aufrechterhalten werden. Des Weiteren zieht das Verdrehen des zentralen β -Faltblattes, insbesondere die Verschiebung der drei Eck- β -Stränge Schalter-1 weiter vom Nukleotid ab. Die gesamte Schalter-1 Region bewegt sich etwa 8 Å weg von ihrer ursprünglichen Position in der Nähe des Nukleotids. Diese Bewegung unterbricht die Wechselwirkungen zum γ -Phosphat, sowie die Koordination des Mg^{2+} Ions und könnte die Produktabgabe einleiten. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde ein sogenannter Falltürmechanismus (*trap door*), im Gegensatz zu dem vorher angenommenen Hintertürmechanismus (*back door*), für die Abgabe des P_i vorgeschlagen.³² In diesem Mechanismus verlässt das gebildete anorganische Phosphat P_i das Myosin nicht durch einen schon vorher bestehenden Tunnel³⁵, sondern durch eine neu gebildete Öffnung, die durch die Bewegung von Schalter-1 entsteht.

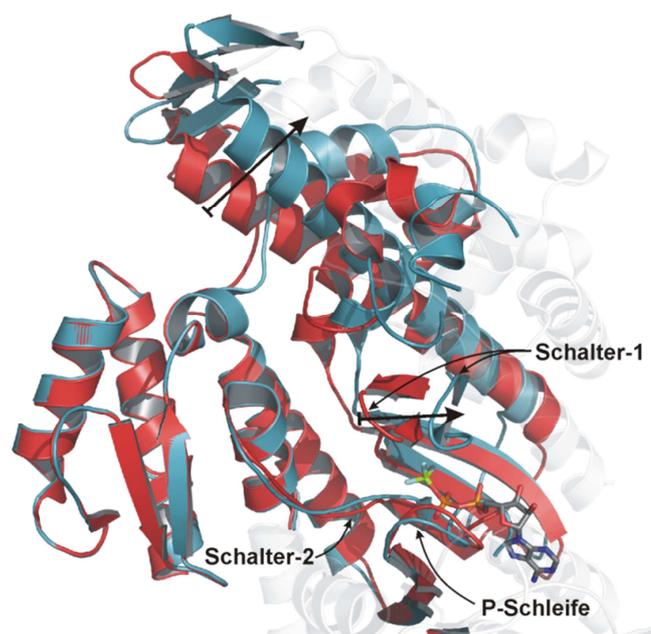


Abbildung 1.8: Öffnen des 50 kDa Spaltes in Myosin-5. Kopplung der Bewegung von Schalter-1 und dem Öffnen des Spaltes (angezeigt durch Pfeile). Superposition des *rigor* (Rot, PDB Code: 10E9) und des *post-rigor* (Türkis, PDB Code: 1W7J) Zustandes.

1.1.1.3 Die Nukleotidbindungsstelle / Das aktive Zentrum

Die Nukleotidbindungstasche befindet sich in der U50 kDa Domäne der Myosin Motordomäne, in der Nähe der inneren Spitze des großen 50 kDa Spaltes. Sie ist aus mehreren Sekundärstrukturelementen des Proteins aufgebaut und ihre Hauptfunktion besteht darin das Nukleotid zu binden und die Hydrolyse des ATPs durchzuführen, um die darin gespeicherte Energie freizusetzen. Die typische ATP Umsatzrate des Aktomyosin-systems reicht von 100 s^{-1} bei schnellen Myosinisoformen bis zu 1 s^{-1} bei langsameren Myosinen. Eine Energie von etwa 10^{-19} J wird durch die hydrolytische Spaltung eines ATP Moleküls unter physiologischen Bedingungen freigesetzt.³⁶

Die Nukleotidbindungstasche ist vorrangig aus drei konservierten Schleifenstrukturen aufgebaut: die P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2. Das Binden des Nukleotids im aktiven Zentrum des *rigor* Komplexes führt zur Dissoziation des Aktomyosin-systems und zur Öffnung des großen 50 kDa Spaltes in der Myosin-Motordomäne (vergleiche 1.1.1.2). Die P-Schleife nimmt das γ -Phosphat des ATPs zunächst wahr und initiiert den Bindungsprozess des Nukleotids durch eine Konformationsänderung in die Bindungstasche hinein. Diese Bewegung der P-Schleife und die Ausbildung eines umfangreichen Wechselwirkungsnetzes zum Nukleotid zieht Schalter-1 und Schalter-2 aufeinander zu und führt zum Schließen der Nukleotidbindungstasche. Das Schließen der Schaltermotive, erkennbar durch die Ausbildung einer kritischen ionischen Bindung oder Salzbrücke zwischen R238 von Schalter-1 und E459 von Schalter-2, positioniert das Nukleotid adäquat für die enzymatische Spaltung des γ -Phosphates und ist somit eine Voraussetzung für die erfolgreiche Hydrolysereaktion. Nur die geschlossene Konformation ist fähig ATP zu hydrolysieren.³⁷

Hochauflösende Kristallstrukturen der Myosin-Motordomäne im offenen Zustand der Nukleotidbindungstasche (*post-rigor* Zustand) mit dem Hebelarm in der sogenannten *down* Position und Strukturen im geschlossenen Zustand des aktiven Zentrums (*pre-power stroke* Zustand) mit dem Hebelarm in der *up* Position wurden unter Verwendung verschiedener nicht-hydrolysierbarer Nukleotidanaloga erhalten. Generell wird der offene Zustand erhalten, wenn die Nukleotidbindungsstelle entweder frei ist, oder Mg·ATP, Mg·ADP, Mg·ATP γ S oder Mg·AMP·PNP gebunden ist. Andererseits wird der geschlossene Zustand bei der Verwendung von Nukleotidanaloga, die den Übergangszustand nachahmen, beobachtet, wie Mg·ADP·AlF₄⁻, Mg·ADP·VO₄ oder Mg·ADP·VO₃. Beide Zustände wurden gefunden, wenn ADP·BeF_x gebunden war. Während Mg·ADP·AlF₄⁻ und Mg·ADP·VO₄ eindeutig den Übergangszustand der ATP-Hydrolyse nachahmen, mit einem pentavalenten bipyramidalen Vanadium- oder Aluminiumatom, ähneln Mg·ADP·VO₃ und Mg·ADP·BeF_x mehr dem Ausgangszustand der Hydrolysereaktion (ATP-Zustand) mit einer tetragonalen Konformation des Beryllium- oder Vanadiumatoms, weshalb diese Strukturen eher dem *post-recovery stroke* Zustand entsprechen (Abbildung 1.9).

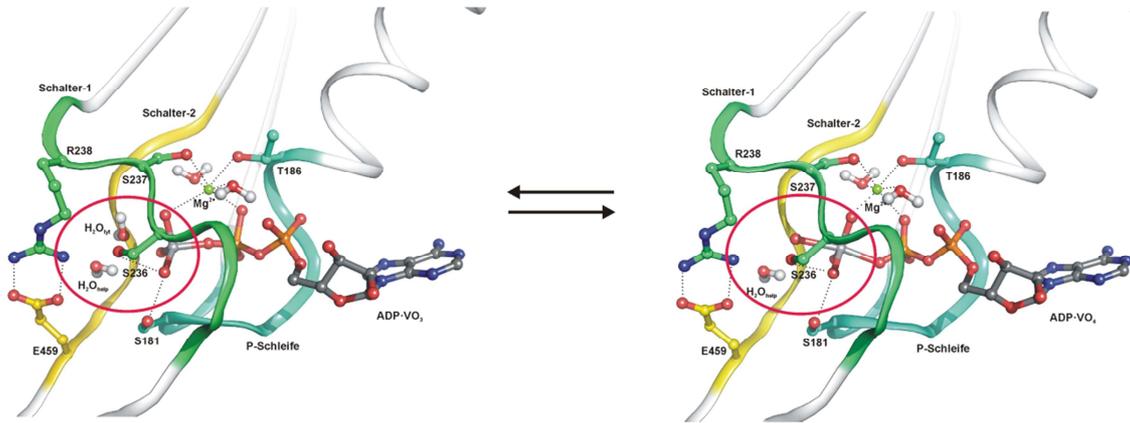


Abbildung 1.9: Die Nucleotidbindungstasche. **(A)** Das gebundene Nucleotidanalogen ADP-VO₃ ahmt den ATP-Zustand mit einem tetragonalen Vanadiumatom nach. Sehr gut zu sehen ist auch das angreifende nukleophile Wassermolekül (H₂O_{yt}) (PDB Code: 2JJ9). **(B)** Das ADP-VO₄ entspricht dem Übergangszustand der ATP Hydrolyse mit einem fünfwertigen bipyramidalen Vanadiumatom (PDB Code: 1VOM).

Abbildung 1.10 zeigt die Konformation des Nucleotids im aktiven Zentrum, sowie eine schematische Darstellung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes, das in Kristallstrukturen des hydrolysekompetenten Zustands der Myosin-Motordomäne im Komplex mit nicht-hydrolysierbaren Nucleotidanaloga vorliegt. Wie zu sehen, werden mehr als 20 Wasserstoffbrücken zwischen dem Protein und dem Nucleotid ausgebildet, wobei die meisten davon zwischen den Phosphatgruppen und den drei wichtigen Proteinschleifen in der Tasche zu finden sind. Die Anwesenheit eines zweiwertigen Kations ist für die Bindung des Nucleotids zum aktiven Zentrum von Myosinen notwendig, welches das ATP mit hoher Affinität chelatisiert und somit den Protein-Substrat-Komplex stabilisiert. Unter physiologischen Bedingungen dient Magnesium als divalentes Metallion. Magnesium ist durch sechs Liganden koordiniert: zwei Sauerstoffe der β - und γ -Phosphate von ATP, die Seitenketten der Aminosäuren S237 und T181, sowie zwei Wassermoleküle.

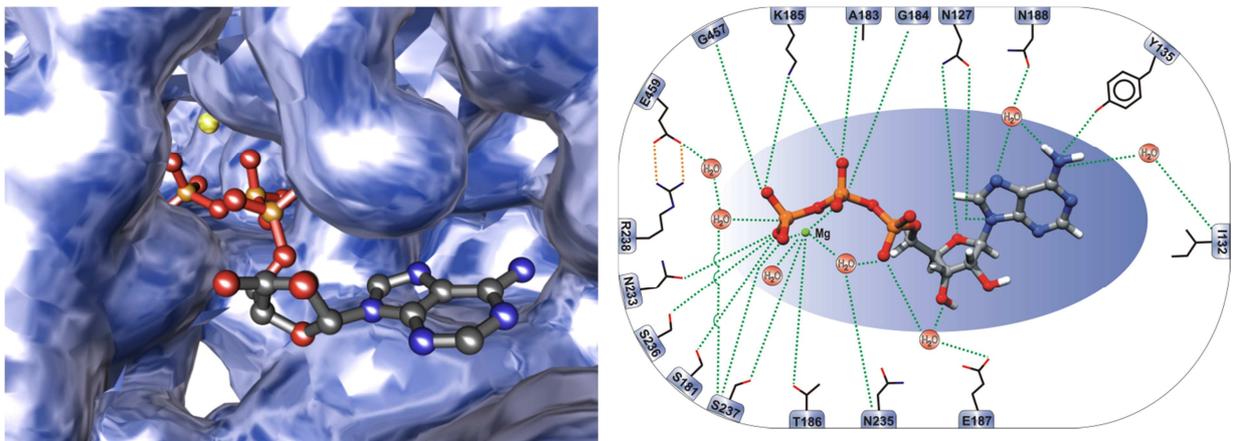


Abbildung 1.10: **(A)** Die Nucleotidbindungstasche mit gebundenem Mg-ATP. **(B)** Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von ATP mit Myosin-2.

Obwohl die Hydrolyse ein Schlüsselprozess für den Myosinmotor darstellt und die Reaktion an die mechanische Kraftentwicklung gekoppelt ist, sind die Details des Reaktionsmechanismus' noch nicht vollständig aufgeklärt. Kinetische Studien mit Sauerstoffisotopen zeigten, dass es sich dabei um eine Einzelschritt-Reaktion mit Waldenumkehr des γ -Phosphates, ohne Ausbildung eines phosphorylierten Myosins handelt.³⁸⁻⁴⁰ Vorrangig wird von einem assoziativen Mechanismus ausgegangen, bei dem ein Wassermolekül als Nukleophil das γ -Phosphat angreift. Der Aktivierungsprozess des Wassermoleküls ist dabei weiterhin Gegenstand der Diskussion, wobei sechs Aktivierungsmechanismen vorgeschlagen wurden.

- (1) Das γ -Phosphat selbst agiert als Base und das Proton wird direkt vom angreifenden Wassermolekül übertragen.^{41,42}
- (2) S181 fungiert als Protonrelais (das Proton wird auf das γ -Phosphat übertragen).⁴³
- (3) S236 fungiert als Protonrelais (das Proton wird auf das γ -Phosphat übertragen).^{41,42}
- (4) K185 agiert als Base und deprotoniert das angreifende Wasser.⁴³
- (5) K185 fungiert als Säure und protoniert das γ -Phosphat.⁴⁴
- (6) Die „zwei-Wasser Hypothese“: Das angreifende Wasser gibt ein Proton an ein Hilfswassermolekül ab, welches von E459 positioniert wird (E459 könnte als Endempfänger des Protons fungieren).⁴⁵

1.1.1.4 Der Konverter

Die Konverterdomäne dient als Verstärkerregion für die Krafterzeugung. Kleine Konformationsänderungen in der Motordomäne werden durch den Konverter, zusammen mit der Nackenregion, durch eine Rotationsbewegung um $\sim 60^\circ$, zu großen Umlagerungen verstärkt, die den Hebelarm von der *up* Position in die *down* Position bewegen. Die kleinen Veränderungen gehen von der Nukleotidbindungstasche aus, ausgelöst durch die ATP Hydrolyse und die Rückbindung an Aktin, und werden durch die gesamte Motordomäne bis zum Konverter geleitet. Neben der Kopplung zwischen der Aktinbindungsregion und der Nukleotidbindungsstelle (vergleiche Kapitel 1.1.1.2) besteht somit offenkundig ein allosterischer Kommunikationpfad zwischen der Nukleotidbindungstasche und der Verstärkerregion. Die konkreten Details dieser chemomechanischen Kopplung sind trotz unzähliger experimenteller⁴⁶⁻⁴⁸ und theoretischer Untersuchungen⁴⁹⁻⁵² weiterhin unklar, da die einzelnen Ereignisse kaum experimentell zugänglich sind. Dennoch gibt die strukturelle Analyse der Motordomäne im Zustand vor und nach dem Kraftschlag (*pre-power stroke* und *rigor* Zustand) Einsicht in einige der Ereignisse während des krafterzeugenden Schrittes des Zyklus' (Abbildung 1.11). Einer der offensichtlichsten Unterschiede in den Kristallstrukturen der *pre-power stroke* und *rigor* Zuständen ist das Vorhandensein oder Fehlen eines Knicks in der langen Relayhelix. Die Relayhelix reagiert auf das Öffnen (Kraftschlag), bzw. Schließen (Erholungsschlag) von Schalter-2, mit dem sie direkt verbunden ist, sowie auf das Verdrehen

des zentralen β -Faltblattes, mit dem Abknicken oder Geraderücken des C-terminalen Abschnitts der langen α -Helix. Diese Änderung wird auf die SH1/SH2-Region übertragen und resultiert in der Rotation der Konverterdomäne um etwa 60° im Fall von Myosin-2. Das Ausmaß der Abknickung bestimmt die Größe der Konverterrotation.

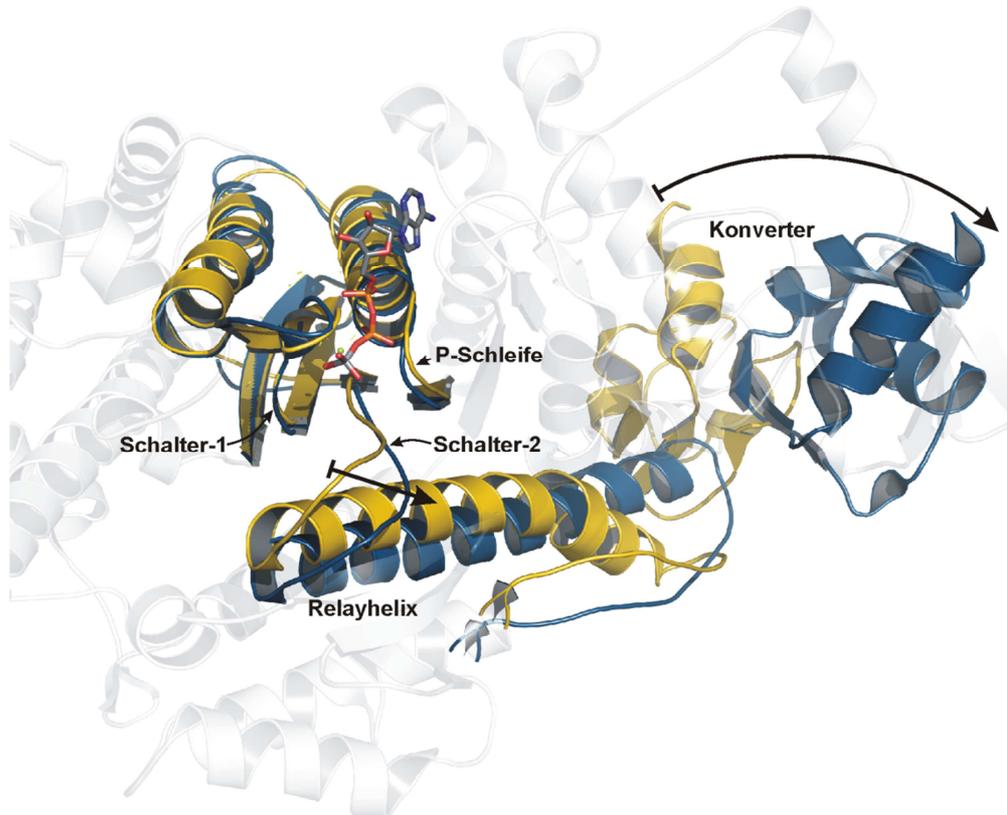


Abbildung 1.11: Kraftschlag, bzw. Erholungsschlag von Myosin-2. Die Kopplung der Schalter-2 Bewegung, dem Abknicken/Geraderücken der Relayhelix und die Konverterrotation während des Kraftschlages sind dargestellt (angezeigt durch Pfeile). Überlagerung der *post-rigor* (Blau, PDB Code: 1G8X) und *pre-power stroke* (Gelb, PDB Code: 2JHR) Zustände.

1.1.2 Intrinsische Allosterie

Allosterie ist definiert als die Modulation der Aktivität eines Proteins durch die Bindung eines Effektors oder Modulators an eine Bindungsstelle entfernt vom aktiven Zentrum. Das allosterische Effektormolekül kann dabei sowohl ein Ligand, als auch ein weiteres Protein sein. Das Konzept der Allosterie ist nicht gleichbedeutend mit Kooperativität, Kooperativität ist eher ein Sonderfall von allosterischer Regulation. Im Allgemeinen beschreibt der Begriff Kooperativität die allosterische Modulation eines quartären Proteins mit vier Bindungsstellen, wobei die Bindung eines Liganden an eine der Bindungsstellen die Affinität der anderen Bindungsstellen für den gleichen Typ von Ligand erhöht. In diesem Zusammenhang wurden zwei Modelle in den frühen 1960igern aufgestellt, Das Monod, Wyman und Changeaux (MWC) Modell, bei dem alle Untereinheiten des Proteinverbands im gleichen Zustand vorliegen müssen, um die Bindung eines Liganden zu einer der Untereinheiten zu

ermöglichen, sowie das Koshland, Nemethy und Filmer (KNF) Modell, bei dem die Bindung des Liganden an eine der Untereinheiten, das Einnehmen des selben Zustands aller anderen Untereinheiten herbeiführt.

Heutzutage ist es bewiesen, dass Allosterie ebenso in monomeren Proteinen auftreten und eine entscheidende Rolle spielen kann.⁵³ Das Binden eines allosterischen Effektors verursacht im Großteil aller untersuchten Fälle eine Konformationsänderung in einer entfernt gelegenen Stelle des Proteins, meist im aktiven Zentrum, ändert die elektrostatischen Eigenschaften der abgelegenen Stelle, oder beeinflusst die Bildung eines funktionalen Proteinkomplexes. Die Konformationsänderungen des aktiven Zentrums umfassen hauptsächlich das Schließen und Öffnen des aktiven Zentrums oder Umlagerungen, die z.B. die Anlagerung des Substrates unterbinden. Diese Mechanismen allosterischer Regulation werden häufig als die „alte Ansicht“ bezeichnet. In einer deutlichen Anzahl von Fällen ist die Bindung eines allosterischen Modulators nicht mit lokalen strukturellen Veränderungen verbunden, sondern hat eher einen Einfluss auf die globale Flexibilität des Proteins oder führt zu einer Populationsverschiebung im statistischen Ensemble von Proteinkonformeren (die „neue Ansicht“).⁵³⁻⁵⁶

Der Myosinmotor selbst stellt ein intrinsisch allosterisch reguliertes Protein dar. Entfernt voneinander gelegene Bereiche des Molekularen Motors kommunizieren über festgelegte Pfade miteinander und lösen während des chemomechanischen Zyklus' Konformationsänderungen untereinander aus. Diese intrinsische Allosterie ist eine spezielle Art von allosterischer Modulation, da es nicht die Interaktion und Bindung eines anderen Effektormoleküls beinhaltet. In Bezug auf das chronologische Auftreten während des chemomechanischen Aktomyosin-ATPase-Zyklus' sind diese Vorgänge:

- (1) Die Wechselbeziehung zwischen dem Öffnen des 50 kDa Spaltes und dem Schließen der Nukleotidbindungstasche aufgrund der ATP-Bindung.
- (2) Die Weiterleitung regulatorischer Information von der Nukleotidbindungsstelle zum Konverter während des Erholungsschlags (*recovery stroke*).
- (3) Die Kommunikation zwischen der Aktinbindungsregion (Schließen des 50 kDa Spaltes) und des Öffnens der Nukleotidbindungstasche im Anschluß an die Hydrolysereaktion.
- (4) Die chemomechanische Kopplung zwischen der Nukleotidbindungstasche und der Konverterdomäne, die zum Kraftschlag (*power stroke*) führt.

1.1.3 Allosterische Inhibitoren der Myosin-Motoraktivität

In der Literatur wurden bereits verschiedene chemische Substanzen beschrieben, die die Motoraktivität unterschiedlicher Myosinisoformen zu beeinflussen vermögen. Die meisten davon besitzen eine hemmende Wirkung auf die Myosinfunktion und agieren auf allosterische Weise.

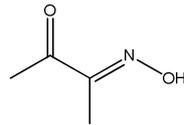


Abbildung 1.12: Strukturformel von 2,3-Butandionmonoxim (BDM).

2,3-Butandionmonoxim (BDM) ist einer der ersten entdeckten, nicht-kompetitiven Myosin-2 Inhibitoren.^{57,58} Obwohl er mit relativ geringer Affinität ($K_i \approx 5 \text{ mM}$ für Skelettmuskel Myosin-2) an Myosin bindet, wurde er in großem Umfang für zellbiologische Experimente verwendet. BDM verringert die ATPase-Rate und Kraftentwicklung durch Hemmung der P_i Abgabe aus der Motordomäne und durch das Erhöhen der Gleichgewichtskonstante der Hydrolysereaktion.⁵⁹ Im Allgemeinen wird angenommen, dass BDM den schwach Aktin-gebundenen Myosin-ADP- P_i Zustand stabilisiert. Aufgrund der Tatsache, dass BDM ursprünglich zur Reaktivierung Alkylphosphat-inhibierter Acetylcholinesterasen entwickelt wurde⁶⁰, beeinflusst BDM zusätzlich die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten.⁶¹ Weitere Studien zeigten, dass BDM einen Effekt auf eine Vielzahl anderer Proteine ausübt, einschließlich Kaliumkanälen^{62,63}, L-Typ Calciumkanälen⁶⁴ und Myosin-2 Leichte-Kette-Kinase⁶⁵, und wurde deshalb als nicht empfehlenswerte Verbindung für zellbiologische Experimente deklariert.⁶⁶

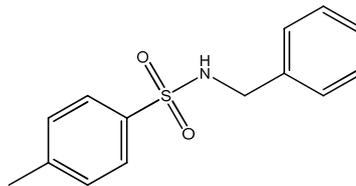


Abbildung 1.13: Chemische Struktur von *N*-Benzyl-*p*-toluensulphonamid (BTS).

Ein zielgerichtetes Hochdurchsatzauswahlprüfverfahren (*high-throughput screening*) einer Substanzbibliothek zur Ermittlung neuer Myosininhibitoren führte zur Entdeckung von *N*-Benzyl-*p*-toluensulphonamid (BTS), das eine halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} , *engl.*, half-maximal inhibitory concentration) von etwa $5 \mu\text{M}$ auf die Ca^{2+} -stimulierte ATPase von schnellem Skelettmuskel Myosin-2 S1 aufweist.⁶⁷ Es wurde nachgewiesen, dass BTS die Aktin-Myosin-Wechselwirkung schwächt und reversibel *in vitro* Motilität, sowie die Kraftentwicklung in Muskelfasern unterdrückt.

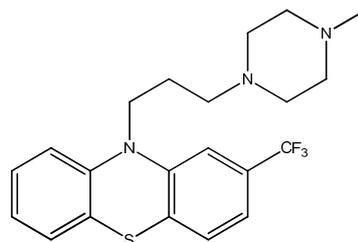


Abbildung 1.14: Strukturformel von Trifluoperazin (TFP).

Eine weitere Substanz, die maßgeblich die Myosin Mg^{2+} -ATPase Aktivität inhibiert, ist das Phenothiazinderivat Trifluoperazin (TFP). TFP ist lange bekannt als potenter Calmodulin-

Antagonist und wird in millimolaren Konzentrationen zur Entfernung der regulatorischen leichten Kette von der Myosinnackenregion glatter Muskulatur^{68,69} und gestreifter Muskulatur von Muscheln⁷⁰ verwendet. Des Weiteren wird angenommen, dass TFP, aufgrund der inhibitorischen Wirksamkeit auf die ATPase-Aktivität und Motilität, in geringeren Konzentration (100-200 μM) als für die Entfernung der leichten Kette benötigt (1-2 mM) mit der Myosin-Motordomäne interagiert.⁷¹ Trotz allem sind die genaue Bindungsstelle und der Wirkmechanismus von TFP bisher nicht bekannt.

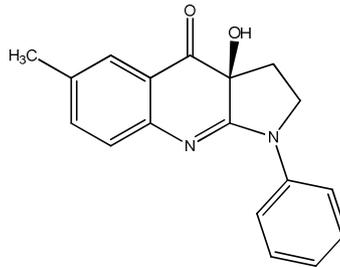


Abbildung 1.15: Struktur von (-)-Blebbistatin.

(-)-Blebbistatin wurde 2003 entdeckt und weist eine hohe Affinität und Selektivität für Myosin-2 auf.⁷² Myosine der Klassen 1, 5, 10, sowie Myosin-2 aus glatter Muskulatur sind wenig oder gar nicht beeinträchtigt, während Skelettmuskel und nichtmuskuläres Myosin-2 stark inhibiert werden ($\text{IC}_{50} = 0.5 - 2 \mu\text{M}$).^{72,73} Untersuchungen zeigten, dass das (+)-Blebbistatin Enantiomer keinen hemmenden Effekt auf Myosine besitzt. Die Kristallstruktur von *Dd* Myosin-2 im *pre-power stroke* Zustand mit gebundenem (-)-Blebbistatin (PDB Code: 1YV3) offenbarte die allosterische Bindungstasche in der Myosin-Motordomäne.⁷⁴ Blebbistatin bindet in einer hydrophoben Tasche an der Spitze des 50 kDa Spaltes, weniger als 4 Å entfernt von Schalter-1 und Schalter-2 des aktiven Zentrums. Der Inhibitor interagiert hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Myosin, bildet aber auch eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus. Der Mechanismus wurde durch umfangreiche kinetische Studien^{75,76} und strukturelle Analyse aufgeklärt. Durch die Interaktion mit den Schaltermotiven behindert Blebbistatin das Öffnen der Nukleotidbindungsstelle und verlangsamt damit die Abgabe des P_i . Blebbistatin hält die Myosin Motordomäne somit im schwach-aktungebundenen *pre-power stroke* ADP· P_i Zustand fest.

1.2 Malaria und Apicomplexa Parasiten

Jedes Jahr sterben weltweit über 15 Millionen Menschen an tropischen Infektionskrankheiten. Malaria, eine Plage der Menschheit seit je her, ist dabei eine der bedeutsamsten Infektionskrankheiten. 200-500 Millionen Menschen erkranken jährlich an Malaria, etwa 2 Millionen Menschen sterben an den Folgen der Infektion. Hauptsächlich betroffen sind heutzutage tropische und subtropische Gebiete, wobei 90 % der tödlichen Malariafälle in Afrika auftreten. Insgesamt leben mehr als ein Drittel der Weltbevölkerung in Malariagefährdeten Gebieten. Letale Malariaerkrankungen treten besonders bei Kindern unter 5 Jahren und Schwangeren auf. Malaria (*mal'aria, ital.*, schlechte Luft), auch Sumpfer oder Wechselfieber genannt, wird durch einzellige Parasiten (Protozoen) der Gattung *Plasmodium* verursacht. Zu den humanpathogenen *Plasmodium* Spezies gehören *Plasmodium vivax* (Malaria tertiana), *Plasmodium ovale* (Malaria tertiana), *Plasmodium malariae* (Malaria quartana), und *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica). Des Weiteren ist der Erreger *Plasmodium knowlesi* in Verdacht Menschen infizieren zu können.⁷⁷⁻⁷⁹ Die häufigste und gefährlichste Form der Malaria, Malaria tropica, wird durch den Erreger *Plasmodium falciparum* hervorgerufen.

1.2.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* wird ausschließlich durch den Stich einer weiblichen *Anopheles* Mücke auf den Menschen übertragen. Solch ein Wirtswechsel ist charakteristisch für Apicomplexa Parasiten und für die Entwicklung und Vermehrung des Parasiten unerlässlich. Dabei werden zwei Entwicklungsphasen der Malariaparasiten unterschieden, die ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) im Zwischenwirt, dem Menschen, sowie die geschlechtliche Vermehrung (Gamogonie oder Sporogonie) im Endwirt, der *Anopheles* Mücke.

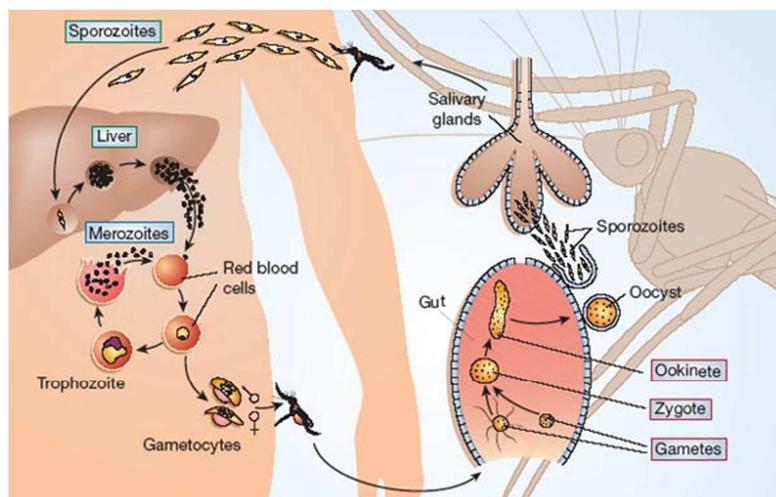


Abbildung 1.16: Der Lebenszyklus des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*.⁸⁰ Während der Entwicklung durchläuft der Erreger einen Wirtswechsel, vom Zwischenwirt Mensch in den Endwirt, der *Anopheles* Mücke. Der Zyklus im Menschen ist in zwei Phasen unterteilt, dem Leberzellenstadium und dem Blutstadium.

Durch den Speichel einer infizierten *Anopheles* Mücke gelangen etwa 10-20 motile *Plasmodium* Sporozoiten in den Blutkreislauf des Menschen. Über die Blutbahnen wandern die Parasiten zur Leber und befallen dort mittels Kupfferzellen die Hepatozyten (Leberzellen), in die sie sich einnisten und asexuell reproduzieren. Ein sogenannter Schizont bildet sich aus, der schließlich durch Zerfall eine Unmenge an modifizierten Parasiten, den Merozoiten, in die Blutbahnen freisetzt. Die Merozoiten sind in der Lage rote Blutkörperchen (Erythrozyten) zu befallen, in denen eine weitere ungeschlechtliche Vermehrung der Parasiten stattfindet. Während dieses Vermehrungszyklus' durchlaufen die Parasiten Ring, Trophozoit und Schizont Stadien, bis schließlich 16 bis 32 Tochtermerozoiten durch Platzen des Schizonts freigesetzt werden. Die freien Merozoiten können weitere Erythrozyten befallen und die asexuelle Vermehrung fortführen. Einige der Parasiten entwickeln sich im menschlichen Blutkreislauf zu weiblichen und männlichen Geschlechtsformen (Gametozyten), die durch das Blutmahl von einer *Anopheles* Mücke aufgenommen werden.

Im Darm der Mücke reifen die Gametozyten zu weiblichen (Makrogameten) und männlichen (Mikrogameten) Gameten, die sich miteinander vereinen zur sogenannten Zygote. Die Zygote wiederum entwickelt sich weiter zur motilen Ookinete, die durch den Mitteldarm wandert und sich schließlich als Oozyste einnistet, aus der sich eine Vielzahl an Sporozoiten bildet. Letztendlich gelangen die Sporozoiten in die Speicheldrüse der Mücke, aus der sie durch den Stich der Mücke erneut in den menschlichen Blutkreislauf eindringen.

Alle klinischen Symptome der Malaria, wie Fieber, Schwächegefühl, Kopf- und Gliederschmerzen, Durchfall, Husten und Erbrechen treten während des ungeschlechtlichen Vermehrungszyklus' im Blutstadium (erythrozytäre Schizogonie) auf.

1.2.2 Der Erreger – Apicomplexa

Apicomplexa (Sporentierchen) sind einzellige, eukaryotische, intrazelluläre Parasiten (Protozoen). Neben den Malariaerregern der Gattung *Plasmodium*, gehören noch andere Organismen mit großer medizinischer und veterinär-medizinischer Bedeutung zu den Apicomplexa, wie z.B. *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmose), *Eimeria* (Kokzidiose), *Isospora* (Kokzidiose), *Theileria* (Theileriose) und *Cryptosporidium* (Cryptosporidiose). Obwohl Apicomplexa vorrangig haploid vorliegen, bilden sie während ihrer komplexen Lebenszyklen Stadien aus, die zur Invasion bestimmter Zelltypen oder Gewebe dienen.⁸¹ Die Vermehrung der Parasiten findet durch Invasion von Wirtszellen statt und anschließender Replikation bis zur Lyse der Wirtszellen.

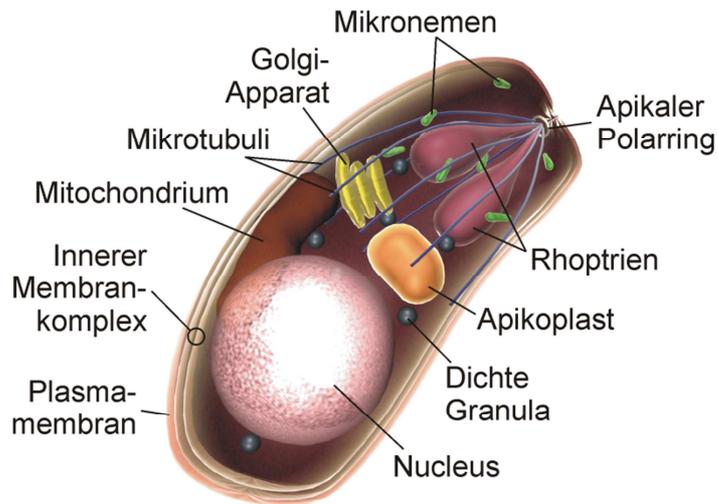


Abbildung 1.17: Schematische Darstellung eines Plasmodium Sporozoiten.

Apicomplexa Parasiten besitzen eine längliche Form (Abbildung 1.17). Charakteristisch und namensgebend für Apicomplexa ist eine Reihe einzigartiger Organellen, die zusammen als apikaler Komplex bekannt sind. Dazu gehört der apikale Polarring, der als Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC; *engl.*, microtubule-organizing center) fungiert, das Konoid, eine kegelförmige Spirale eines bisher unidentifizierten Filaments, das wahrscheinlich der Invasion von Wirtszellen dient, in einigen Apicomplexa, wie dem Malariaerreger *Plasmodium* allerdings nicht vorhanden ist, sowie die Rhoptrien und Mikronemen, Sekretionsorganellen, die Produkte für die Motilität, Adhäsion und Invasion von Wirtszellen und den Aufbau der parasitophoren Vakuole beinhalten. Weitere strukturelle Merkmale von Apicomplexa Parasiten sind das Vorhandensein eines Apikoplasten, eines dem pflanzlichen Chloroplasten ähnlichen Organells, sowie der Pellikula, eines dreischichtigen Membrankomplexes, der den gesamten Parasiten umgibt. Der äußere Teil der Pellikula wird durch die Plasmamembran gebildet, wohingegen nach Innen der Innere Membrankomplex (IMC; *engl.*, inner membrane complex) zeigt. Innerhalb der Pellikula finden sich eine Reihe typischer Elemente des Zytoskeletts eukaryotischer Systeme, wie z.B. Mikrotubuli, Aktin, sowie Myosin. Die Bewegung und aktive Penetration von Wirtszellen durch Apicomplexa bedient sich einer speziellen, Aktomyosin-abhängigen Bewegungsform, der gleitenden Motilität (*gliding motility*). Im Gegensatz zu anderen Protozoen benötigen Apicomplexa für diese aktive Bewegung keine Geißeln oder Zilien. Sie bewegen sich durch ein helikales Gleiten, ähnlich einem Korkenzieher.^{81,82} Die Bewegungs- und Invasionsmaschinerie, auch Glideosom genannt (Abbildung 1.18), ist in der Pellikula lokalisiert und besteht aus einem Multikomplex verschiedener Proteine.⁸³ Das unkonventionelle Motorprotein Myosin A ist über MTIP (*myosin tail interactin protein*) und die beiden Glideosom-assoziierten Proteine GAP45 und GAP50 in dem Inneren Membrankomplex verankert. Die Motordomäne des Myosins interagiert mit extrem kurzen Aktinfilamenten, welche wiederum mit dem Enzym Aldolase wechselwirken. Aldolase ist an die äußere Plasmamembran gebunden, sowie an TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*), einem Adhäsion, das wahrscheinlich die

entscheidende Bindung des parasitären Zytoskeletts zur Wirtszelle aufbaut, indem es an Rezeptoren der Leberzelle bindet, wie z.B. Glykosaminglykane.^{84,85} Parasitäres Aktin liegt vorrangig monomer vor^{86,87} und bildet in polymerer Form extrem kurze Filamente (etwa 100 nm lang), die einem schnellen Auf- und Abbau unterliegen.⁸⁸⁻⁹⁰ Die Invasion von Wirtszellen, Leberzellen oder Erythrozyten, beginnt mit der Bindung des apikalen Endes des Parasiten an die Wirtszelle unter Ausbildung einer sogenannten engen Kontaktbindung (*tight junction*). Diese Anbindung wird durch parasitäre Adhäsine, wie TRAP, vermittelt. Die Sekretionsorganellen Mikronemen und Rhoptrien geben dabei sequentiell Proteine ab, die zur Motilität, Wirtszellerkennung und –invasion beitragen.⁹¹ Die Zellmembran der Wirtszelle wird aufgeschlossen und die enge Kontaktstelle wandert, angetrieben durch das Aktomyosinsystem, vom apikalen Ende des Parasiten zum hinteren Teil und ermöglicht somit die Penetration.⁸³ Am hinteren Ende werden die Adhäsine durch bestimmte Proteasen wieder proteolytisch von den Rezeptoren getrennt. Der Parasit bildet während der Invasion die parasitophore Vakuole um sich herum aus, ein membrangebundenes Kompartiment in der infizierten Wirtszelle, in dem die Replikation des Parasiten stattfindet.

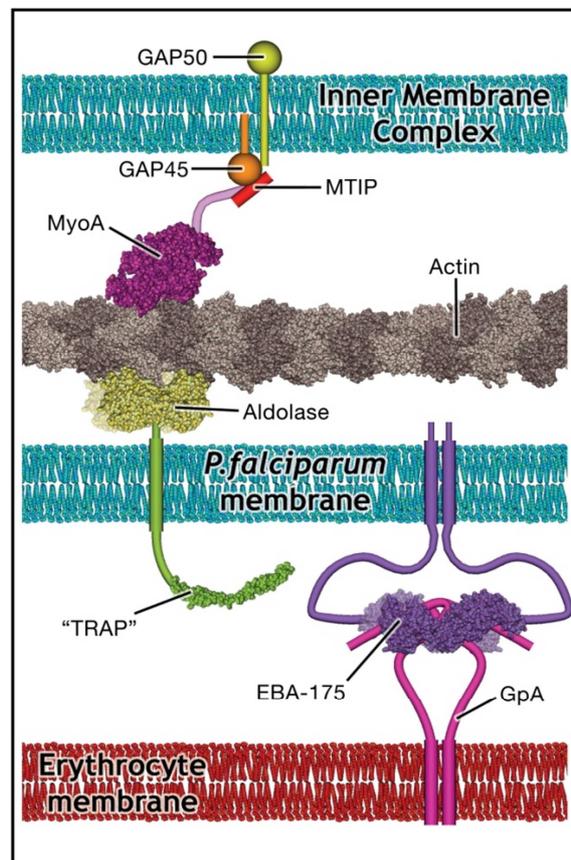


Abbildung 1.18: Modell des Gleideosoms und der Bindung eines *Pf* Merozoiten an einen Erythrozyten.⁹²

1.2.2.1 Pf Myosin A

Das für die Bewegung der *Plasmodium* Parasiten und Penetration von Wirtszellen essentielle Pf Myosin A (Pf MyoA) ist ein sehr kleines, schnelles, einköpfiges Myosin, von etwa 90 kDa und einer Länge von insgesamt 818 Aminosäuren. Es wird zu den unkonventionellen Myosinen der Klasse 14 gezählt und ist eins von sechs Myosinen, die in der Gattung *Plasmodium* vorkommen. An die N-terminale Motordomäne schließt sich eine kurze Nackenregion an, wohingegen eine Schwanzregion nicht vorhanden ist (vergleiche Abbildung 1.2). Im Gegensatz zu anderen Myosinisoformen fehlt der Nackenregion das klassische IQ Motiv. Allerdings findet sich dort ein stark degeneriertes IQ Motiv (Abbildung 1.19), das zur Interaktion mit MTIP dient. MTIP nimmt die Rolle der leichten Kette für das Pf Myosin A ein und verankert über die Wechselwirkung mit GAP45 und GAP50 das Myosin A im IMC.



Abbildung 1.19: Sequenzvergleich des degenerierten parasitären IQ Motivs in Pf Myosin A mit der konservierten Sequenz des IQ Motivs in der Nackenregion anderer Myosinisoformen.

Die kristallographische Analyse des C-terminalen Teils von *Plasmodium knowlesi* MTIP im Komplex mit der Nackenregion von *Plasmodium yoelii* Myosin A zeigte anschaulich die Details dieser Interaktion. Dabei bindet MTIP Ca^{2+} -unabhängig vorrangig an ein konserviertes Motiv aus drei basischen Aminosäuren RKK.⁹³

1.2.3 Bekannte Antimalaria-Wirkstoffe

Die derzeit zur Behandlung einer Malariainfektion eingesetzten Wirkstoffe lassen sich entsprechend ihrer Wirkweise in mindestens vier Gruppen einteilen, zuzüglich der Gruppe der Antibiotika, von denen einige Vertreter ebenfalls eine Antimalaria-Aktivität aufweisen.^{94,95}

Hemmer des Hämabbaus (4-Aminochinoline, Arylaminoalkohole)

Die Gruppe der Antiinfektiva, die eine Wirkung auf den parasitären Hämabbau besitzen, lässt sich in zwei chemisch-strukturelle Untergruppen einteilen: die 4-Aminochinoline und die Arylaminoalkohole. Während des asexuellen Vermehrungszyklus im Blutstadium verwertet der Malariaparasit den roten Blutfarbstoff Hämoglobin und baut das Globin ab. Dabei reichert sich das für den Parasiten toxische Häm an und wird deshalb vom Erreger zum schlecht löslichen Hämozoin polymerisiert. 4-Aminochinoline interferieren mit der Polymerisation des Häms zum ungiftigen Hämozoin und bilden stabile Komplexe mit den Häm-Metaboliten, was zum Absterben des Parasiten führt.^{96,97} Der exakte Mechanismus der Arylaminoalkohole ist weitestgehend unbekannt, beruht aber ebenfalls auf der Hemmung des Hämabbaus.⁹⁸

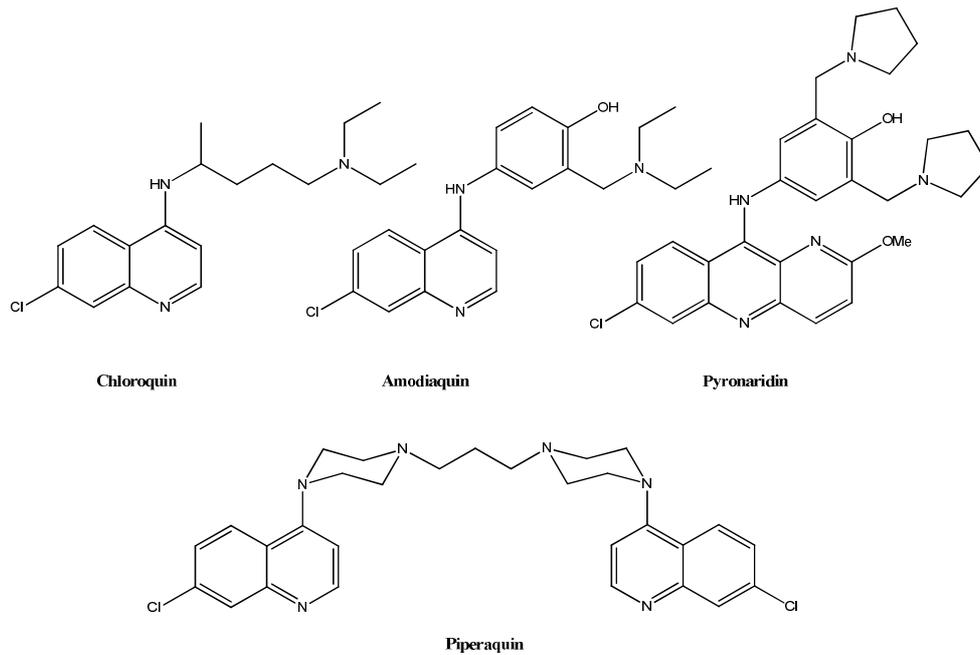


Abbildung 1.20: Chemische Strukturen gängiger 4-Aminochinoline.

Chemisch zeichnen sich 4-Aminochinoline durch eine substituierte Aminogruppe in Position 4 des Chinolinrings und einem Chlorsubstituenten in Position 7 aus. Zu dieser Gruppe von Wirkstoffen gehört der am verbreitetsten und am häufigsten eingesetzte Wirkstoff Chloroquin, der einen IC_{50} von etwa 15 nM (gegen den Parasitenstamm 3D7) aufweist.

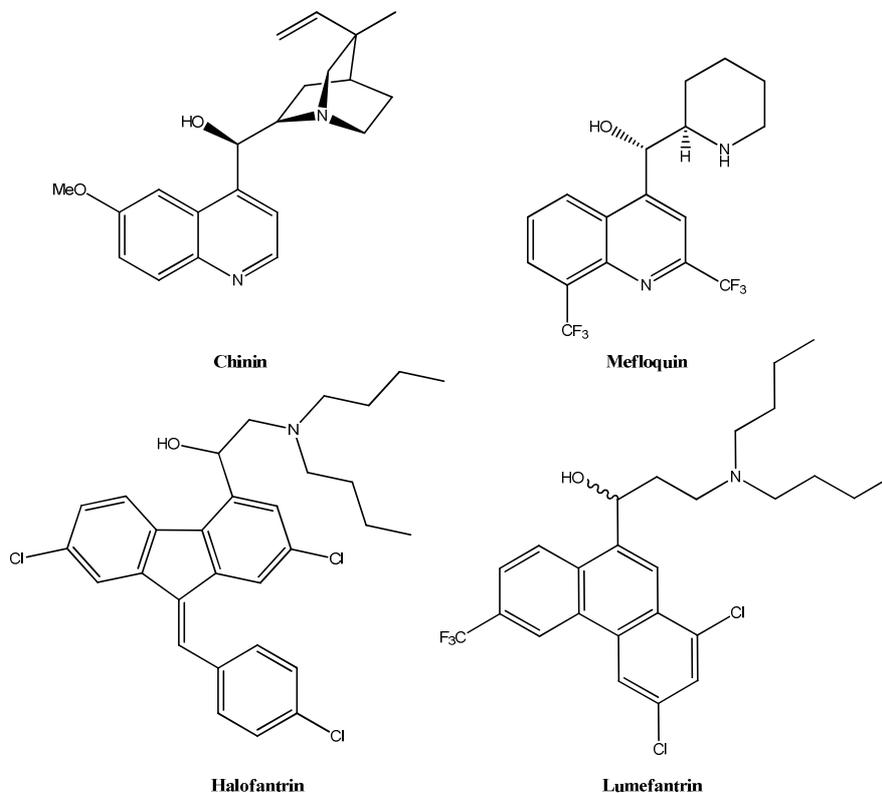


Abbildung 1.21: Arylaminoalkohole, die derzeit zur Therapie von Malaria benutzt werden.

Arylaminoalkohole besitzen, wie der Name sagt, ein aromatisches Grundgerüst, sowie eine sekundäre Alkoholgruppe und eine mehrfach substituierte Aminogruppe.

Hemmer des Folsäuremetabolismus' (Antifolate)

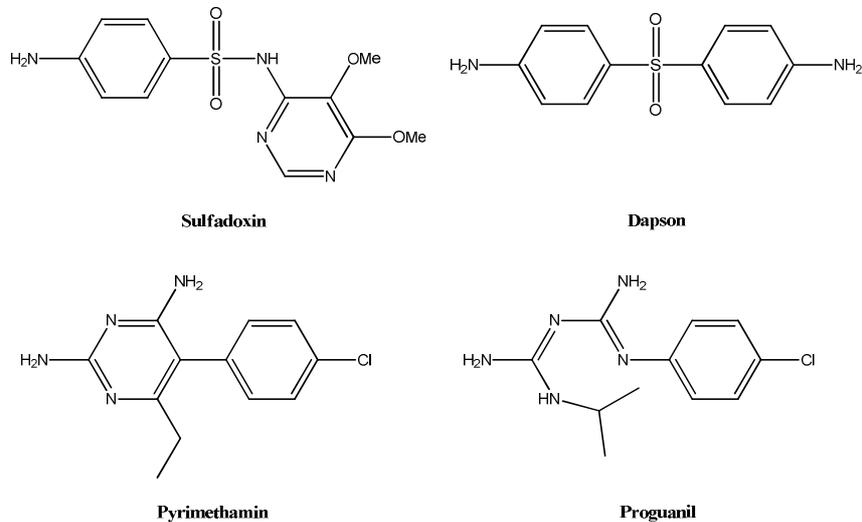


Abbildung 1.22: Chemische Strukturen verwendeter Antifolate. Sulfadoxin und Dapson agieren als Hemmer der Dihydropterat-Synthase, während Pyrimethamin und die aktive Form des Proguanil die Dihydrofolat-Reduktase hemmen.

Zu den Antifolaten werden sowohl die Inhibitoren der Dihydropterat-Synthase (Sulfadoxin, Dapson), wie auch die Hemmer der Dihydrofolat-Reduktase (Pyrimethamin, Proguanil) gezählt.^{94,95} Im Gegensatz zum Menschen, der Folsäure durch die Nahrung aufnimmt, sind Bakterien und Protozoen fähig die lebenswichtige Folsäure selbst zu synthetisieren. Dazu bedienen sie sich unter anderem der Enzyme Dihydropterat-Synthase und Dihydrofolat-Reduktase. Die Inhibitoren der Dihydropterat-Synthase gehören strukturell zu den Sulfonamiden, bzw. Sulfonen. Proguanil, ein Hemmer der Dihydrofolat-Reduktase, ist ein sogenanntes *Prodrug* und wird erst durch das Enzym Cytochrom-P450 in die aktive Form, dem Cycloguanil umgewandelt.

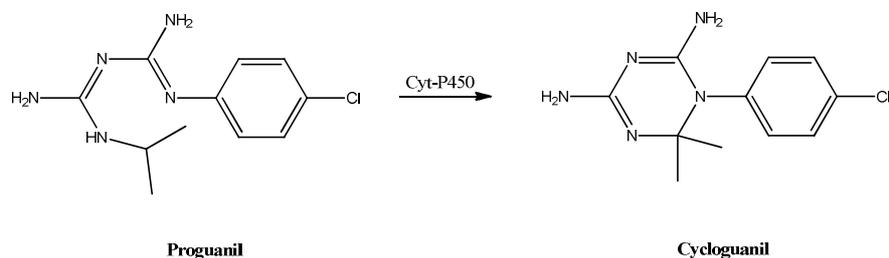


Abbildung 1.23: Die oxidative Cyclisierung des *Prodrugs* Proguanil durch Cytochrom-P450 überführt dieses in die aktive Form des Cycloguanils.

Hemmer der Atmungskette (Atovaquon, 8-Aminochinoline)

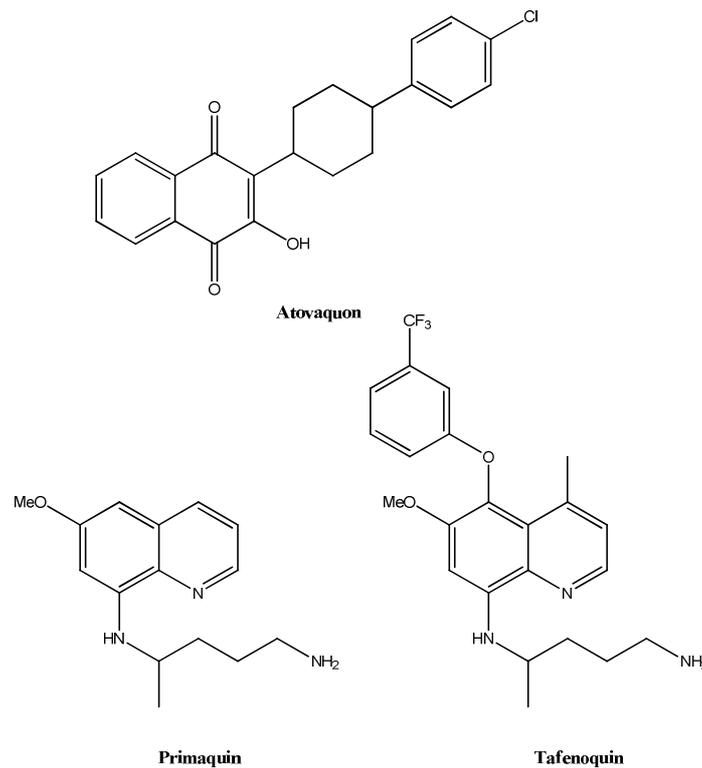


Abbildung 1.24: Strukturen der Antimalariastoffe, die die Atmungskette beeinflussen. Primaquin und Tafenoquin gehören chemisch der Gruppe der 8-Aminochinoline an.

Atovaquon agiert als Ubichinon-Antagonist und unterbricht somit den Elektronentransport der Atmungskette, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt und infolgedessen zum Absterben der Parasiten.^{99,100} Ubichinon ist ein Elektronenüberträger der Atmungskette. Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Metabolite der 8-Aminochinoline angenommen.⁹⁷ Primaquin besitzt, im Gegensatz zu allen anderen derzeit verwendeten Wirkstoffen, eine Aktivität gegen die Leberstadien, sowie das Gametozytenstadium der Parasiten.

Artemisinine

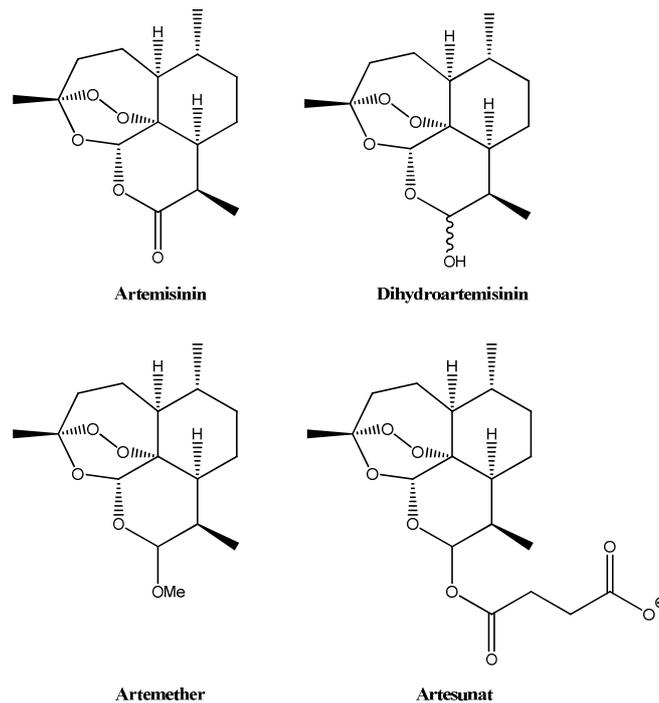


Abbildung 1.25: Die Antimalaria-aktiven Derivate des Naturstoffes Artemisinin.

Artemisinine gehören zu den schnellsten und wirksamsten Antimalaria-Wirkstoffen und leiten sich von dem aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) isolierten Sesquiterpenlacton Artemisinin ab. Die durch Reduktion des Lactonrings und Veresterung der halbacetalischen Hydroxylgruppe gewonnenen Derivate zeichnen sich durch bessere Löslichkeit und Aktivität aus. Artemisinine entfalten ihre Wirkung auf die Blutstadien der Parasiten in den roten Blutkörperchen, insbesondere auf die Ringstadien. Der Wirkmechanismus ist bisher nicht geklärt, wobei aber die Endoperoxidstruktur höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielt. Das Endoperoxid wird möglicherweise durch eine Eisen(II)-vermittelte Spaltung gebrochen und setzt Kohlenstoffradikale frei. Ob diese Radikale unspezifisch mit verschiedenen Proteinen und Häm reagieren¹⁰¹⁻¹⁰⁴, oder spezifisch an eine Calcium-ATPase (*Pf* ATP6) des parasitären Endoplasmatischen Retikulums (ER) binden und diese hemmen¹⁰⁵ ist ungeklärt.

Zusätzlich zu den spezifischen Antimalaria Wirkstoffen besitzen einige Antibiotika, wie Doxycyclin, Tetracyclin, Clindamycin u.a. eine Aktivität gegen Malariaparasiten, indem sie die bakterienähnliche Proteinbiosynthese in den parasitären Apikoplasten und Mitochondrien stören.^{99,106,107}

Viele der derzeit eingesetzten Antimalaria Wirkstoffe zeigen dramatische Nebenwirkungen, doch das akuteste und größte Problem ist die fortschreitende Resistenzbildung der Parasitenstämme gegen die gängigen Medikamente. Resistenzen haben sich aktuell gegen den Großteil der aufgezeigten Wirkstoffe entwickelt, weshalb meist Kombinationen von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen eingesetzt werden. Doch selbst diese

Maßnahme hat nur begrenzt Erfolg bei der Bekämpfung der schnell mutierenden Parasiten. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit völlig andersartigen Wirkmechanismen ein vielversprechender und notwendiger Ansatz, um die effektive Therapie der Malariainfektion auch weiterhin zu ermöglichen.

1.3 Zielsetzung

Die starke Verbreitung und das Auftreten von Resistenzen gegen verfügbare Wirkstoffe stellen aktuelle Probleme der Malariabekämpfung dar (s. Kapitel 1.2.3). Um die vorherrschenden Resistenzen von Parasitenstämmen zu umgehen und einen schnellen Resistenzaufbau der Erreger möglichst zu verhindern, werden Hemmstoffe benötigt, denen vollkommen neuartige Wirkmechanismen zugrunde liegen. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Arbeit neue Inhibitoren des Aktomyosinsystems, bzw. der Myosin-Motoraktivität entwickelt werden, die als Leitstrukturen für neuartige antiparasitäre Wirkstoffe dienen können. Das parasitäre Aktomyosinsystem ist maßgeblich an mindestens zwei Invasionsprozessen während der Infektion durch den Malariaparasiten beteiligt: Der Invasion menschlicher oder tierischer Hepatozyten durch die Malariasporozoit, sowie das Eindringen der Merozoitenform des Erregers in die Erythrozyten des Blutkreislaufes (s. Kapitel 1.2.2). Die Motilität der Parasiten während der Invasion wird durch das Gleiten von Myosin A entlang von kurzen Aktinfilamenten erzielt. Wirkstoffe, die diese Invasionsprozesse gezielt und effektiv zu hemmen vermögen, besitzen ein großes therapeutisches Potential.

Dazu sollen in dieser Arbeit zunächst neue und bereits in der Literatur beschriebene Modulatoren der Myosin-Aktivität mittels biophysikalischer Methoden untersucht werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die strukturelle Analyse der Bindungsmodi und Bindungseigenschaften der Substanzen gelegt. Die Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser Verbindungen werden an dem in der Myosinforschung weit verbreiteten Modellsystem des Myosinmotors, dem *Dd* Myosin-2 stattfinden, da dieses leicht und in großem Maßstab zugänglich ist. Zusätzlich soll die Auswirkung einer hemmenden Punktmutation in der Myosin-Motordomäne untersucht werden. Die Analyse der strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Mutation auf die Motoraktivität dient dem Verständnis der intrinsischen Allosterie in der Motordomäne (s. Kapitel 1.1.2), sowie der möglichen Modulation des komplexen Zusammenspiels verschiedener Proteindomänen.

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Studien der Beeinflussung der *Dd* Myosin-2 Aktivität sollen im zweiten Schritt in die *de novo* Entwicklung neuer Inhibitoren des parasitären *Pf* Myosin A einfließen. Auf Basis hochaufgelöster Röntgenstrukturen der Myosin-Motordomäne sollen Modelle der *Pf* Myosin A Motordomäne erstellt werden und durch computergestütztes Design sollen neue Substanzen an die Bindungsverhältnisse in Myosin A angepasst und generiert werden. Die potentiellen Inhibitoren werden zunächst *in silico* auf ihre Aktivität getestet und vielversprechende Substanzen werden anschließend chemisch

synthetisiert. Um ihre Aktivität und Spezifität zu bestimmen werden die erzeugten Verbindungen sowohl auf ihre hemmende Wirksamkeit gegenüber unterschiedlichen Myosinisoformen durch den Einsatz verschiedener biophysikalischer und funktionaler Methoden getestet, als auch auf die Fähigkeit der Inhibition des *Plasmodium falciparum* Parasiten und damit auf ihre Antimalariaaktivität.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aceton	J. T. Baker
Acetylchlorid	Fluka
Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0.8), 40%	Sigma-Aldrich
Adenosin-5'-diphosphat, Natriumsalz (ADP)	Fluka
Adenosin-5'-triphosphat, Natriumsalz (ATP)	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Benzamidin-Hydrochlorid	Merck
Benzylamin	Acros Organics
Benzylbromid	Sigma-Aldrich
3-(Brommethyl)pyridin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
N-(tert-Butoxycarbonyl)piperazin (N-BOC-Piperazin)	Acros Organics
Calciumchlorid	Merck
Celite	Acros Organics
1-(Chlormethyl)naphthalen	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
N,N-Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Eisenchlorid-Hexahydrat (FeCl ₃ ·6 H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	J. T. Baker
Essigsäurepentylester (Amylacetat)	Fluka
Ethanol	J. T. Baker
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid	Acros Organics
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethylenglykol	Merck
Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
4-Hydroxyphenylacetonitril	Sigma-Aldrich
4-Hydroxyphenylethylsäuremethylester	Acros Organics
Imidazol	BDH Laboratory Supplies
Isopropanol (2-Propanol)	Merck

Kaliumacetat	Merck
Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kaliumiodid	Sigma-Aldrich
Kieselgel	Acros Organics
Lithiumhydroxid·Monohydrat (LiOH·H ₂ O)	Acros Organics
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumchlorid·Hexahydrat (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	Merck
Magnesiumsulfat	Acros Organics
β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol)	Sigma-Aldrich
Methanol	J. T. Baker
2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)	Fluka
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid / Natronlauge	Merck
Natriumsulfat	Merck
Nickelsulfat·Hexahydrat (NiSO ₄ ·6 H ₂ O)	Merck
Nickel-Nitriltriacetat-Säulenmaterial "superflow" (Ni-NTA)	Qiagen
Nicotinamadenindinukleotid, reduziert (NADH)	Roche
Nitrozellulose	Fluka
Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Roche
Polyethylenglykol (PEG)	Fluka
Polyethylenglykol-Monomethylether (PEG-MME)	Fluka
Propan-1,2,3-triol (Glycerin)	Sigma-Aldrich
Pyridin	Acros Organics
Saccharose	Sigma-Aldrich
Salzsäure (37%)	Roth
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat (Tritc)-Phalloidin	Sigma-Aldrich
<i>N</i> _α -Tosyl-L-lysinchloromethylketon-hydrochlorid (TLCK)	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Triton X-100	Merck

2.1.2 Geräte

CCD Detektor Proteum Pt ¹³⁵	Bruker
Fluoreszenzmikroskop IX70	Olympus
FPLC-Anlage Äkta purifier 10	Amersham
Geldokumentationssystem ChemiDoc	Biorad
Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 superdex 200 PG	Amersham
Kristallisationsroboter Phoenix	Art Robbins Instruments
Mikroskop CK 2	Olympus
Multiphotometer Multiskan FC	Thermo
Photometer DU 800	Beckmann Coulter
Pipetten 2-1000 µl	Gilson
Röntgendiffraktometer Proteum X8	Bruker
Rotor JA 25.50	Fullerton
Rotor JLA 16.250	Fullerton
Rotor TLA 120.1	Fullerton
Säule: XK16	Amersham
Säulenmaterial Ni-NTA superflow	Qiagen
SDS-PAGE Apparatur Mini-Protean	Biorad
Spannungsquelle Power-Pac 300	Biorad
Spektrometer AM-200	Bruker
Spektrometer AVS-400	Bruker
Ultraschallgerät Sonoplus UW 2200	Bandelin Electronic
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckmann Coulter
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Microfuge 22R	Beckmann Coulter

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP)	Roche
Catalase	Sigma-Aldrich
Glucose-Oxidase	Sigma-Aldrich
Laktatdehydrogenase (LDH) 550 U/mg	Roche Diagnostics
Pyruvatkinase (PK) 200 U/mg	Roche Diagnostics
Ribonuklease A (RNase A)	Serva
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich

2.1.4 Antikörper

Monoklonaler Maus-IgG Anti-(His)₅-Antikörper 0.2 mg/ml Qiagen

2.1.5 Organismen

Dictyostelium discoideum AX3 ORF⁺ Dietmar J. Manstein¹⁰⁸

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 UV-spektroskopische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen mit aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tryptophan- und Tyrosinresten, wurde die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und die anschließende Ermittlung mittels des Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz verwendet.

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

Störende Hintergrundsignale von Pufferbestandteilen, die ebenfalls bei 280 nm absorbieren und somit die Messung verfälschen, wurden durch Leerwertmessung des reinen Puffers ohne gelöstes Protein beseitigt.

2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)¹⁰⁹ wurde zur Bestimmung der Reinheit bei der präparativen Aufreinigung von *Dd* Myosin-2 verwendet. Das Protein wurde vor der Elektrophorese mit Laemmli-puffer versetzt und 2-5 min. auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese fand in einer Minigelkammer durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 30 mA für etwa 1,5 Stunden statt. Das Analysegel bestand aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Probe wurde das Gel durch Erhitzen in Coomassie-Färbelösung angefärbt und anschließend in 7 % Essigsäure unter Erhitzen entfärbt. Dokumentation erfolgte über das ChemiDoc Dokumentationssystem.

Proteinstandard:

MBI Fermentas Protein Ladder, 10-200 kDa

(14 Fragmente definierter Größe: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 15, 10 kDa)

6x Laemmli-puffer:

200 mM	Tris-HCl, pH 6.8
50 %	Glycerin
3.0 %	SDS
3.2 %	β -Mercaptoethanol
1.6 %	Bromphenolblau

10x Laufpuffer:

250 mM	Tris-HCl, pH 8.3
1.9 M	Glycin
1.0 %	SDS

Trenngel (10 %):

3.3 ml	40 % Acrylamid / Bisacrylamid
2.8 ml	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
1.0 ml	1 % SDS
2.9 ml	H ₂ O
30 μ l	TEMED
30 μ l	40 % APS

Sammelgel (5 %):

250 μ l	40 % Acrylamid / Bisacrylamid
190 μ l	1 M Tris-HCl, pH 6.8
150 μ l	1 % SDS
960 μ l	H ₂ O
5 μ l	TEMED
5 μ l	40 % APS

Coomassie-Färbelösung:

0.2 %	Coomassie Blue R250
0.05 %	Coomassie Blue G250
42.6 %	Ethanol abs.
5 %	Methanol abs.
10 %	Essigsäure

2.2.3 Präparative Aufreinigung von *Dictyostelium discoideum* Myosin-2

Das rekombinante *Dd* Myosin-2 Konstrukt (M765-SSB), 765 Aminosäuren der Myosin Motordomäne mit N-terminalem (His)₇ - Affinitäts-tag und C-terminaler Erweiterung durch 14 Aminosäuren des SSB Proteins¹¹⁰, wurde in *Dictyostelium discoideum* Zellen exprimiert und durch Extraktion und anschließender chromatographischer Trennung mit einer FPLC-Anlage aufgereinigt.

12-16 l Schüttelkultur der exprimierenden *Dictyostelium discoideum* Zellen werden bei einer Dichte von etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ geerntet und durch Zentrifugation für 10 min bei 4200 min⁻¹ pelletiert. Die gesamte Aufreinigung wird bei 4 °C durchgeführt. Die Pellets werden mit 0.5 l kaltem PBS Puffer gewaschen und erneut bei 4200 min⁻¹ zentrifugiert. Nach Bestimmung des Nassgewichts des Pellets (zwischen 20 und 60 g aus 12 l Schüttelkultur) wird es in 4 - 8 ml Lysispuffer pro Gramm Zellen resuspendiert. Das Gemisch wird für eine Minute mit Ultraschall behandelt. 2 - 4 ml Lysispuffer, dem 1 % Triton X-100, 15 μ g·ml⁻¹ Ribonuklease A und 100 U alkalische Phosphatase zugefügt wurden, werden hinzugegeben und das Zelllysat wird für 1 Stunde unter leichtem Rühren auf Eis inkubiert. Anschließend

wird die Proteinlösung bei 42000 min^{-1} zentrifugiert, die Pellets mit 2x 60 ml Extraktionspuffer gewaschen und erneut bei 42000 min^{-1} über 45 min pelletiert. Das Pellet wird in 1.6 ml Extraktionspuffer pro Gramm Zellen, dem 15 mM ATP zugegeben wurden, aufgenommen und 1 Stunde bei 60000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand wird abgetrennt und durch einen Filter mit einer Porengröße von $0.45 \mu\text{m}$ sterilfiltriert. Die Analyse der einzelnen Fraktionen während der Aufreinigung erfolgt mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die endgültige Aufreinigung des *Dd* Myosin-2 Konstrukts wird mittels Ni-NTA Affinitäts-chromatographie und anschließender Gelfiltration durchgeführt.

Nickel-Nitrilacetat (Ni-NTA) Affinitätschromatographie:

Vor der chromatographischen Aufreinigung des Myosins wird die Ni-NTA Säule zunächst durch Spülen mit jeweils einem Säulenvolumen Imidazol- und Hochsalzpuffer, sowie 10 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Der sterilfiltrierte Überstand wird unter Verwendung einer Superschleife (*superloop*) mit einer Flussrate von $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ auf die Säule geladen. Anschließend wird die Säulen mit 10 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer, 5 Säulenvolumina Hochsalzpuffer und 5 Säulenvolumina 5 % Imidazolpuffer in Niedrigsalzpuffer beladen. Elution des Proteins erfolgt über 4 Säulenvolumina mit einer Flussrate von $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durch einen Gradienten von 5 - 100 % Imidazolpuffer, der dem Niedrigsalzpuffer hinzugefügt wird. 1.5 ml Fraktionen werden gesammelt und über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Die entscheidenden Fraktionen werden vereint und über Nacht gegen 2 l GF-Niedrigsalzpuffer dialysiert.

Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie):

Um eine höhere Reinheit der Myosine für die Kristallisation zu erhalten, wird als letzter Schritt der Aufreinigung eine Gelfiltration durchgeführt. Die Gelfiltration findet in einer fertig gepackten HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule statt. Die dialysierte Proteinlösung wird durch Verwendung einer 7.8 ml Probenschleife (*sample loop*) auf die Säule geladen. Als Laufmittel wird GF-Puffer bei einer Flussrate von $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ verwendet. 0.5 ml Fraktionen werden gesammelt und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

Nach beendeter chromatographischer Aufreinigung wird die Proteinlösung mithilfe von Vivaspin Konzentratoren ($M_w \text{ cut-off} = 50 \text{ kDa}$) der Firma Vivascience AG aufkonzentriert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Für die Kristallisation wurden typische Konzentrationen von $> 10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ verwendet.

PBS Puffer, pH 7.4:

8 mM	Na_2HPO_4
1.8 mM	KH_2PO_4
140 mM	NaCl
2.5 mM	KCl

Imidazolpuffer:

500 mM	Imidazol, pH7.3
50 mM	HEPES, pH 7.3
30 mM	KOAc
3 mM	Benzamidin

Lysispuffer:

50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
2 mM	EDTA
0.2 mM	EGTA
1.0 mM	DTT
5.0 mM	Benzamidin
40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	TLCK
1 %	Proteaseinhibitor Mix 1
0.1 %	Proteaseinhibitor Mix 2

Extraktionspuffer:

50 mM	HEPES, pH 7.3
30 mM	KOAc
15 mM	Mg(OAc) ₂
7 mM	β -Mercaptoethanol
5 mM	Benzamidin
0-500 mM	KCl
15 mM	ATP

100x Proteaseinhibitor Mix 1 (in EtOH abs.):

10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	TAME
8 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	TPCK
0.2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Pepstatin A
0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	Leupeptin

1000x Proteaseinhibitor Mix 2 (in EtOH abs.):

100 mM	PMSF
--------	------

Niedrigsalzpuffer:

50 mM	HEPES, pH 7.3
30 mM	KOAc
3 mM	Benzamidin

Hochsalzpuffer:

50 mM	HEPES, pH 7.3
300 mM	KOAc
3 mM	Benzamidin

GF-Puffer:

50 mM	Tris-HCl, pH 7.5
0.5 mM	EDTA
0.2 mM	EGTA
1.0 mM	Mg(OAc) ₂
1.0 mM	DTT
1.0 mM	Benzamidin
150 mM	KCl

2.2.4 Präparation von F-Aktin

Filamentöses Aktin (F-Aktin) wurde aus in Form von Acetonpulver vorliegendem G-Aktin unter Variation der Ionenstärke durch mehrfaches Polymerisieren und Depolymerisieren gewonnen.¹¹¹

5 g G-Aktin Acetonpulver wird in 100 ml kaltem Aktinpuffer suspendiert und für 30 min bei 4 °C gerührt. Die Suspension wird unter Vakuum filtriert und bei 30000 min^{-1} und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wird abgetrennt und die Polymerisation durch Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂ eingeleitet und durch anschließende Inkubation über 1 Stunde bei Raumtemperatur abgeschlossen. Das erhaltene F-Aktin wird durch Zentrifugation bei 30000 min^{-1} und 4 °C pelletiert und nach Entfernen des Überstands in 50 ml

Depolymerisationspuffer homogenisiert. Das Gemisch wird durch Dialyse gegen 5 l Depolymerisationspuffer bei 4 °C über Nacht entsalzt und anschließend durch Zentrifugation bei 30000 min⁻¹ und 4 °C von unlöslichen Bestandteilen befreit. Der Überstand wird abgetrennt und durch erneute Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCl₂, sowie Inkubation über 1 Stunde bei Raumtemperatur polymerisiert. Die für Experimente verwendete F-Aktin Lösung wird schließlich durch erneute Pelletierung bei 30000 min⁻¹ und 4 °C und Homogenisierung in den gewünschten Experimentpuffern erhalten.

Aktinpuffer:

10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
0.2 mM	CaCl ₂
1.0 mM	DTT
0.5 mM	ATP

Depolymerisationspuffer:

5.0 mM	Tris-HCl, pH 7.5
0.2 mM	CaCl ₂
1.0 mM	NaN ₃
0.1 mM	ATP

2.3 Organisch-chemische Methoden

2.3.1 Lösemittel

Alle verwendeten Lösemittel wurden ausschließlich destilliert verwendet. Absolute Lösemittel wurden nach bekannten Vorschriften¹¹² getrocknet und über Molsieb, Calciumhydrid oder Natrium gelagert. Dichlormethan wurde über Calciumhydrid und Tetrahydrofuran wurde über Natrium/Benzophenon unter Stickstoffatmosphäre destilliert. Diethylether und Acetonitril wurden dem Lösemittelschrank MB SPS Solvent Purification System der Firma Braun entnommen.

2.3.2 Instrumentelle Analytik

Deuterierte Lösemittel

Zur Messung der NMR-Spektren wurden die folgenden vollständig deuterierten Lösemittel der Firma Deutero GmbH benutzt: Chloroform, N,N-Dimethylsulfoxid und Methanol.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahmen der in dieser Arbeit dargestellten Kernresonanzspektren erfolgte mit den Spektrometern AM-200, AVS-400 und AVS-500 der Firma Bruker.

Massenspektrometrie

Alle Massenspektren der Verbindungen wurden mit dem Massenspektrometer Micromass-LCT der Firma Waters durch Elektronensprayionisation (ESI) aufgenommen.

Säulenchromatographie

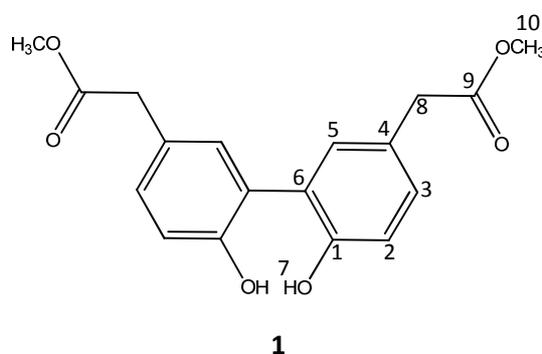
Als stationäre Phase für die säulenchromatographische Trennung wurde Kieselgel (Korngröße 35-70 μm , Porendurchmesser 60 \AA) der Firma Acros Organics verwendet.

Analytische Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien 60F₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck durchgeführt.

2.3.3 Synthese der Verbindungen

2.3.3.1 Darstellung von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**1**)



Kieselgel (3.62 g) wird zu einer Lösung von $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1.76 g, 6.51 mmol) in 95 ml Diethylether und 5 ml Methanol bei Raumtemperatur hinzugefügt und für 5 Minuten gerührt. Das Reaktionsgemisch wird unter vermindertem Druck konzentriert und der erhaltene gelbe Feststoff wird für mindestens 18 Stunden im Hochvakuum (1.5 mbar) bei 55 $^\circ\text{C}$ gerührt, währenddessen sich der Farbstoff grünlich färbt. (4-Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**2**) (61.7 mg, 0.37 mmol) in 15 ml Dichlormethan wird bei Raumtemperatur zu dem grünlichen Feststoff hinzugefügt. Nach gründlichem Rühren des Gemisches wird das Lösemittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der erhaltene schwarze Feststoff wird im Vakuum (1.5 mbar) bei 60 $^\circ\text{C}$ gerührt. Nach 60 Stunden wird der Feststoff in 25 ml Methanol aufgenommen und über Celite[®] filtriert. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt durch Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (erste Säule: Petrolether/Essigsäureethylester 1:1 V/V; zweite Säule:

Petrolether/Essigsäureethylester 2:1 V/V). Das Produkt **1** wird nach Entfernen der Lösemittel als hochviskoses, farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 40.26 mg (0.12 mmol, 33 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

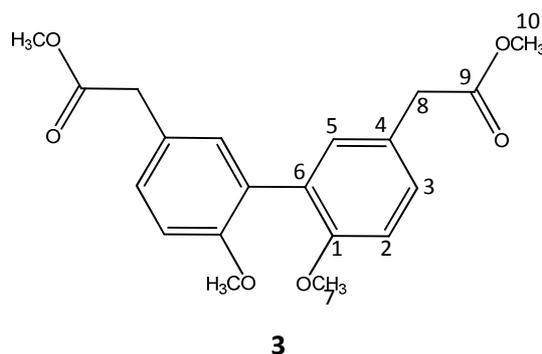
δ [ppm] = 7.17 (dd, ⁴J = 2.39 Hz, ³J = 8.19 Hz, 2H, H-3), 7.14 (d, ⁴J = 2.39 Hz, 2H, H-5), 6.91 (d, ³J = 8.19 Hz, 2H, H-2), 6.21 (bs, 2H, H-7), 3.70 (s, 6H, H-10), 3.59 (s, 4H, H-8).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 172.73 (C-9), 152.16 (C-1), 132.18 (C-5), 130.59 (C-3), 126.71 (C-4), 124.26 (C-6), 117.09 (C-2), 52.21 (C-10), 40.18 (C-8).

HRMS (ESI) berechnet für C₁₈H₁₈O₆ [M+Na]⁺: 353.1003; gefunden 353.1001.

2.3.3.2 Darstellung von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-diacetat (**3**)



Kaliumcarbonat (0.11 g, 0.78 mmol) wird zu einer Lösung des Biphenyldiessigsäuremethylesters (**1**) (0.12 g, 0.36 mmol) in 1 ml trockenem DMF unter Rühren bei Raumtemperatur hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird auf 50 °C erhitzt und für 45 Minuten gerührt, bevor es auf Raumtemperatur abgekühlt wird und mit einer Lösung von Methyljodid (0.05 ml, 0.85 mmol) in 0.1 ml trockenem DMF langsam versetzt wird. Die Lösung wird 14 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Gemisch durch Zugabe von 13 ml destilliertem H₂O gequenchet und die organische Phase abgetrennt und dreimal mit 3 ml Dichlormethan extrahiert. 2.6 ml 10% Natronlauge wird zu den vereinten organischen Phasen gegeben und für 2 Stunden gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit 3 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zweimal mit 2 ml destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit einem Lösemittelgemisch von Petrolether/Essigsäureethylester 2:1 V/V gereinigt und als farbloses Öl **3** erhalten.

Ausbeute: 0.12 g (0.32 mmol, 90 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

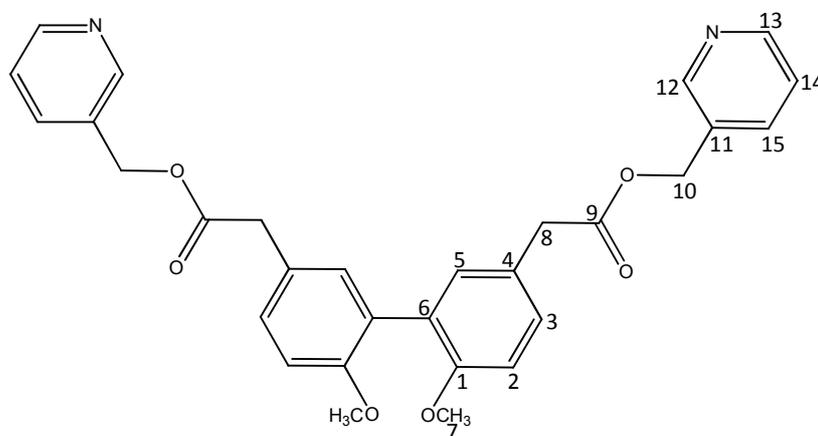
δ [ppm] = 7.24 (dd, $^4J = 2.05$ Hz, $^3J = 8.53$ Hz, 2H, H-3), 7.15 (d, $^4J = 2.05$ Hz, 2H, H-5) 6.92 (d, $^3J = 8.53$ Hz, 2H, H-2), 3.76 (s, 6H, H-10), 3.69 (s, 6H, H-7), 3.59 (s, 4H, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 172.37 (C-9), 156.20 (C-1), 132.36 (C-5), 129.41 (C-3), 127.57 (C-6), 125.68 (C-4), 111.19 (C-2), 55.80 (C-7), 52.01 (C-10), 40.35 (C-8).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$:381.1416; gefunden 381.1314.

2.3.3.3 Darstellung von Bis(pyridin-3-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxybiphenyl-3,3'-diyl)-diacetat (**8**)



8

Der Methylester **3** (0.01 g, 0.03 mmol) wird in einem Gemisch von 0.66 ml THF/ H_2O 1:1 V/V aufgenommen und mit Lithiumhydroxid-Monohydrat (2.1 mg, 8.81 mmol) bei Raumtemperatur versetzt und anschließend für 2.5 Stunden gerührt. Die gelbe Lösung wird durch Zugabe von 0.5 ml 1 M Salzsäure gequenchet, die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit je 1 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösemittel befreit. Die erhaltene Säure (**4**) wird direkt, ohne weitere Aufreinigung für die Veresterung eingesetzt.

Die Säure **4** (ca. 0.03 mmol) wird in 2 ml Acetonitril aufgenommen. 3-(Brommethyl)pyridin (**5**) (0.02 g, 0.066 mmol) und Kaliumcarbonat (8.3 mg, 0.06 mmol) werden zu dem Reaktionsgemisch gegeben und 20 Stunden bei 35 °C erhitzt. Anschließend wird 0.7 ml destilliertes Wasser bei Raumtemperatur zu der Reaktionsmischung gegeben. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit 1 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Produkt **8** wird durch

Säulenchromatographie mit einem Lösemittelgemisch von Dichlormethan/ Methanol 6:1 V/V gereinigt und als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 7.6 mg (0.0148 mmol, 25%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

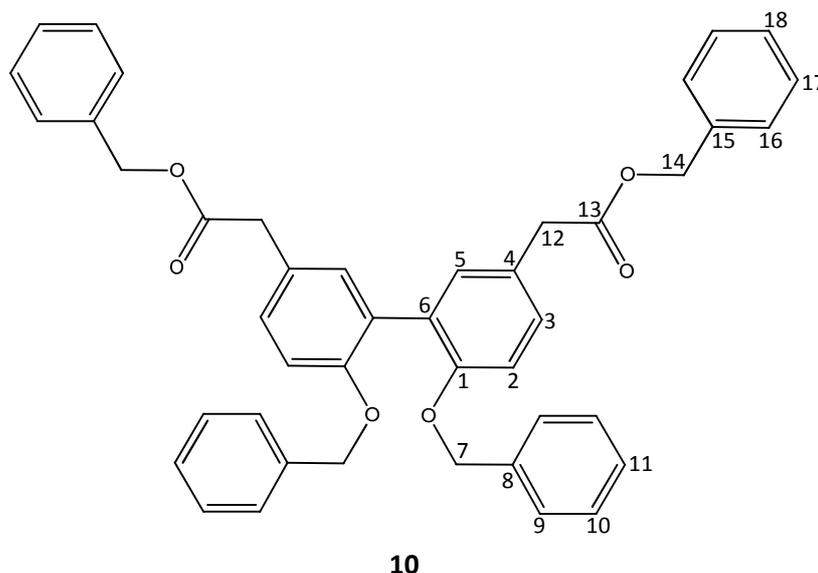
δ [ppm] = 8.60 (m, 2 H, H-12), 8.56 (d, ³J = 4.09 Hz, 2H, H-13), 7.63 (m, 2H, H-15), 7.62 (m, 2H, H14), 7.23 (dd, ⁴J = 2.39 Hz, ³J = 8.19 Hz, 2H, H-3), 7.12 (d, ⁴J = 2.39 Hz, 2H, H-5), 6.91 (d, ³J = 8.19 Hz, 2H, H-2), 5.15 (s, 4H, H-10), 3.75 (s, 6H, H-7), 3.64 (s, 4H, H-8).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 171.56 (C-9), 156.30 (C-1), 149.58 (C-12), 135.92 (C-13), 133.76 (C-15), 132.30 (C-11), 129.45 (C-5), 128.81 (C-3), 127.61 (C-6), 125.29 (C-4), 123.44 (C-14), 111.24 (C-2), 68.16 (C-10), 55.81 (C-7), 40.36 (C-8).

HRMS (ESI) berechnet für C₃₀H₂₉N₂O₆ [M+H]⁺: 513.2026; gefunden 513.2009.

2.3.3.4 Darstellung von Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis(benzyloxy)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-diacetat (**10**)



Lithiumhydroxid·Monohydrat (2.6 mg, 0.11 mmol) wird zu einer Lösung aus **1** (9.3 mg, 0.028 mmol) in 0.66 ml THF/H₂O 1:1 V/V gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 0.5 ml 1 M Salzsäure hinzugefügt, die organische Phase abgetrennt und die wäßrige Phase viermal mit je 1 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösemittel befreit. Die erhaltene Säure (**7**) wird direkt, ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt.

Die erhaltene Säure **7** (ca. 0.028 mmol) wird in 2 ml Aceton gelöst. Nacheinander werden Benzylbromid (**9**) (14.73 µL, 0.12 mmol) und Kaliumcarbonat (0.017 g, 0.12 mmol) hinzugefügt und 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird

abfiltriert und das Filtrat mit 0.7 ml destilliertem Wasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 1ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Säulenchromatographie mit einem Lösemittelgemisch von Petrolether/Essigsäureethylester 3:1 V/V ergibt das Produkt **10** als farbloses Öl.

Ausbeute: 6.3 mg ($9.51 \cdot 10^{-3}$ mmol, 34 %)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

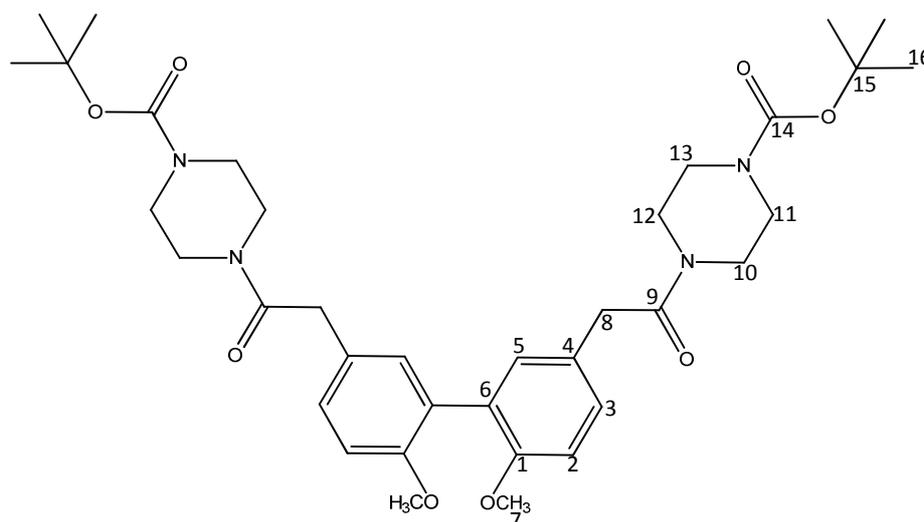
δ [ppm] = 7.30 (m, 10H, H-5, H-9, H-16), 7.22-7.16 (m, 14H, H-3, H-10, H-11, H-17, H-18), 6.92 (d, $^3J = 8.88$ Hz, 2H, H-2), 5.12 (s, 4H, H-14), 4.98 (s, 4H, H-7), 3.63 (s, 4H, H-12).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 171.67 (C-13), 155.40 (C-1), 137.46 (C-8), 135.95 (C-15), 132.56 (C-5), 129.35 (C-3), 128.52 (C-10), 128.52 (C-10), 128.40 (C-17), 128.28 (C-11), 128.22 (C-6), 128.16 (C-18), 127.33 (C-9), 126.61 (C-16), 125.98 (C-4), 113.07 (C-2), 70.36 (C-7), 66.53 (C-14), 40.51 (C-12).

HRMS (ESI) berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{38}\text{O}_6$ Na $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 685.2566; gefunden 685.2579.

2.3.3.5 Darstellung von Di-*tert*-butyl-4,4'-(2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-bis(acetyl))-bis-(piperazine-1-carboxylat) (**13**)



13

Lithiumhydroxid·Monohydrat (5.3 mg, 0.22 mmol) wird zu einer Lösung aus **3** (0.02 g, 0.06 mmol) in 1.33 ml THF/ H_2O 1:1 V/V gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 1 ml 1 M Salzsäure zugegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 2 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen

Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösemittel befreit. Die erhaltene Säure (**4**) wird direkt, ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt.

Die Säure **4** (ca. 0.06 mmol) wird in 1.3 ml Dichlormethan aufgenommen und mit *tert*-Butylpiperazine-1-carboxylat (0.03 g, 0.14 mmol) versetzt. Nacheinander werden 30 % Pyridin (0.14 mL, 1.73 mmol) und N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC·HCl) (**12**) (0.045 g, 0.23 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit. Das Produkt **13** wird durch Säulenchromatographie mit Kieselgel als stationäre Phase und einem Lösemittelgemisch von Dichlormethan/Methanol 10:1 V/V gereinigt.

Ausbeute: 39.2 mg (0.059 mmol, 98 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

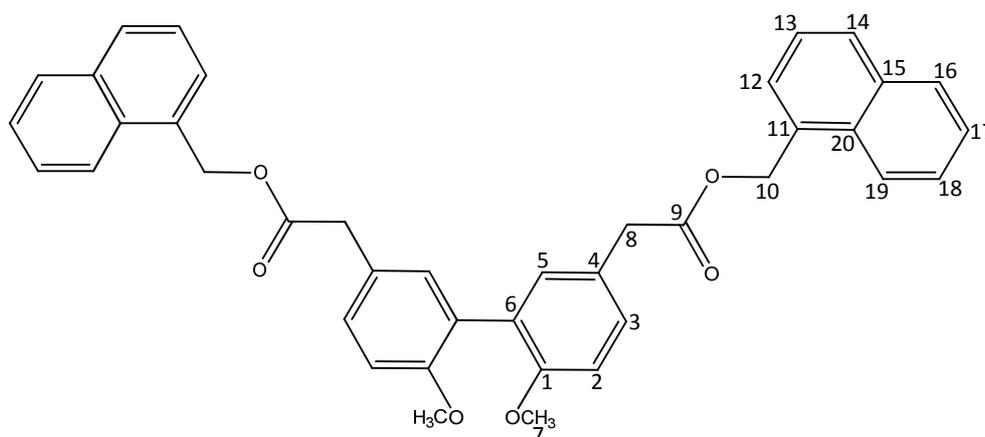
δ [ppm] = 7.19 (dd, ⁴J = 2.05 Hz, ³J = 8.53 Hz, 2H, H-3), 7.06 (d, ⁴J = 2.05 Hz, 2H, H-5), 6.90 (d, ³J = 8.53 Hz, 2H, H-2), 3.72 (s, 6H, H-7), 3.70 (s, 4H, H-8), 3.60 (t, ³J = 4.95 Hz, 4H, H-11), 3.43 (t, ³J = 4.95 Hz, 4H, H-13), 3.37 (t, ³J = 4.95 Hz, 4H, H-10), 3.24 (t, ³J = 4.95 Hz, 4H, H-12), 1.44 (s, 18H, H-16).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 172.16 (C-9), 156.70 (C-1), 156.40 (C-14), 132.58 (C-5), 129.96 (C-3), 128.09 (C-4), 127.10 (C-6), 111.42 (C-2), 77.47 (C-15), 56.22 (C-7), 50.10 (C-11, C-13), 46.32 (C-10, C-12), 41.49 (C-8), 28.55 (C-16).

HRMS (ESI) berechnet für C₃₆H₅₁N₄O₈ [M+H]⁺: 667.3707; gefunden 667.3701

2.3.3.6 Darstellung von Bis(naphthalen-1-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-diacetat (**15**)



15

Lithiumhydroxid·Monohydrat (5.3 mg, 0.22 mmol) wird zu einer Lösung aus **3** (0.02 g, 0.06 mmol) in 1.33 ml THF/H₂O 1:1 V/V gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 1 ml 1 M Salzsäure zugegeben, die organische Phase abgetrennt und die

wässrige Phase viermal mit je 2 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösemittel befreit. Die erhaltene Säure (**4**) wird direkt, ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt.

Die Säure **4** (ca. 0.06 mmol) wird in 4 ml Aceton aufgenommen. Anschließend werden 1-(Chlormethyl)naphthalen (**14**) (0.02 g, 0.12 mmol), Kaliumcarbonat (16.6 mg, 0.12 mmol) und Kaliumiodid (0.02 g, 0.12 mmol) zugegeben und 15 Stunden unter Rückfluss erhitzt. 1.4 ml destilliertes Wasser wird bei Raumtemperatur zu der Reaktionsmischung gegeben. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird dreimal mit je 1 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Produkt **15** wird durch Säulen-chromatographie mit einem Lösemittelgemisch aus Petrolether/Essigsäureethylester 2:1 V/V gereinigt und als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 2.1 mg (0.035 mmol, 63%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

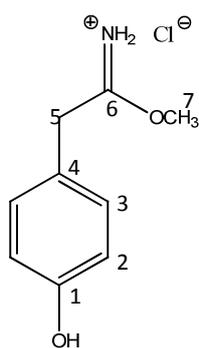
δ [ppm] = 7.91 (m, 2H, H-19), 7.85 (m, 2H, H-16), 7.82 (m, 2H, H-14), 7.50 (m, 2H, H-18), 7.48 (m, 2H, H-17), 7.46 (m, 2H, H-13), 7.41 (m, 2H, H-12), 7.23 (dd, ⁴J = 2.39 Hz, ³J = 8.53 Hz, 2H, H-3), 7.08 (d, ⁴J = 2.39 Hz, 2H, -5), 6.89 (d, ³J = 8.53 Hz, 2H, H-2), 5.58 (s, 4H, H-10), 3.74 (s, 6H, H-7), 3.62 (s, 4H, H-8).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 171.79 (C-9), 156.25 (C-1), 133.68 (C-20), 132.39 (C-15), 131.59 (C-5), 131.42 (C-11), 129.48 (C-12), 129.25 (C-3), 128.64 (C-16), 127.63 (C-14), 127.40 (C-6), 126.51 (C-4), 125.92 (C-18), 125.59 (C-17), 125.25 (C-13), 123.62 (C-19), 111.21 (C-2), 64.99 (C-10), 55.81 (C-7), 40.54 (C-8).

HRMS (ESI) berechnet für C₄₀H₃₄O₆ Na [M+Na]⁺: 633.2253; gefunden 633.2253.

2.3.3.7 Darstellung von Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidat·Hydrochlorid (**17**)

**17**

Unter Stickstoffatmosphäre wird 2-(4-Hydroxyphenyl)acetonitril (**16**) (0.1 g, 0.75 mmol) in 5 ml absolutem Methanol gelöst und im Kältebad auf -20 °C abgekühlt. Anschließend wird Acetylchlorid (1.78 mL, 25 mmol) zugegeben und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum liegt das Produkt als farbloser Feststoff **17** vor.

Ausbeute: 149.9 mg (0.74 mmol, 99 %)

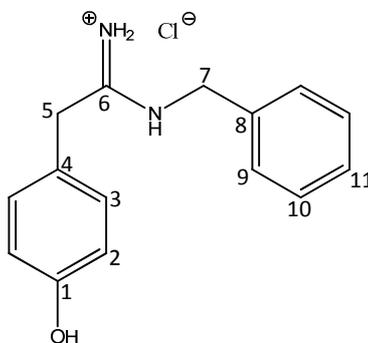
¹H-NMR (400 MHz, CH₃OD):

δ [ppm] = 7.18 (d, $^3J = 8.77$ Hz, 2H, H-3), 6.80 (d, $^3J = 8.77$ Hz, 2H, H-2), 4.90 (s, 3H, H-7), 3.77 (s, 2H, H-5).

¹³C-NMR (100 MHz, CH₃OD):

δ [ppm] = 173.16 (C-6), 156.18 (C-1), 129.88 (C-3), 128.82 (C-4), 114.94 (C-2), 50.98 (C-7), 39.50 (C-5).

2.3.3.8 Darstellung von *N*-Benzyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidamid·Hydrochlorid (**19**)

**19**

Der Imidoester **17** (35 mg, 0.17 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in 2 ml absolutem Methanol aufgenommen und mit Benzylamin (**37**) (20.4 μ L, 0.19 mmol) versetzt. Das

Reaktionsgemisch wird 12 Stunden unter Rückfluss gerührt. Nach Einengen im Rotationsverdampfer wird das Produkt mit Diethylether ausgefällt und als farbloser Feststoff **19** erhalten.

Ausbeute: 19.6 mg (0.071 mmol, 41 %)

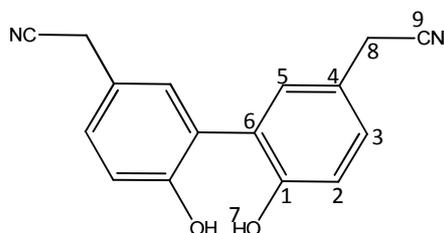
¹H-NMR (400 MHz, CH₃OD):

δ [ppm] = 7.37 (m, 2H, H-10), 7.35 (m, 3H, H-9, H-11), 7.19 (d, ³J = 8.79 Hz, 2H, H-3), 6.81 (d, ³J = 8.79 Hz, 2H, H-2), 3.82 (s, 2H, H-7), 3.79 (s, 2H, H-5).

¹³C-NMR (100 MHz, CH₃OD):

δ [ppm] = 173.56 (C-6), 156.46 (C-1), 133.47 (C-8), 130.30 (C-2), 130.16 (C-4), 129.24 (C-11), 129.21 (C-10), 128.94 (C-9), 115.24 (C-2), 41.60 (C-7), 39.87 (C-5).

2.3.3.9 Darstellung von 2,2'-(6,6'-Dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetonitril (**20**)



20

Kieselgel (3.62 g) wird zu einer Lösung von FeCl₃ · 6 H₂O (1.76 g, 6.51 mmol) in 95 ml Diethylether und 5 ml Methanol bei Raumtemperatur hinzugefügt und für 5 Minuten gerührt. Das Reaktionsgemisch wird unter vermindertem Druck konzentriert und der erhaltene gelbe Feststoff wird für mindestens 18 Stunden im Hochvakuum (1.5 mbar) bei 55 °C gerührt, währenddessen sich der Farbstoff grünlich färbt. 2-(4-Hydroxyphenyl)acetonitril (**16**) (60 mg, 0.45 mmol) in 15 ml Dichlormethan wird bei Raumtemperatur zu dem grünlichen Feststoff hinzugefügt. Nach gründlichem Rühren des Gemisches wird das Dichlormethan am Rotationsverdampfer abgezogen. Der erhaltene schwarze Feststoff wird im Vakuum (1.5 mbar) bei 60 °C gerührt. Nach 60 Stunden wird der Feststoff in 30 ml Methanol aufgenommen und über Celite® filtriert. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt durch Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (erste Säule: Petrolether/Essigsäureethylester 1:1 V/V; zweite Säule: Petrolether/Essigsäureethylester 2:1 V/V; dritte Säule Dichlormethan/Methanol 80:1 V/V)

Ausbeute: 15.4 mg (0.058 mmol, 13 %)

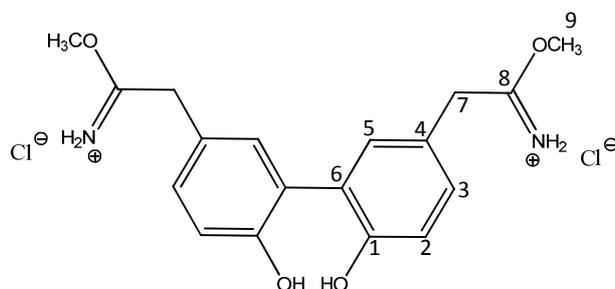
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ [ppm] = 7.32 (d, ⁴J = 2.39 Hz, 2H, H-5), 7.14 (dd, ⁴J = 2.39 Hz, ³J = 8.53 Hz, 2H, H-3), 7.02 (d, ³J = 8.53 Hz, 2H, H-2), 5.57 (s, 2H, H-7), 3.67 (s, 4H, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

δ [ppm] = 151.28 (C-1), 128.48 (C-5), 128.09 (C-3), 122.90 (C-6), 120.44 (C-4), 117.52 (C-9), 116.88 (C-2), 22.65 (C-8).

2.3.3.10 Darstellung von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetimidat (**21**)



21

Unter Stickstoffatmosphäre wird das Nitril **20** (3.2 mg, 0.012 mmol) in 1 ml absolutem Methanol gelöst und im Kältebad auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Anschließend wird Acetylchlorid (356.8 μl , 5 mmol) zugegeben und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer und im Hochvakuum liegt das Produkt als farbloser Feststoff **21** vor.

Ausbeute: 3.9 mg (0.0119 mmol, 98 %)

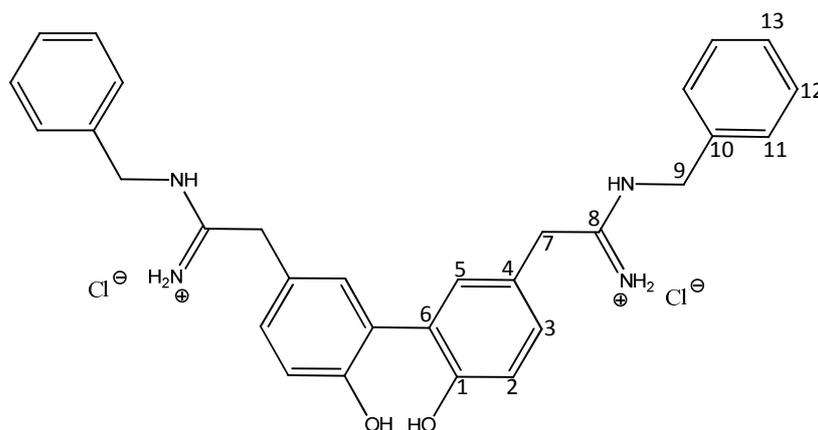
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CH_3OD):

δ [ppm] = 7.23 (d, $^4J = 2.11$ Hz, 2H, H-5), 7.03 (dd, $^4J = 2.11$ Hz, $^3J = 8.30$ Hz, 2H, H-3), 6.86 (d, $^3J = 8.30$ Hz, 2H, H-2), 3.69 (s, 3H, H-9), 3.56 (s, 2H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CH_3OD):

δ [ppm] = 172.57 (C-8), 151.98 (C-1), 130.31 (C-5), 128.60 (C-4), 128.47 (C-3), 126.33 (C-6), 116.10 (C-2), 51.09 (C-9), 39.00 (C-7).

2.3.3.11 Darstellung von 2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(*N*-benzylacetimidamid) (**22**)

**22**

Der Imidoester **21** (6.1 mg, 0.019 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in 1 ml absolutem Methanol aufgenommen und mit Benzylamin (**18**) (4.05 μ l, 0.0372 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 55 °C gerührt. Nach Einengen im Rotationsverdampfer wird das Produkt **22** mit Diethylether ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5.0 mg (0.0105 mmol, 56 %)

¹H-NMR (400 MHz, CH₃OD):

δ [ppm] = 7.42 (m, 10H, H-11, H-12, H-13), 7.21 (d, ⁴*J* = 2.10 Hz, 2H, H-5), 7.02 (dd, ⁴*J* = 2.10 Hz, ³*J* = 8.38 Hz, 2H, H-3), 6.84 (d, ³*J* = 8.38 Hz, 2H, H-2), 3.67 (s, 4H, H-9), 3.54 (s, 4H, H-7).

¹³C-NMR (100 MHz, CH₃OD):

δ [ppm] = 173.54 (C-8), 157.31 (C-1), 133.03 (C-10), 130.30 (C-5), 130.16 (C-4), 129.21 (C-3), 128.87 (C-13), 128.85 (C-12), 128.56 (C-11), 127.13 (C-6), 115.76 (C-2), 42.96 (C-9), 39.87 (C-7).

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Proteinkristallographie

Die Proteinkristallographie ist eine der bedeutendsten biophysikalischen Methoden um hochauflösende, dreidimensionale strukturelle Informationen von Makromolekülen zu erhalten, aus denen sich essentielle Funktionen und Prozesse auf atomarer Ebene ableiten lassen. So lieferte die Kristallographie in den letzten Jahren Einsicht in viele einzigartige, lebenswichtige Vorgänge, wie die Aufklärung der hochauflösenden Struktur und der daraus abgeleiteten Strukturwirkungsbeziehung des Ribosoms¹¹³⁻¹¹⁵, der zentralen Einheit der Proteinbiosynthese, für deren Aufklärung 2009 der Nobelpreis in Chemie vergeben wurde,

oder die kristallographische Entschlüsselung anderer makromolekularer Superkomplexe, wie der atomare Aufbau verschiedener Viren.¹¹⁶⁻¹¹⁸

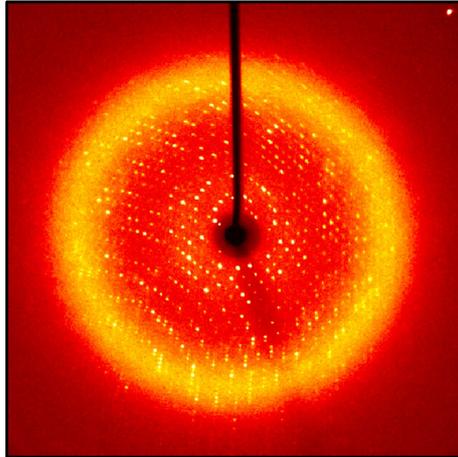


Abbildung 2.1: Beugungsbild eines erhaltenen Kristalls des Komplexes von Dd Myosin-2 mit ADP·VO₃ und Pseudilin **33**.

Grundlage der Kristallographie ist die Wechselwirkung kurzwelliger, monochromatischer Röntgenstrahlung (typischerweise $\lambda = 0.5 - 2.5 \text{ \AA}$) mit den Elektronen der als Einkristall vorliegenden, zu untersuchenden Moleküle und die daraus resultierende Röntgenbeugung. Konstruktive Interferenz der einfallenden Röntgenstrahlen tritt an den Netzebenen des Kristalles auf, wenn der durch den Beugungswinkel θ und den Abstand der Netzebenen d_{hkl} erzeugte Gangunterschied zwischen den Streuwellen einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge entspricht ($n\lambda$), sodass ein messbarer gebeugter Strahl (Reflex) entsteht. Diese Beziehung wird durch das Bragg'sche Gesetz beschrieben und die Netzebenen werden durch die ganzzahligen Miller'schen Indizes hkl definiert.

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \quad (2.2)$$

Ein Einkristall ist ein Feststoff, der in alle drei Raumrichtungen eine Fernordnung aufweist, wobei das kleinste sich dreidimensional periodisch wiederholende Motiv Elementarzelle genannt wird. Das Auftreten von Symmetrie in der Elementarzelle und die Anwendung der Symmetrieeoperatoren auf die asymmetrische Einheit, den kleinsten Teil der Elementarzelle, mit dem die Elementarzelle vollständig über Symmetrieeoperationen (Inversionszentrum, Drehachsen, Inversionsdrehachsen, Gleitspiegel und Schraubenachsen) beschrieben werden kann, ermöglicht die Einteilung in 230 Raumgruppen. Das Vorhandensein von Chiralität in Proteinkristallen reduziert die Anzahl möglicher Raumgruppen bei der Proteinkristallographie jedoch auf 65 Raumgruppen.

Die Analyse des durch Beschießen des Kristalls mit Röntgenstrahlung erhaltenen Beugungsmusters liefert die Lage und Intensität einer Vielzahl von Reflexen (Abbildung 2.1). Die Lage der Reflexe ist, gemäß des Bragg'schen Gesetzes, definiert durch die dreidimensionale Periodizität des Kristalls und wird daher zur Bestimmung der vorliegenden Raumgruppe verwendet. Dazu werden die Zuordnung eines reziproken Gitters und die

Ewaldkonstruktion verwendet, auf die im Folgenden nicht weiter eingegangen wird. Im Gegensatz dazu ist die Intensität eines Reflexes abhängig von dem Inhalt der Einheitszelle und enthält demzufolge Informationen über die Molekülstruktur. Die Intensität eines Reflexes ist direkt proportional zum quadratischen Betrag des Strukturformfaktors $|F_{hkl}|^2$. Der Strukturformfaktor F_{hkl} ist die zentrale Größe der Kristallographie und berechnet sich als Fourier-Reihe.

$$F_{hkl} = \sum_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.3)$$

(f_j = atomare Formfaktor)

Aus der Summe aller Strukturformfaktoren lässt sich über die Fourier-Transformation die Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ bestimmen.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (2.4)$$

(V = Volumen der Einheitszelle)

Der Strukturformfaktor ist ein Vektor und somit definiert durch seine Länge, den Betrag $|F_{hkl}|$, und seinen Winkel, den Phasenwinkel α_{hkl} . Zur vollständigen Berechnung der Strukturformfaktoren und damit der Elektronendichte sind sowohl der Betrag der Strukturformfaktoren, der aus den Intensitäten erhalten wird, wie auch die Phasenwinkel α_{hkl} nötig.

$$F_{hkl} = \sum_j f_j [\cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j) + i \sin 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (2.5)$$

$$\alpha_{hkl} = \arctan \frac{\sum_j f_j \sin 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)}{\sum_j f_j \cos 2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.6)$$

Das typische kristallographische Experiment liefert aber nur Daten zu den Lagen und Intensitäten der Reflexe, die Informationen der Phasenwinkel gehen dabei verloren. Um dieses Phasenproblem zu lösen gibt es verschiedene Ansätze. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Methode des Molekularen Ersatzes verwendet. Der Molekulare Ersatz (*molecular replacement*) verwendet die Phaseninformationen aus den Strukturen homologer Proteine zusammen mit den gemessenen Intensitäten zum Erstellen einer ersten Elektronendichtekarte, sowie eines ersten Modells. Dieses Modell (und die Elektronendichte) wird dann iterativ durch manuelles und automatisiertes Verfeinern der Atomlagen verbessert.

Kristallisation der Myosine und Myosin-Liganden-Komplexe fand mittels Dampfdiffusion bei 4 °C, entweder als hängende Tropfen (*hanging drop*) oder sitzende Tropfen (*sitting drop*),

statt. Die Keimbildung und das Kristallwachstum erfolgt dabei durch Übersättigung der Proteinlösung. Diese wird dazu mit wenig Reservoirlösung, die wiederum verschiedene Zusätze, wie Salze und Fällungsmittel (MPD, PEG) beinhaltet, vermischt und durch eine Gasphase, den Dampfraum, von der restlichen Reservoirlösung getrennt positioniert und luftgeschützt verschlossen. Aufgrund der unterschiedlichen Salzkonzentrationen des Proteintropfens und der Reservoirlösung findet ein Wasseraustausch über den Dampfraum vom Proteintropfen zum Reservoir statt, was im günstigsten Fall zur Übersättigung der Proteinlösung und zum Kristallwachstum führt. Da die genauen Bedingungen, um einen Kristall eines bestimmten Proteins zu erhalten, nicht eindeutig vorhergesagt werden können, wurden verschiedenste Zusammensetzungen der Reservoirlösung von kommerziell erhältlichen und selbst hergestellten Lösungen entweder auf 96-Loch Intelli-Plate (*sitting drop*) oder 24-Loch Linbro (*hanging drop*) Kristallisationsplatten getestet. Erhaltene Kristalle wurden entsprechend ihrer Größe mit MicroMount oder MicroLoop Schleifen der Firma MiTeGen aufgenommen und vor der Datenmessung in einer Kryoschutzlösung, die eine erhöhte Konzentration an Frostschutzmitteln wie Ethylenglykol, Alkohole, Zucker oder Polyethylenglykol enthält, welche ein glasartiges Einfrieren der umgebenden Lösung bewirken¹¹⁹, tiefgefroren. Das Messen der Röntgenbeugung bei tiefen Temperaturen durch Kühlen mittels eines Flüssigstickstoffstrahls (Kryostrahl) dient der Vorbeugung von Strahlenschäden am Kristall.¹²⁰ Alle in der vorliegenden Arbeit gemessenen Röntgendaten wurden bei 100 K im Drehkristallverfahren erhalten.

2.4.1.1 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von *Dd* Myosin-2·ADP·VO₃·33 (TBDCIP)

Kristalle des Protein-Liganden-Komplexes wurden durch Kokristallisation der gereinigten *Dd* Myosin-2 Motordomäne (M761-SSB) erweitert durch einen N-terminalen (His)₇ tag und einen C-terminalen SSB tag¹¹⁰, mit einer Endkonzentration von 1 mM 2,4-Dichlor-6-(3,4,5-tribrom-1*H*-pyrrol-2-yl)phenol (TBDCIP) (**33**), 1 mM ADP und 1 mM Natrium *meta*-Vanadat bei 4 °C durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen erhalten. Das Gemisch wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung vermischt, die sich aus 50 mM HEPES (pH 6.8), 110 mM NaCl, 11 % PEG-MME 5000, 2 % MPD, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 1 mM EGTA zusammensetzte. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung überführt, welche aus Reservoirlösung gemischt mit zusätzlich 25 % Ethylenglykol bestand, und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Röntgenbeugungsdaten wurden an der EMBL *beamline* X13 des Synchrotrons DESY, Hamburg aufgenommen. Datenreduktion wurde mit dem Programm XDS¹²¹ durchgeführt. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 2JJ9, sowie Modellverfeinerung fand mittels CNS 1.2^{122,123} und Phenix 1.6¹²⁴ statt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichsvalidierung verwendet. Das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells wurde mit dem Programm COOT¹²⁵ ausgeführt. Die Koordinaten und Strukturaktoren wurden in der Proteindatenbank¹²⁶ hinterlegt, Identifikationsnummer: 2XO8.

2.4.1.2 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von *Dd* Myosin-2-ADP-VO₄-25 (PBP)

Kristalle des Protein-Liganden-Komplexes wurden durch Kokristallisation der gereinigten *Dd* Myosin-2 Motordomäne (M765-SSB) erweitert durch einen N-terminalen (His)₇ tag und einen C-terminalen SSB tag¹¹⁰, mit einer Endkonzentration von 1 mM 2,4-Dichlor-6-(3,4,5-tribrom-1*H*-pyrrol-2-yl)phenol (PBP) (**25**), 1 mM ADP und 1 mM Natrium *ortho*-Vanadat bei 4 °C durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Das Gemisch wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung vermischt, die sich aus 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 140 mM NaCl, 11 % PEG-MME 5000, 2 % MPD, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 1 mM EGTA zusammensetzte. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung überführt, welche aus Reservoirlösung gemischt mit zusätzlich 25 % Ethylenglykol bestand, und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Röntgenbeugungsdaten wurden an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) *beamline* ID14, Grenoble aufgenommen und mit dem Programm XDS¹²¹ prozessiert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 1VOM, sowie Modellverfeinerung fand mittels CNS 1.2^{122,123} und Phenix 1.6¹²⁴ statt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichsvalidierung verwendet. Das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells wurde mit dem Programm COOT¹²⁵ durchgeführt.

2.4.1.3 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von *Dd* Myosin-2-ADP-VO₃-36 (EMD 57033)

Kristalle des Protein-Liganden-Komplexes wurden durch Kokristallisation der gereinigten *Dd* Myosin-2 Motordomäne (M765-SSB) erweitert durch einen N-terminalen (His)₇ tag und einen C-terminalen SSB tag¹¹⁰, mit einer Endkonzentration von 1 mM 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalen (EMD 57033) (**36**), 1 mM ADP und 1 mM Natrium *meta*-Vanadat bei 4 °C durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Das Protein-Liganden-Gemisch wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung vermischt, die sich aus 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 7 % PEG 8000, 2 % MPD, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 1 mM EGTA zusammensetzte. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung überführt, welche aus Reservoirlösung gemischt mit zusätzlich 25 % Ethylenglykol und erhöhter Salzkonzentration von 300 mM NaCl, sowie erhöhter Menge Fällungsmittel von 15 % PEG-MME 5000 bestand, und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Beugungsdaten wurden mit dem hauseigenen Proteum X8 Diffraktometer, das mit Kryosystem, κ-Goniometer und CCD Detektor ausgestattet ist, gemessen und mit der Proteum2 Software prozessiert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 2JJ9, sowie Modellverfeinerung fand mittels CNS 1.3^{122,123} und Phenix 1.6¹²⁴ statt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichsvalidierung verwendet. Das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells wurde mit dem Programm COOT¹²⁵ durchgeführt.

2.4.1.4 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von *Dd* Myosin-2-ADP-VO₃-35 (Prodan)

Kristalle des Protein-Liganden-Komplexes wurden durch Kokristallisation der gereinigten *Dd* Myosin-2 Motordomäne (M765-SSB) erweitert durch einen N-terminalen (His)₇ tag und einen C-terminalen SSB tag¹¹⁰, mit einer Endkonzentration von 1 mM 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalen (Prodan) (**35**), 1 mM ADP und 1 mM Natrium *meta*-Vanadat bei 4 °C durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Das Protein-Liganden-Gemisch wurde 1 Stunde auf Eis inkubiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung vermischt, die sich aus 50 mM HEPES (pH 7.0), 200 mM NaCl, 10 % PEG-MME 5000, 2 % MPD, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 1 mM EGTA zusammensetzte. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung überführt, welche aus Reservoirlösung gemischt mit zusätzlich 25 % Ethylenglykol und erhöhter Salzkonzentration von 300 mM NaCl und erhöhter Menge Fällungsmittel von 15 % PEG-MME 5000 bestand, und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Die Röntgenbeugungsdaten wurden an der DESY *beamline* X12, Hamburg aufgenommen und mit dem Programm XDS¹²¹ prozessiert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 2JJ9, sowie Modellverfeinerung fand mittels CNS 1.2^{122,123} und Phenix 1.6¹²⁴ statt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichvalidierung verwendet. Das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells wurde mit dem Programm COOT¹²⁵ durchgeführt.

2.4.1.5 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung der *Dd* Myosin-2 G680A-Mutante

Kristalle der gereinigten *Dd* Myosin-2 G680A Mutante wurden bei 4 °C durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Die verwendete Reservoirlösung beinhaltete 100 mM MES (pH 6.5) und 25 % PEG 8000. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung, bestehend aus 100 mM MES (pH 6.5), 25 % PEG 8000, 150 mM NaCl und 10 % Ethylenglykol, überführt und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Röntgenbeugungsdaten wurden an der ESRF Mikrofokus *beamline* ID13, Grenoble aufgenommen und mit dem Programm XDS¹²¹ reduziert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 1MMD fand mittels AMORE¹²⁷ statt und Modellverfeinerung wurde mit Refmac5¹²⁸ und Phenix 1.6¹²⁴ durchgeführt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichvalidierung verwendet. Das Programm COOT¹²⁵ wurde für das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells benutzt. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Proteindatenbank¹²⁶ hinterlegt, Identifikationsnummer: 2YOR.

2.4.1.6 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung der *Dd* Myosin-2 G680A-ADP-Mutante

Kristalle des Nukleotid-gebundenen G680A Komplexes wuchsen in der Gegenwart von 2 mM ADP, 2 mM Natrium *meta*-Vanadat und 2 mM MgCl₂. Die Reservoirolösung setzte sich aus 13 % PEG6000 und 4 % Glycerin zusammen. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung, bestehend aus 14 % PEG 6000, 150 mM NaCl, 25 % Ethylenglykol und 5 % Glycerin, überführt und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Röntgenbeugungsdaten wurden an der ESRF Mikrofokus *beamline* ID23-2, Grenoble aufgenommen und mit dem Programm XDS¹²¹ reduziert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 1MMD fand mittels AMORE¹²⁷ statt und Modellverfeinerung wurde mit Refmac5¹²⁸ und Phenix 1.6¹²⁴ durchgeführt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichvalidierung verwendet. Das Programm COOT¹²⁵ wurde für das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells benutzt. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Proteindatenbank¹²⁶ hinterlegt, Identifikationsnummer: 2Y8I.

2.4.1.7 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung der *Dd* Myosin-2 G680V-Mutante

Kristalle der gereinigten *Dd* Myosin-2 G680V Mutante wurden bei 4 °C durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen erhalten. Die verwendete Reservoirolösung beinhaltete 100 mM HEPES (pH 7.5) und 20 % PEG 10000. Vor der Datensammlung wurden die Kristalle in eine Kryoschutzlösung, bestehend aus 100 mM HEPES (pH 7.5), 20 % PEG 10000, 150 mM NaCl und 10 % Ethylenglykol, überführt und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. Röntgenbeugungsdaten wurden an der ESRF Mikrofokus *beamline* ID13, Grenoble aufgenommen und mit dem Programm XDS¹²¹ reduziert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 1MMD fand mittels AMORE¹²⁷ statt und Modellverfeinerung wurde mit Refmac5¹²⁸ und Phenix 1.6¹²⁴ durchgeführt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichvalidierung verwendet. Das Programm COOT¹²⁵ wurde für das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells benutzt. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Proteindatenbank¹²⁶ hinterlegt, Identifikationsnummer: 2Y9E.

2.4.1.8 Kristallisation, Datensammlung und Verfeinerung von *Dd* Myosin-2-ADP-VO₄-3 (BIP1)

Kristalle der gereinigten Myosin-Motordomäne (M765-SSB) mit N-terminalem (His)₇ tag und C-terminalem SSB tag¹¹⁰ wurden in Anwesenheit von 1 mM ADP und 1 mM Natrium *ortho*-Vanadat bei 4 °C durch Dampfdiffusion im hängenden Tropfen erhalten. Die verwendete Reservoirolösung setzte sich aus 50 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 12 % PEG-MME 5000, 2 % MPD, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 1 mM EGTA zusammen. Zur Bildung des Protein-Liganden-Komplexes wurde der Kryoschutzlösung, die aus Reservoirolösung bestand, ergänzt durch 25 % Ethylenglykol und erhöhter Salzkonzentration von 300 mM NaCl, sowie erhöhter

Menge Fällungsmittel von 15 % PEG, stufenweise in 0.2 mM Schritten eine Endkonzentration von 1 mM 2,2'-(6,6'-Dimethoxybiphenyl-3,3'-diyl)diessigsäuremethylester (BIP1) **(3)** zugegeben und der Proteinkristall wurde damit durchtränkt (*soaking*) und jeweils 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Beugungsdaten wurden an der BESSY *beamline* BL14.1, Berlin aufgenommen und mit dem Programm XDS¹²¹ prozessiert. Molekularer Ersatz unter Verwendung des Startmodells 1VOM, sowie Modellverfeinerung fand mittels CNS 1.3^{122,123} und Phenix 1.6¹²⁴ statt. 5 % der Daten wurden zufällig ausgewählt und zur Vergleichsvalidierung verwendet. Das Erstellen, manuelle Verfeinern und Validieren des Modells wurde mit dem Programm COOT¹²⁵ durchgeführt.

2.4.2 Steady-state Kinetik

Die photometrische *steady-state* Kinetik wurde zur Bestimmung der enzymatischen ATPase Reaktion von Myosinen im Fließgleichgewicht (*engl., steady state*), bzw. zur Untersuchung der Auswirkung kleiner chemischer Moleküle auf die enzymatische Aktivität der Myosine verwendet. Um die Reaktion in einen stationären Zustand, dem Fließgleichgewicht der enzymatischen Reaktion, zu versetzen, wird ein deutlicher Überschuss an Substrat verwendet. Das Substrat ATP wird durch Myosin in ADP und anorganisches Phosphat (P_i) umgesetzt. Da sich das Absorptionsverhalten von ATP und ADP nicht unterscheidet, wird zur Verfolgung der ATPase Reaktion ein NADH- und Enzym-gekoppeltes Verfahren verwendet.^{129,130} Dabei wird das Produkt (ADP) der Myosin (M) ATPase Reaktion durch das Enzym Pyruvatkinase (PK), unter Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat, wieder in ATP umgewandelt. Das gebildete Pyruvat wird durch Laktatdehydrogenase (LDH) weiter zu Laktat unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD^+ reduziert. Die Umsetzung von NADH kann photometrisch durch Messung der für NADH typischen Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt werden.

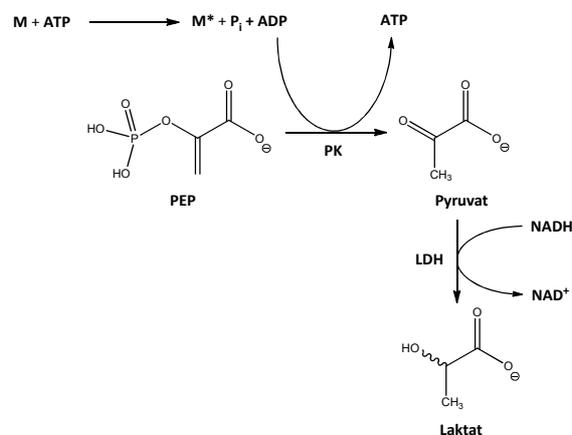


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Reaktionskaskade während der enzymgekoppelten *steady state* ATPase-Messungen.

Alle Folgereaktionen des Enzymgekoppelten Systems verlaufen deutlich schneller als die eigentliche ATP Umsetzung, weshalb die Myosin ATPase Reaktion den

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt und die Geschwindigkeit der NADH Oxidation der ATP Umsatzgeschwindigkeit entspricht. Aus diesem Grund entspricht die zeitliche Änderung der NADH Konzentration c_{NADH} der Änderung der ATP Konzentration c_{ATP} und die Geschwindigkeitskonstante der ATP Umsetzung durch Myosin k_{ATPase} kann unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden.

$$\Delta A = \epsilon_{\text{NADH}} \cdot \Delta c_{\text{NADH}} \cdot d \quad (2.7)$$

$$k_{\text{ATPase}} = \frac{-\Delta A}{60s \cdot \epsilon_{\text{NADH}} \cdot d \cdot c_{\text{Myosin}}} \quad (2.8)$$

Reaktionsgemisch:

25 mM	HEPES, pH 7.3
25 mM	KCl
5 mM	MgCl ₂
0.5 mM	DTT
0.2 mM	NADH
0.5 mM	PEP
0.02 mg·ml ⁻¹	LDH
0.05 mg·ml ⁻¹	PK
0.1-1 μM	Myosin
30 μM	F-Aktin
1 mM	ATP

2.4.3 *In vitro* Motilität

Das eingesetzte Verfahren zur Untersuchung der Myosin *in vitro* Motilität und des Einflusses potentieller Inhibitoren auf die Motilität verschiedener Myosinisoformen basiert auf der Histidin-Antikörper-vermittelten Fixierung von Myosinfragmenten an eine Nitrozellulose beschichtete Glasoberfläche und der mikroskopischen Messung der durch ATP-Zugabe angeregten Gleitgeschwindigkeit fluoreszenzmarkierter Aktinfilamente über die fixierten Myosinköpfe (Abbildung 2.3).^{131,132} Die für die *in vitro* Motilitätsuntersuchungen verwendeten Myosinkonstrukten sind mit künstlichen Hebelarmen auf Basis des rigiden *Dd* α-Aktinins (R), eines quervernetzenden Proteins aus dem Zytoskelett, ausgestattet, sowie eines C-terminalen Histidin-*tags*, der die Bindung des Motorproteins über den Histidin-Antikörper an die beschichtete Glasoberfläche gewährleistet. Im Falle des *Dd* Myosin-1b-2R-YFP Konstruktes wurde kein Histidin-*tag* verwendet. Die verwendeten Myosine werden vor Gebrauch einer Aktinaffinitätsreinigung unterzogen, um nichtmotile Myosine aus der Probe zu entfernen. Dazu wird 1 mg·ml⁻¹ Myosinlösung mit 0.5 mg·ml⁻¹ F-Aktin und 2 mM ATP versetzt und 20 min bei 70000 min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend abgetrennt und direkt für das *in vitro* Motilitätsverfahren verwendet. Das

fluoreszenzmarkierte Aktin wird aus einer $2\ \mu\text{M}$ F-Aktinlösung, die mit $3\ \mu\text{M}$ TRITC-Phalloidin versetzt wird, hergestellt. TRITC-Phalloidin ist ein Komplex des F-Aktin Depolymerisierungsinhibitor Phalloidin an den kovalent der Fluorophor Tetramethylrhodamin B-isothiocyanat (TRITC) gebunden ist. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung findet in einer transparenten Flusszelle statt. Die Flusszelle besteht aus einem mit 1% Lösung aus Nitrozellulose in Essigsäurepentylester beschichteten Deckgläschen, das über Abstandshalter kontaktfrei auf einem Objektträger befestigt ist.

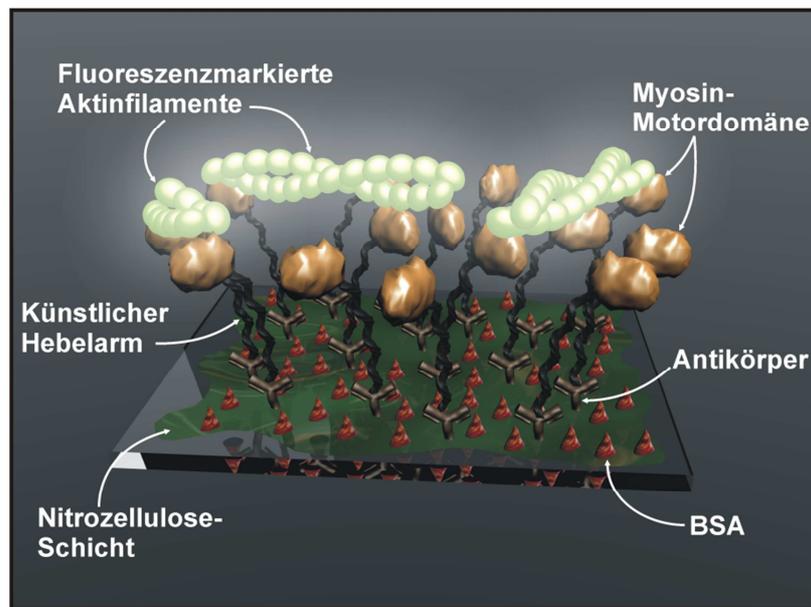


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau der Flusszelle zur Untersuchung der *in vitro* Motilität von Myosinen mit künstlichem Hebelarm auf Basis von α -Aktinin. BSA = Rinderserumalbumin.

Zur Antikörperbeschichtung wird die Flusszelle 5 min mit $10\ \mu\text{l}$ einer Lösung von Anti-(His)₅-Antikörpern ($0.025\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) in AB-Puffer inkubiert und anschließend mit Waschlösung 1 gewaschen. Das Rinderserumalbumin in Waschlösung 1 bindet dabei die nicht durch Antikörper besetzte Nitrozellulose, um eine Adsorption der Myosine an ungebundene Nitrozellulose zu vermeiden. Die Flusszelle wird mit $10\ \mu\text{l}$ der gereinigten Myosinlösung ($1\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) beladen und nach 2 min erneut mit Waschlösung 1 gespült. Inaktive Myosine werden durch 2 min Inkubation mit F-Aktin und Spülen mit ATP-Lösung blockiert. Anschließend wird die Flusszelle erneut mit Waschlösung 1 gewaschen und mit fluoreszenzmarkiertem F-Aktin ($0.05\ \mu\text{M}$) beladen. Nach Ablauf der 2 min Inkubationszeit wird mit Waschlösung 1 und Antibleichlösung 1 gespült. Die Dekoration der Oberfläche mit fluoreszenzmarkiertem F-Aktin wird überprüft und schließlich eine ATP-haltige Antibleichlösung 2 zum Starten des Experiments durch die Flusszelle gespült.

Die *in vitro* Motilität der Myosine wird mit dem Fluoreszenzmikroskop IX 70 von Olympus verfolgt und mit der CCD Kamera C8484 von Hamamatsu Photonics aufgenommen. Anregung der Fluoreszenz findet bei einer Wellenlänge von 545 nm statt und Emission wird bei 570 nm gemessen. Die Gleitgeschwindigkeit der Myosine wird aus den gemessenen

Trajektorien mit dem Programm DiaTrack 3.0 der Firma Semasopt durch Anpassen einer Gaußfunktion bestimmt.

AB-Puffer:

25 mM	Imidazol, pH 7.4
25 mM	KCl
1.5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA

Waschlösung 1:

0.5 mg·ml ⁻¹	BSA
10 mM	DTT
in AB-Puffer	

Antibleichlösung 1:

5 mg·ml ⁻¹	Glucose
0.1 mg·ml ⁻¹	Glucose-Oxidase
0.02 mg·ml ⁻¹	Katalase
in Waschlösung 1	

Antibleichlösung 2:

5 mg·ml ⁻¹	Glucose
0.1 mg·ml ⁻¹	Glucose-Oxidase
0.02 mg·ml ⁻¹	Katalase
2 mM	ATP
in Waschlösung 1	

ATP-Lösung:

2 mM	ATP
in Waschlösung 1	

2.5 Computerchemische Methoden

2.5.1 Homologiemodellierung

Die Homologiemodellierung oder vergleichende Modellierung (*comparative modeling*) wurde in der vorliegenden Arbeit zum Erstellen von dreidimensionalen Proteinmodellen verwendet, deren Struktur bisher noch nicht experimentell bestimmt wurde, und begründet sich prinzipiell auf die Annahme, dass sich gleichende Primärstrukturen (Aminosäuresequenzen) zur Ausbildung der gleichen Tertiärstruktur, also zur gleichen Faltung des Proteins führen.^{133,134} Zur Berechnung des dreidimensionalen Modells wird zunächst die Sequenz des Proteins mit unbekannter Struktur mit den Aminosäuresequenzen von Proteinen, deren Struktur durch Röntgenkristallographie oder Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt wurde, verglichen, um geeignete Vorlagen (*templates*) auszuwählen, die eine hohe Übereinstimmung der Aminosäureabfolge zum Zielprotein besitzen (Homologe). Auf Basis eines Datenbankgleiches charakteristischer Merkmale von Proteinen werden der Struktur verschiedenste Bindungs- und räumliche Geometriecharakteristika zugeordnet, wie z.B. C_α - C_α Atomabstände, Diederwinkel der Haupt- und Seitenketten, stereochemische Begebenheiten oder die Art der Aminosäure. Diese charakteristischen Merkmale werden mathematisch als Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (*pdf, engl., probability density function*) ausgedrückt in den Modellierungsprozess miteinbezogen. So kann die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion einer Atombindung, deren Potentialenergie mit dem harmonischen Oszillator angenähert wird, als Gaussfunktion dargestellt werden.

$$p(\text{Bindung}) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{b-b_0}{\sigma}\right)^2} \quad (2.9)$$

(σ = Standardabweichung)

Solche Basis-pdfs der verschiedenen Charakteristika werden als Summe ihrer gewichteten Einzelbeiträge zusammengefasst und bilden als Produkt schließlich die Gesamtwahrscheinlichkeitsdichtefunktion P des Moleküls, die zur Optimierung der Modelle dient.

$$P = \prod_i p(\text{Merkmal}) \quad (2.10)$$

Die räumlichen Merkmale und Bindungsparameter werden auf das Zielprotein übertragen und die Koordinaten werden durch Energieminimierung mit der Methode der konjugierten Gradienten (*conjugate gradients*) optimiert. Das Energieminimum der Energiehyperfläche des Proteins entspricht dabei der wahrscheinlichsten Konformation, die das Protein bevorzugt einnimmt. Unterschiedliche Modelle können durch Variation der anfänglichen Struktur, unterschiedlicher Gewichtung und der Verwendung mehrerer Vorlageproteine erzeugt werden. Alle Homologiemodelle wurden mit dem Programm Modeller¹³⁵ erzeugt und anschließend einer weiteren Geometrieoptimierung unter Verwendung der Methode der konjugierten Gradienten und dem AMBER¹³⁶ Kraftfeld unterzogen.

2.5.2 Molekulares Docking

Die Mehrzahl aller Liganden binden über nicht-kovalente Wechselwirkungen an ihr Zielprotein. Die Bindungsmodi und Bindungsenergien können *in silico* durch sogenanntes Molekulares Docking vorhergesagt werden. Im Gegensatz zu Moleküldynamik Simulationen, die eine aufwändigere, physikalisch-basierte Energiefunktion verwenden und inhärent einen geringeren Konformationsraum absuchen (vergleiche Kapitel 2.5.3), liegt dem Molekularen Docking ein einfacheres Kraftfeld zur Energieevaluierung zugrunde und die Anforderung einen weitaus größeren Konformationsraum, mit möglichst allen Freiheitsgraden der Liganden zu erforschen. Dazu wird praktisch ein zuvor definierter Teil des Proteins, meist die zu untersuchende Bindungstasche einschließlich umliegender Aminosäuren, durch Anlegen einer quadratischen Box zu definierender Größe, mit einem Gitternetz ausgefüllt. Für jeden Atomtyp, der im Liganden vorhanden ist, wird an jedem Gitterpunkt die Potentialenergie mit einem einatomigen Testatom oder einer repräsentativen funktionellen Gruppe bestimmt und somit Affinitätskarten für jeden Atomtyp erzeugt. Die Suche nach dem Bindungsmodus des Liganden, also die Optimierung der Position, Orientierung und Konformation, findet mittels einer hybriden globalen und lokalen Abrasterungsmethode, dem sogenannten Lamarck'schen Genetischen Algorithmus (*Lamarckian genetic algorithm*)¹³⁷ statt. Genetische

Algorithmen beruhen auf Konzepten der Genetik und Evolution. Der Zustand des Liganden wird dabei dem Genotyp gleichgesetzt und die Zustandsvariablen der Translation, Orientierung und Konformation den Genen. Die atomaren Koordinaten entsprechen dem Phenotyp. Eine zufällige Population von Individuen wird zu Beginn der Suche erzeugt. Die Zustände der Ligandenindividuen werden in die atomaren Koordinaten überführt und die Bindungsenergien werden berechnet. Auf Basis der bestimmten Energien findet eine Selektion statt. Aus den vielversprechenden Individuen werden zufällig ausgewählte Paare miteinander gekreuzt und erzeugen Nachkommen, die Gene, also Zustandsvariablen, von beiden Eltern erben. Zusätzlich findet in einigen Fällen eine zufällige Mutation von Genen statt. Dieser Zyklus von Generationserzeugung wird mehrfach durchlaufen, bis ein Abbruchkriterium, die maximale Anzahl von Generationen oder Energieevaluierungen erreicht ist.

Die Energieevaluation wird schließlich, auf Basis der erzeugten Affinitätskarten, mit einem speziellen Kraftfeld¹³⁸ durchgeführt, das zur Bestimmung der enthalpischen Beiträge Molekülmechanik verwendet und für die entropischen Beiträge einem empirischen Ansatz folgt. Die Bindungsenergie eines Liganden wird dabei durch einen thermodynamischen Zyklus beschrieben und durch sechs paarweise Energieterme, sowie eine Abschätzung der Konformationsentropie ΔS_{Konf} berechnet.

$$\Delta G = (V_{gebunden}^{L-L} - V_{ungebunden}^{L-L}) + (V_{gebunden}^{P-P} - V_{ungebunden}^{P-P}) + (V_{gebunden}^{P-L} - V_{ungebunden}^{P-L} + \Delta S_{Konf}) \quad (2.11)$$

Die ersten beiden Terme beschreiben die intramolekularen Energien des Liganden (L) im gebundenen und ungebundenen Zustand. Die beiden mittleren Terme stehen für die intramolekularen Energien des Proteins (P), die sich, da in der vorliegenden Arbeit keine Flexibilität im Protein während der Dockingprozesse erlaubt waren, nicht unterscheiden und die Differenz damit gleich null ist. Die intermolekularen Energien zwischen dem Liganden und dem Protein werden durch die letzten Terme ausgedrückt, sowie einen Term für den Verlust an Mobilität, bzw. hier an Torsionsentropie, die direkt proportional zur Anzahl der rotierbaren Bindungen N_{Tors} im Liganden ist.

$$\Delta S_{Konf} = W_{Konf} N_{Tors} \quad (2.12)$$

Die einzelnen Energieterme setzen sich aus gewichteten Einzelbeiträgen für die Attraktion/Repulsion mit dem Lennard-Jones-Potential, Wasserstoffbrückenbindungen mit einem 12-10-Potential, Elektrostatik mit einem Coulomb Potential, sowie einem empirischen Desolvatisierungspotential zusammen.

$$\begin{aligned}
 V = & W_{vdW} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{HB} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{Elek} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\
 & + W_{Sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{-\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2}}
 \end{aligned} \tag{2.13}$$

Parameter für den van-der-Waals Term wurden bei der Entwicklung vom AMBER Kraftfeld genommen. Die Direktionalität der Wasserstoffbrückenbindung $E(t)$ ist abhängig von der Abweichung des Winkels t vom Idealwinkel und die Desolvatisierungsenergie vom Volumen V_i und V_j der Atome, die ein Atom i oder j umgeben. Die Gewichtungsfaktoren W sind empirische Faktoren, die durch Anpassen der Funktion an Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen mit bekannten Bindungskonstanten festgelegt wurden. Alle Vorhersagen von Bindungsmodi und Bindungsenergien durch Molekulares Docking wurden mit dem Programm AutoDock 4¹³⁷ durchgeführt.

2.5.3 Moleküldynamik-Simulationen

Moleküldynamik-Simulationen (MD) beschreiben die zeitlich aufgelöste atomare Bewegung von molekularen Systemen durch numerisches Lösen der Newton'schen Bewegungsgleichung (2. Newton'sche Gesetz). Im Gegensatz und komplementär zu den statischen Momentaufnahmen, die durch Röntgenkristallographie erhalten werden, erlauben MD Simulationen die Untersuchung der dynamischen Eigenschaften von Biomolekülen und Protein-Ligand-Komplexen. Die exakte zeitliche Bewegung eines Systems ist durch die zeitabhängige Schrödinger Gleichung gegeben.

$$\hat{H}\psi = i\hbar \frac{\partial \psi}{\partial t} \tag{2.14}$$

(\hat{H} = Hamiltonoperator; ψ = Wellenfunktion; \hbar = reduzierte Planck'sche Konstante $\left(\frac{h}{2\pi}\right)$)

Praktisch ist das Lösen der zeitabhängigen Schrödingergleichung für größere Systeme zu rechenintensiv und derzeit nicht durchführbar. Aus diesem Grund werden klassische MD Simulationen unter Annahme von drei grundsätzlichen Näherungen realisiert. Die erste Näherung besagt, dass die Bewegung der schweren Kerne und der leichten Elektronen, aufgrund ihres enormen Massenunterschieds und dem daraus resultierenden Geschwindigkeitsunterschieds, voneinander entkoppelt sind. Diese Annahme ist im Allgemeinen als Born-Oppenheimer Näherung¹³⁹ bekannt. Die viel schnelleren Elektronen bewegen sich dabei um die zeitlich stationären Kerne und erzeugen so ein effektives Potential, das durch Lösen der zeitunabhängigen Schrödingergleichung der Elektronen gegeben ist und nur von den Kernpositionen abhängig ist.

Die zweite Näherung erlaubt die Berechnung des Potentials als empirische Potentialfunktion, dem molekülmechanischen Kraftfeld, anstatt die elektronische Schrödingergleichung zu

lösen. Die Gesamtpotentialenergie berechnet sich dabei aus den summierten Teilbeträgen für Bindungsdehnung, Winkelbeugung, Torsionsbewegung (Diederwinkel) und den nicht-gebundenen Termen für Attraktion/Repulsion und Elektrostatik.

$$V = \sum_{\text{Bindung}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{Winkel}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.15)$$

$$+ \sum_{\text{Dieder}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{\text{vdW}} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right] + \sum_{\text{Coulomb}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

Die verschiedenen existierenden Kraftfelder unterscheiden sich in der Anzahl der Energierterme und der zugrundeliegenden Funktion, sowie in der Parametrisierung des Kraftfeldes. In dieser Arbeit wurden das AMBER Kraftfeld, sowie das OPLS *all-atom* (OPLS-AA)¹⁴⁰ Kraftfeld verwendet. Beide Kraftfelder beschreiben die Bindungs- und Winkelterme mit einem harmonischen Oszillator, wie in Abbildung 2.4 zu sehen ist. Für den van-der-Waals Term, also die Attraktion und Repulsion, wird das Lennard-Jones Potential verwendet und der elektrostatischen Wechselwirkung liegt das Coulomb Gesetz zugrunde. Sie unterscheiden sich in der Anzahl der Cosinusfunktionen zur Beschreibung der Diederwinkel und in der Parametrisierung.

Die dritte und zentrale Näherung der MD Simulationen besagt, dass die Kerne sich wie klassische Partikel verhalten und durch die Newton'sche Bewegungsgleichung ($F_i = m_i \cdot a_i$) beschrieben werden können.

$$-\nabla_i V(r) = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (2.16)$$

Die Kraft, die auf ein Atom i wirkt, bestimmt die Beschleunigung a_i , die das Atom erfährt und damit die Änderung der Geschwindigkeit und Position eines Atoms innerhalb eines bestimmten Zeitschrittes Δt . Da Bindungs- und Winkelvibrationen im Femtosekundenbereich stattfinden, muss dieser Zeitschritt während der Simulationen möglichst klein sein. Integration der Bewegungsgleichung fand numerisch mit dem leap-frog Algorithmus¹⁴¹ statt.

$$v\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{F(t)}{m} \Delta t \quad (2.17)$$

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (2.18)$$

Alle Moleküldynamik Simulationen wurden mit dem Gromacs 4.0 Programmpaket¹⁴² ausgeführt.

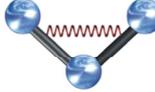
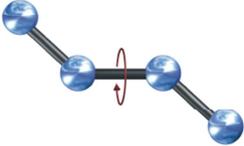
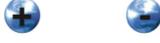
Bindungsdehnung		$\sum_{\text{Bindung}} K_r (r - r_0)^2$
Winkelbeugung		$\sum_{\text{Winkel}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2$
Diederwinkel/Torsion		$\sum_{\text{Dieder}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)]$
Van-der-Waals-Kräfte		$\sum_{\text{vdW}} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right]$
Elektrostatische Kräfte		$\sum_{\text{Coulomb}} \frac{q_i q_j}{\epsilon \cdot r_{ij}}$

Abbildung 2.4: Energierme des OPLS-AA Kraftfeldes.

3. Ergebnisse

Das Verständnis der allosterischen Wechselbeziehungen im Zielprotein und die damit verbundenen Möglichkeiten der Modulation der energetischen Kopplungen und der enzymatischen oder funktionalen Aktivität sind eine entscheidende Voraussetzung für die rationale Entwicklung neuartiger allosterischer Effektoren der Proteinfunktion. Bei dem allosterischen Effektor kann es sich um verschiedenste Auslöser handeln, wie kovalent veränderte Oberflächenreste, Mutationen von Aminosäuren oder die Bindung eines weiteren Proteins oder Liganden, die durch ein breites Spektrum verschiedenster Wirkmechanismen ihren Effekt ausüben können (Abbildung 3.1).

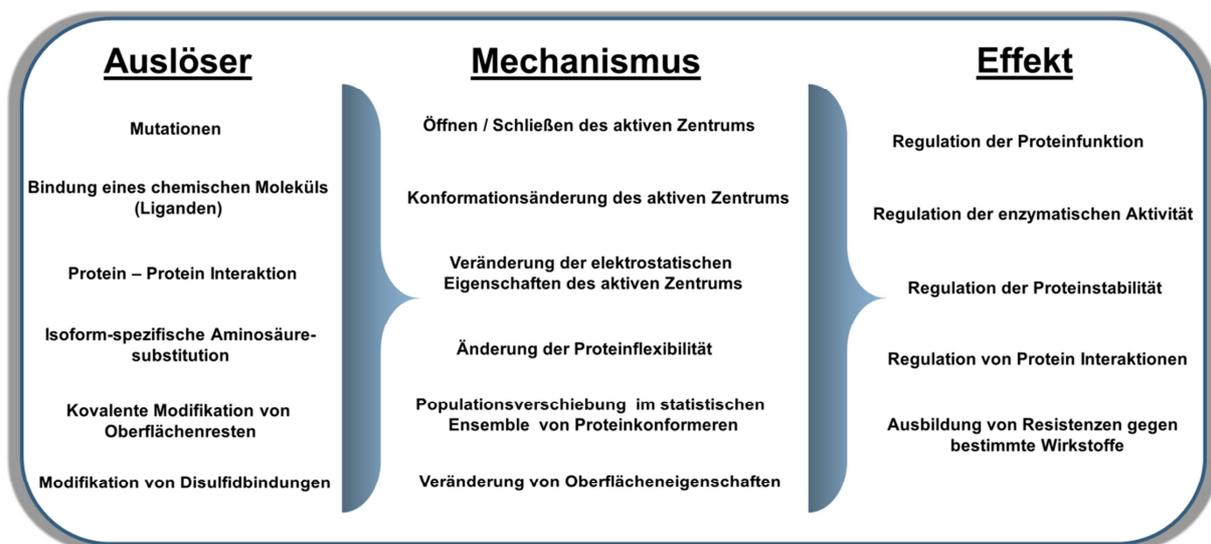


Abbildung 3.1: Diagramm verschiedenster Typen allosterischer Auslöser, die über einen bestimmten Mechanismus einen Effekt in einer abgelegenen Stelle des Proteins auslösen. Modifiziert nach Ref. ⁵⁶.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Wirkungsweise einer Punktmutation in der reaktiven Thiolregion (SH1/SH2-Region) der Myosin-Motordomäne, sowie die Mechanismen bereits identifizierter Modulatoren der *Dd* Myosin-2 Funktion untersucht. Die Translation der gewonnenen Erkenntnisse am Modellsystem Myosin-2 auf Myosinisoformen, die eine Bedeutung während der Infizierung durch den Malariaparasiten besitzen, dienen weitergehend der strukturbasierten *de novo* Entwicklung neuer Inhibitoren des parasitären *Pf* Myosin A.

3.1 Strukturelle Untersuchung der Auswirkung der G680-Mutation

Die reaktive Thiolregion ist eine strukturell hochkonservierte Region im C-terminalen Abschnitt der 50 kDa Domäne der Myosin-Motordomäne und entspricht einer gebrochenen α -Helix. Die beiden Helixfragmente werden im Allgemeinen als SH1- (Aminosäuren 681-689) und SH2-Helices (Aminosäuren 669-678) bezeichnet, aufgrund von reaktiven Cysteinresten, die in Skelettmuskel-Myosinen gefunden wurden. Chemische Modifizierung der SH1 und SH2 resultieren in drastischer Veränderung der Myosin-ATPase Aktivität und Aktinbindungsaffinität.^{143,144} Im Falle des *Dd* Myosin-2 ist eine dieser

Thiolpositionen (SH1) durch einen Threoninrest (T688) besetzt.¹⁴⁵ Es wurde gemutmaßt, dass Veränderungen des Nukleotidzustandes im aktiven Zentrum zu Konformationsänderungen in der reaktiven Thiolregion führen.^{25,146} Tatsächlich ist die SH1/SH2-Region zusammen mit den benachbarten Strukturelementen, der Relayhelix und dem zentralen siebensträngigen β -Faltblatt, an der Weiterleitung energetischer Informationen vom aktiven Zentrum zur mechanischen Verstärkereinheit, dem Konverter und Hebelarm, während des chemomechanischen Zyklus‘ beteiligt. Die reaktive Thiolregion ist also Teil des Kopplungsmechanismus‘, der den Zustand des aktiven Zentrums mit der Konverter/Hebelarmposition koppelt und spielt damit eine entscheidende Rolle für die Krafterzeugung des Myosinmotors.

Die SH1/SH2-Region von *Dd* Myosin-2 besitzt drei konservierte Glycinreste: G680, G684 und G691. Mutationen der Aminosäure G680 sind von besonderer Bedeutung, da sich diese Aminosäure in der unmittelbaren Nähe zum Drehpunkt der Hebelarmbewegung befindet. Die Mutation von G680 zu Alanin oder Valin führt zu großen Veränderungen der Bindungsaffinität verschiedener Nukleotide.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Beide Mutanten, G680A und G680V, zeigen eine geringe ATPase-Aktivität und Motilität.^{151,152} Die Geschwindigkeitsrate der ATP- und ADP-Bindung an G680A ist 16- bis 30-fach erniedrigt, wobei ADP jedoch 10-fach stärker an das Protein bindet, aufgrund einer 200-fachen Abnahme der ADP-Abgaberate.¹⁴⁷ Im Gegensatz dazu ist die ATP- und ADP-Bindung an Akto-G680A schneller als an den Wildtyp. Aktin zeigt weiterhin die Fähigkeit sowohl die Geschwindigkeit der ADP-Bindung, als auch die ADP-Abgabe bis zu einem Faktor von 62 zu beschleunigen, aber es reduziert nicht die Affinität von G680A für ADP, da das Verhältnis K_{AD}/K_D etwa 1 beträgt. Ein Verhältnis von 14 wurde hingegen für Konstrukte der Wildtyp-Motordomäne gemessen.¹⁴⁷ Erhöhte Temperaturen können dabei die Mutantendefekte kompensieren und die Myosin-Aktivität wiederherstellen.^{149,153}

3.1.1 Thermodynamische Untersuchung der Myosin-Nukleotid-Interaktion

Zur Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaften der ADP-Dissoziation und Affinität der G680-Mutanten wurden kinetische Untersuchungen mittels der *stopped flow* Technik in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. A. Geeves, Department of Biosciences, Universität Kent, Großbritannien, durchgeführt. In der Abwesenheit von Aktin wurden die Geschwindigkeitsraten der ADP-Dissoziation (k_D) des Wildtyps (M765-1R) und der G680A-Mutante durch Verfolgen der Änderung der Tryptophanfluoreszenz aufgrund des durch Zugabe von ATP ausgelösten Verdrängens von ADP aus dem Myosinkomplex gemessen. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten, bei denen ein Transient mit exponentiellem Verlauf unter gesättigten Bedingungen ($>40 \mu\text{M}$ ADP) beobachtet werden konnte und die beobachtete Geschwindigkeitsrate k_{obs} der Geschwindigkeitskonstante der ADP-Abgabe k_D entspricht. Im Vergleich zum Wildtyp mit k_D (20 °C) = $7,4 \text{ s}^{-1}$, war die Geschwindigkeit der ADP-Abgabe der G680A-Mutante in Abwesenheit von Aktin deutlich um einen Faktor von 100 verlangsamt auf k_D (20 °C) = $0,063 \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Geschwindigkeitskonstanten der ADP-Dissoziation und Aktivierungsenergien der Wildtyp- und Mutanten-Myosine.[§] * Wert aus Ref.¹⁴⁷ entnommen.

- Aktin	Konstrukt	$k_D(20^\circ\text{C})$ [s ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ·mol ⁻¹]	$A_{\text{Arrh.fakt.}}$ [ln(s ⁻¹)]
		Wildtyp	7.4	94.2
	G680A	0.06	54.9	20
+ Aktin	Konstrukt	$k_{AD}(20^\circ\text{C})$ [s ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ·mol ⁻¹]	$A_{\text{Arrh.fakt.}}$ [ln(s ⁻¹)]
		Wildtyp	215*	-
	G680A	1.0	41.3	17

Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen ergab einen Anstieg der maximalen Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von 1,6 s⁻¹ bei 10 °C auf 15,2 s⁻¹ bei 25 °C für den Wildtyp und von 0,038 s⁻¹ bei 10 °C auf 0,18 s⁻¹ bei 30 °C für die G680A-Mutante. Ein Arrhenius-Diagramm der Temperaturabhängigkeit der ADP-Dissoziationsrate in Abwesenheit von Aktin ist in Abbildung 3.2A gezeigt. Lineare Regression der Daten ergab dabei Aktivierungsenergien von $\Delta H^\ddagger = 94,2 \pm 3,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für den Wildtyp und $\Delta H^\ddagger = 54,9 \pm 7,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ für G680A, somit also einen 2-fachen Unterschied in der Aktivierungsenthalpie von G680A über den Wildtyp. In der Gegenwart von Aktin wurde die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Abgabe (k_{AD}) durch Analyse der durch das Verdrängen von ADP aus dem Akto-Myosin-Komplex, ausgelöst durch Zugabe von ATP, erzeugten exponentiellen Veränderung der Pyrenfluoreszenz unter gesättigten Bedingungen bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante der ADP-Abgabe aus dem Akto-G680A-Komplex war in Anwesenheit von Aktin 10-15-fach beschleunigt, $k_{AD}(20^\circ\text{C}) = 0.99 \text{ s}^{-1}$, wohingegen der Wildtyp eine 30-fache Beschleunigung, $k_{AD}(20^\circ\text{C}) = \sim 215 \text{ s}^{-1}$, aufwies.¹⁴⁷ Messung der Temperaturabhängigkeit von k_{AD} der G680A-Mutante ergab ein ähnliches Verhalten, verglichen zu dem ohne Aktin, mit einer Aktivierungsenergie, die um etwa 14 kJ·mol⁻¹ herabgesetzt war auf $\Delta H^\ddagger = 41.3 \pm 1.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Abbildung 3.2B).

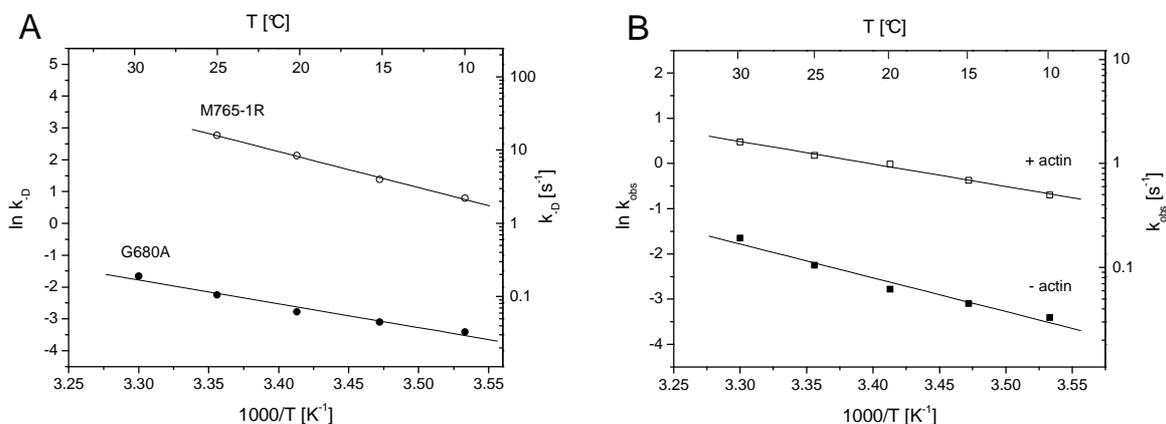


Abbildung 3.2: Arrhenius Diagramm.[§] (A) Temperaturabhängigkeit der ADP-Abgaberate vom Wildtyp (M765-1R) und G680A in Abwesenheit von Aktin. (B) Vergleich der Temperaturabhängigkeit der ADP-Dissoziationsrate von G680A in Anwesenheit und Abwesenheit von Aktin.

Die ADP-Affinitäten (K_D) des Wildtyps und der Mutanten in Abwesenheit von Aktin bei unterschiedlichen Temperaturen wurden ebenfalls durch Verfolgen der Tryptophanfluoreszenzänderung infolge der ATP-induzierten ADP-Verdrängung aus der Myosin-Motordomäne bei verschiedenen ADP-Konzentrationen gemessen. Die erhaltenen Transienten wurden mittels Anlegen einer exponentiellen Funktion zweiter Ordnung ausgewertet und die Amplituden der schnellen Phase wurden gegen die ADP-Konzentration aufgetragen, um die ADP-Affinitäten K_D (20 °C) = $6,6\text{ }\mu\text{M}$ für den Wildtyp und K_D (20 °C) = $1,3\text{ }\mu\text{M}$ für G680A zu erhalten (Abbildung 3.3). Wie in Abbildung 3.3C zu sehen, wurden die thermodynamischen Parameter durch lineare Regression der K_D -Werte bei unterschiedlichen Temperaturen im Van't-Hoff-Diagramm bestimmt. Die Berechnung der freien Gibbs-Energie nach der Gleichung $\Delta G^0 = -k_B T \cdot \ln K_D$ aus den bei einer Temperatur von 20 °C gemessenen Daten, zeigen nur einen geringen Unterschied in der freien Energie zwischen dem Wildtyp und der Myosinmutante, $\Delta\Delta G^0 \approx 4\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($\sim 10\%$). Allerdings konnte ein Unterschied von etwa 25% in der Enthalpie ΔH^0 beobachtet werden, der durch eine hohe positive Entropieänderung ΔS^0 (auch $\sim 25\%$ Unterschied) kompensiert wird (Tabelle 3.2).

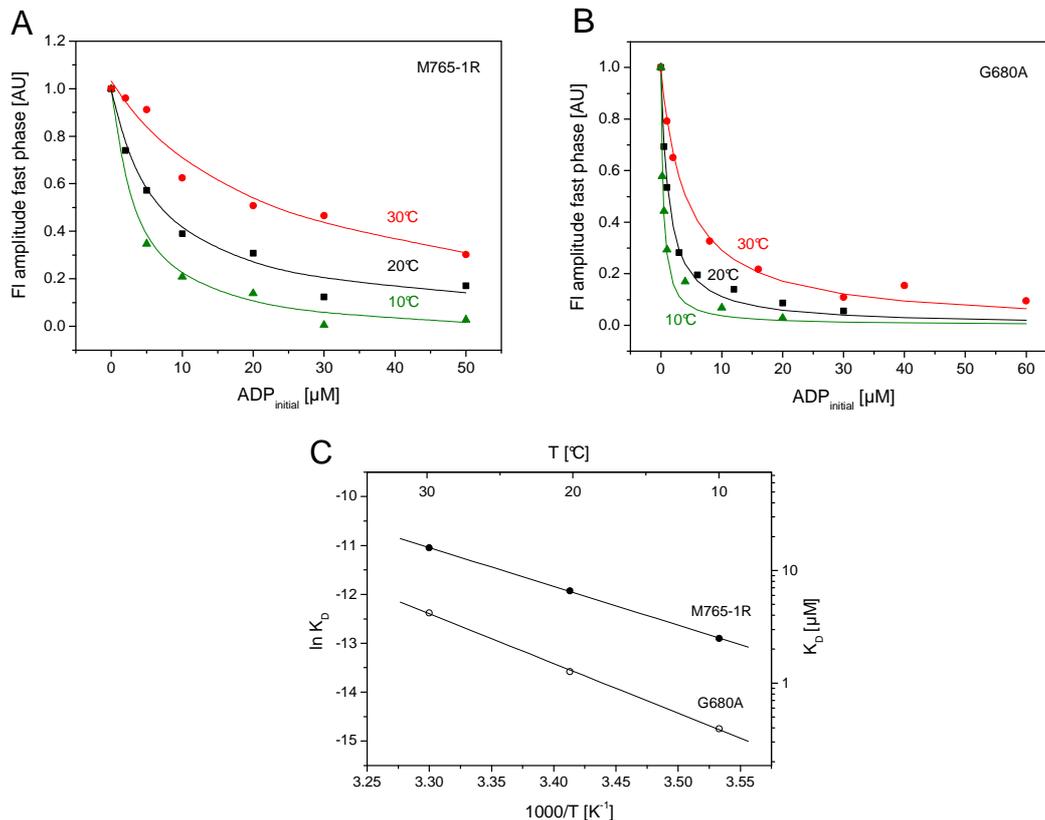


Abbildung 3.3: Temperaturabhängigkeit von K_D für den Wildtyp (M765-1R) und G680A.[§] **(A)** Bestimmung der ADP-Affinität K_D des Wildtyps in Abwesenheit von Aktin bei unterschiedlichen Temperaturen durch Auftragen der gemessenen Amplituden der schnellen Phase gegen die ADP-Konzentration. **(B)** Bestimmung der ADP-Affinität K_D von G680A in Abwesenheit von Aktin bei unterschiedlichen Temperaturen durch Auftragen der gemessenen Amplituden der schnellen Phase gegen die ADP-Konzentration. **(C)** Van't-Hoff-Diagramm der Temperaturabhängigkeit von K_D des Wildtyps und der G680A-Mutante.

[§] Die in diesem Kapitel gezeigten transienten kinetischen Untersuchungen wurden als Teil einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. M. A. Geeves, Universität Kent, Großbritannien von Dr. Nancy Adamek durchgeführt.

Die Affinität von ADP für Pyren-markiertes Akto·Myosin (K_{AD}) wurde aus der Inhibition der ATP-induzierten Dissoziation des Komplexes in Gegenwart von ADP ermittelt. Die Transienten zeigten einen exponentiellen Verlauf und die gemessenen k_{obs} -Werte wurden als Funktion der ATP-Konzentration aufgetragen und die Auswertung durch Anpassen einer Hyperbel ($k_{obs} = (K_1[ATP])/1+([ADP]/K_{AD})$) an die Daten ergab die ADP-Affinitäten in Anwesenheit von Aktin (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: ADP-Affinitäten und thermodynamische Parameter der Wildtyp- und Mutanten-Myosine.⁵

- Aktin	Konstrukt	K_D (20°C)	$\Delta G^\circ_{20^\circ C}$	ΔH°	ΔS°	$-T\Delta S^\circ_{20^\circ C}$
		[μM]	[$kJ \cdot mol^{-1}$]	[$kJ \cdot mol^{-1}$]	[$J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$]	[$kJ \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$]
	Wildtyp	7.5	28.7	65.7	126.3	-36.9
	G680A	2	32	84.0	175.4	-51.6

+ Aktin	Konstrukt	K_{AD} (20°C)	$\Delta G^\circ_{20^\circ C}$	ΔH°	ΔS°	$-T\Delta S^\circ_{20^\circ C}$
		[μM]	[$kJ \cdot mol^{-1}$]	[$kJ \cdot mol^{-1}$]	[$J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$]	[$kJ \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$]
	Wildtyp	243	20.3	11.2	-34.9	10.2
	G680A	0.5	35.3	30.3	-10.0	2.9

Keine wesentliche Veränderung von K_{AD} bei unterschiedlichen Temperaturen konnte für den Wildtyp beobachtet werden, wohingegen die G680A-Mutante eine etwa 100-fach höhere Affinität für ADP als der Wildtyp zeigte, mit einer leichten Temperaturabhängigkeit (Abbildung 3.4). Die Enthalpie- ΔH° und Entropie- ΔS° Änderungen der Mutanten waren ca. 3-fach höher als die des Wildtyps (Abbildung 3.4C). Nach Zugabe von Aktin wurde für den Wildtyp eine Absenkung von mehr als $8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ der freien Energie ΔG° beobachtet, aber ein Anstieg von $3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ für G680A. Demzufolge nimmt die Affinität des Wildtyps für ADP nach Zugabe von Aktin rapide ab, während sie weitaus weniger betroffen ist in der G680A-Mutante (Tabelle 3.2).

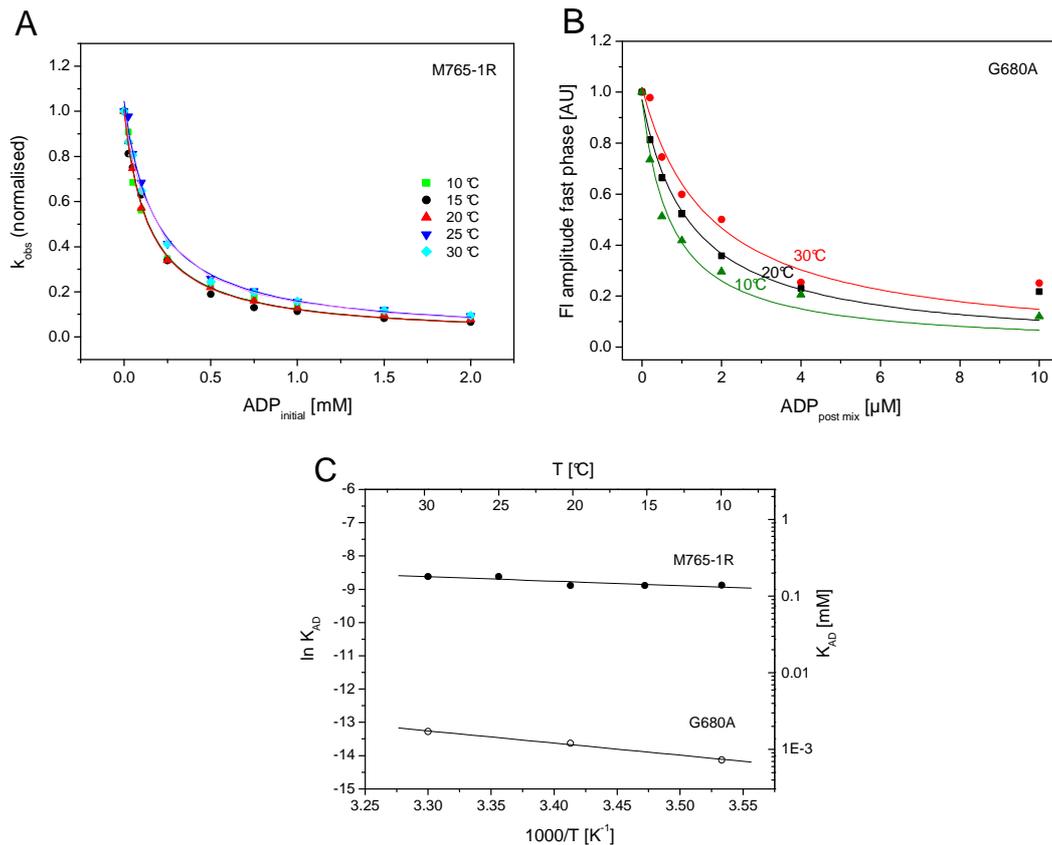


Abbildung 3.4: Temperaturabhängigkeit von K_{AD} des Wildtyps und der G680A-Mutante.^ζ **(A)** Bestimmung der ADP-Affinität K_{AD} des Wildtyps (M765-1R) in Anwesenheit von Aktin durch Verfolgen der Pyrenfluoreszenzänderung mit der Zeit bei verschiedenen Temperaturen und ADP-Konzentrationen. **(B)** Bestimmung der ADP-Affinität K_{AD} der G680A-Mutante in Gegenwart von Aktin bei unterschiedlichen Temperaturen. **(C)** Van't-Hoff-Diagramm der Temperaturabhängigkeit von K_{AD} für den Wildtyp und G680A in Anwesenheit von Aktin zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter.

3.1.2 Strukturelle Auswirkung der G680-Mutation

Röntgenkristallstrukturen der G680A (PDB Code: 2Y0R) und G680V (PDB Code: 2Y9E) Mutanten in der Abwesenheit eines Nukleotids, sowie G680A im Komplex mit ADP (PDB Code: 2Y8I) wurden durch Dampfdiffusion erhalten und mit der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst. Die G680A und G680V apo-Strukturen wurden bis zu einer Auflösung von 2.85 Å, bzw. 3.4 Å verfeinert. Beide Motordomänenstrukturen im apo-Zustand zeigen eine hohe Ähnlichkeit zueinander, aber unterscheiden sich deutlich von der zuvor publizierten Struktur der Nukleotid-freien *Dd* Wildtyp-Motordomäne (PDB Code: 2AKA). Im Mittelpunkt der beobachteten Unterschiede steht der geöffnete 50 kDa Spalt in den Mutantenstrukturen und Umlagerungen in den γ -Phosphatsensoren des aktiven Zentrums, hauptsächlich Schalter-1 und Schalter-2, was zu einer geöffneten Nukleotidbindungstasche führt, mit der kritischen Salzbrücke zwischen Arg238 (Schalter-1) und Glu459 (Schalter-2) unterbrochen. Die Relayhelix ist in der gestreckten Konformation und die Konverterdomäne in der *down* Position (Abbildung 3.5). Die hohe Ähnlichkeit zu den Kristallstrukturen mit gebundenem ADP·BeF₃ (PDB Code: 1MMD), im Komplex mit ADP (PDB Code: 1MMA) und verwandten Strukturen bestätigt, dass die G680-Mutantenstrukturen im apo-Zustand einen *post-rigor*

ähnlichen Zustand einnehmen. Dennoch gibt es auch deutliche Unterschiede, in den Wechselwirkungen der SH1/SH2-Region mit der Relayhelix, sowie dem zentralen β -Faltblatt, zu bisher veröffentlichten Strukturen im *post-rigor* Zustand.

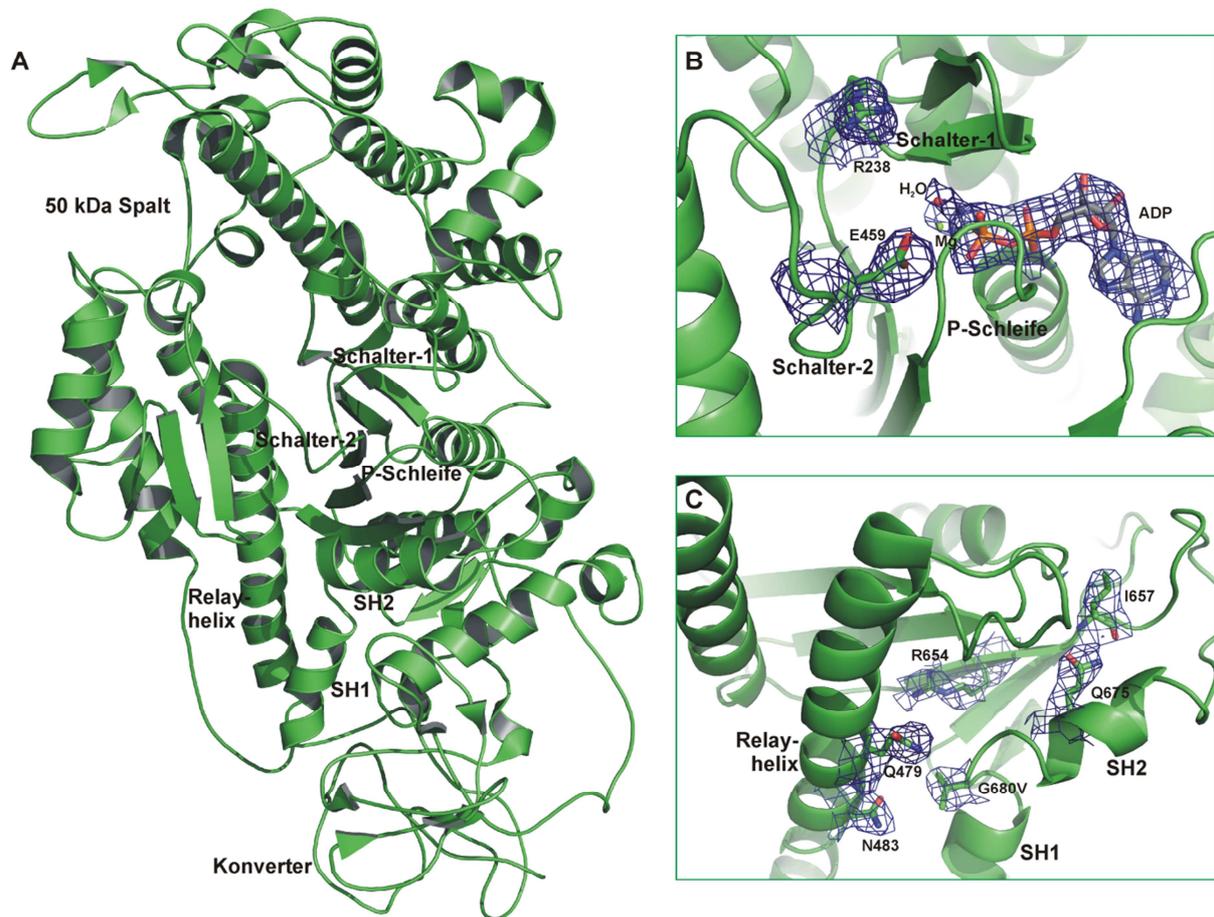


Abbildung 3.5: Röntgenkristallstrukturen der G680-Mutanten. **(A)** Übersicht der G680A-apo-Motordomänenstruktur. Strukturelle Merkmale, die den Zustand definieren sind angegeben. **(B)** Ausschnitt des aktiven Zentrums aus der G680A-ADP-Komplexstruktur. Das Fehlen von Elektronendichte für die γ -Phosphatposition ist deutlich zu erkennen, trotz der Verwendung von ADP und VO_3 in den Kristallisationsansätzen. Die kritische Salzbrücke zwischen Arg238 und Glu459 ist nicht ausgebildet und das aktive Zentrum somit im geöffneten Zustand. Die Elektronendichtekarten wurden ohne Nukleotid berechnet. **(C)** Struktur der reaktiven Thiolregion in G680V. Die Elektronendichten zeigen die $2F_o - F_c$ Karten, konturiert bei 1σ .

Der *post-rigor* Zustand, der nach der Definition dem stark an Aktin gebundenen *rigor* Zustand folgt, wird durch die Bindung von ATP an die Myosin-Motordomäne eingeleitet und zeichnet sich durch einen offenen 50 kDa Spalt, Schalter-2 in der geöffneten Konformation, mit der nicht ausgebildeten kritischen Salzbrücke zwischen Arg238 und Glu459, dem zentralen β -Faltblatt nicht verdreht, einer gestreckten Relayhelix und dem Konverter, sowie Hebelarm in der *down* Position, aus. Verfügbare Röntgenkristallstrukturen der *Dd* Myosin-2 Motordomäne im *post-rigor* Zustand zeigen ein umfassendes Wasserstoffbrückennetzwerk der reaktiven Thiolregion mit der Relayhelix und dem zentralen β -Faltblatt, das sich um die SH1/SH2-Verbindungsschleife ballt, in der sich G680 befindet (Abbildung 3.6). Wechselwirkungen zwischen der Thiolregion und dem dritten Strang (β_3) des

siebensträngigen β -Faltblattes umfassen Wasserstoffbrücken zwischen Glu675^{SH1/SH2} und Hauptkettenatomen von Ile657 ^{β^3} , sowie eine direkte Wasserstoffbrücke zwischen Asn679^{SH1/SH2} und Arg654 ^{β^3} und ein Wassernetzwerk, das die SH1/SH2-Region über die Aminosäuren Arg654 ^{β^3} , Cys655 ^{β^3} , Glu675^{SH1/SH2} und Asn679^{SH1/SH2} an das zentrale β -Faltblatt koppelt. Des Weiteren sind Wasserstoffbrücken zwischen Glu479^{Relayhelix} und Arg654 ^{β^3} , eine wasservermittelte Wechselwirkung zwischen Glu479^{Relayhelix}, Asn483^{Relayhelix} und Glu683^{SH1/SH2}, sowie eine wasservermittelte Interaktion zwischen der Hauptkettencarbonylgruppe von Leu478^{Relayhelix} und Arg654 ^{β^3} ausgebildet. Letztere Wechselwirkungen ermöglichen die Kommunikation der langen Relayhelix der L50 kDa Domäne zur SH1/SH2-Region und dem zentralen β -Faltblatt. Im Gegensatz dazu sind die meisten dieser Interaktionen zwischen der reaktiven Thiolregion und der Relayhelix, bzw. dem zentralen β -Faltblatt in den Strukturen der G680-Mutanten gestört. Die Einführung einer aliphatischen Seitenkette durch Alanin oder Valin in Position 680 führt zu einer Verschiebung der reaktiven Thiolregion etwa 2-3 Å weg von der Relayhelix, mit einer mittleren quadratischen Abweichung (RMSD; engl., *root mean square deviation*) von etwa 2,2-2,7 Å.

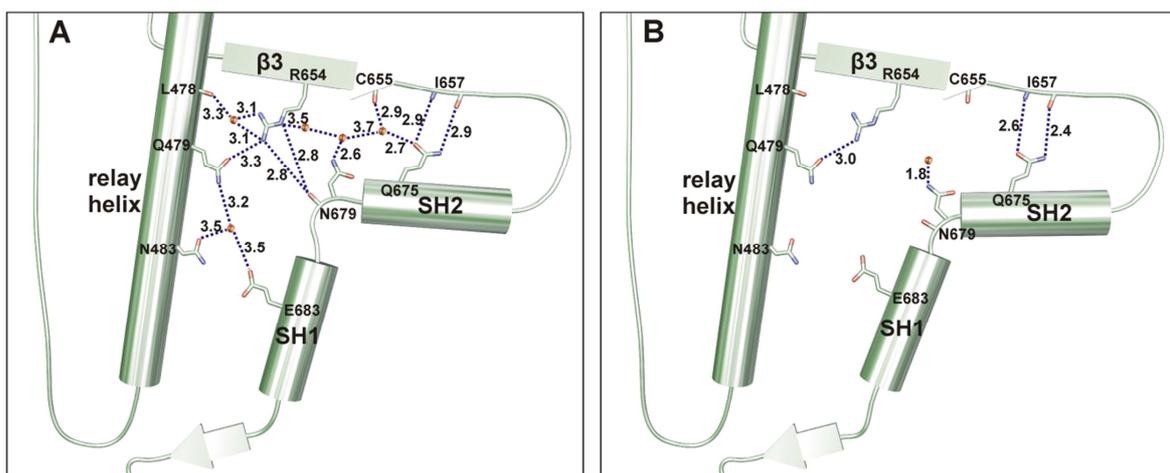


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen, die die reaktive Thiolregion an die umgebenden Strukturelemente koppelt. **(A)** Wechselwirkungen im Wildtyp. **(B)** Wechselwirkungen in den G680-Mutanten.

Zusätzlich zu den apo-Strukturen wurde eine Röntgenkristallstruktur der G680A-Mutante im Komplex mit einem Nukleotid bis zu einer Auflösung von 3.13 Å gelöst. Um die Myosin-Motordomäne im *pre-power stroke* Zustand zu kristallisieren, sollte das Nukleotidanalogen ADP·VO₃ in den Kristallisationsansätzen verwendet werden. Dennoch konnte, trotz der Verwendung von 2 mM ADP und 2 mM VO₃ während der Kristallisation, keine Elektronendichte für das γ -Phosphat-nachahmende VO₃-Anion in der Nukleotidbindungstasche gefunden werden (Abbildung 3.5B). Darüber hinaus zeigt die G680A-ADP-Komplexstruktur die Myosin-Motordomäne in einem ähnlichen *post-rigor* Zustand, der auch für die Nukleotid-freien Mutantenstrukturen beobachtet wurde. Die P-Schleife, Schalter-1 und Schalter-2 wurden in Positionen gefunden, die eine offene Nukleotidbindungstasche erzeugen. Der große 50 kDa Spalt ist geöffnet und die Relayhelix nicht abgeknickt, wodurch

der Konverter und Hebelarm in der *down* Position verbleiben. Allerdings wurden schon vorher Wildtyp *Dd* Myosin-2 Motordomänenkonstrukte im Komplex mit ADP erhalten, die unter kristallographischen Bedingungen einen *post-rigor* Zustand einnehmen.¹⁵⁴ Analyse der normalisierten kristallographischen B-Faktoren zeigt eine Erniedrigung der thermischen Mobilität bestimmter Teile der Motordomäne in den Mutantenstrukturen, einschließlich des größten Teils der L50 kDa Domäne, insbesondere der Relayhelix und Schalter-2 (Abbildung 3.7). Dieser Kühlungseffekt ist weitaus deutlicher in der G680V-Mutante ausgebildet, was auch mit einer stärkeren Störung der Myosinfunktion in dieser Mutante gegenüber G680A korreliert.

3.1.3 Dynamische Untersuchung der G680-Mutation

Zur Untersuchung der dynamischen Eigenschaften und des Einflusses der G680-Mutation auf die Dynamik der Myosin-Motordomäne wurden Moleküldynamik-Simulationen (MD) mit dem Programmpaket Gromacs 4.0¹⁴² und dem OPLS *all-atom* Kraftfeld¹⁴⁰ durchgeführt. Die Simulationen fanden in explizitem Lösemittel unter Verwendung des TIP4P Wassermodells¹⁵⁵ statt. Als Startkoordinaten dienten die gelösten Röntgenstrukturen der G680A- und G680V-Mutanten. Für die Simulationen des Wildtyps wurden die Koordinaten der *Dd* Myosin-2 Motordomäne im *rigor* Zustand (PDB Code: 2AKA) verwendet. Die MD-Simulationen wurden in einem *NpT* Ensemble bei einer Temperatur von 300 K (Berendsen Wärmebad) und einem Druck von 1 bar (Parrinello-Rahman Druckkopplung) ausgeführt. Weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen wurden mittels der particle-mesh Ewald¹⁵⁶ Methode beschrieben, wohingegen kurzreichende van-der-Waals- und Coulomb-Kräfte durch 14 Å, bzw. 10 Å *cutoffs* berücksichtigt wurden. Ein 2 fs Zeitintervall für die Integration wurde während der MD-Simulationen gewählt und alle Bindungslängen wurden durch den LINCS Algorithmus¹⁵⁷ reguliert. Nach einer anfänglichen Energieminimierung der Strukturen mit dem *steepest descent* Algorithmus bis zu einer Kraft von 1000 kJ·mol⁻¹·nm⁻¹ wurden die Koordinaten zusätzlich mit der Methode des konjugierten Gradienten (*conjugate gradient*) bis zu einer endgültigen Kraft von <10 kJ·mol⁻¹·nm⁻¹ optimiert. Die Wassermoleküle wurden über einen Zeitraum von 100 ps equilibriert, wonach eine Equilibrierung des gesamten Systems für etwa 4 ns durchgeführt wurde. In dieser Zeit erreichte die RMSD der Hauptkettenatome ein Plateau und die Produktionsläufe wurden gestartet. Analyse der 100 ns Trajektorien ergaben eine Bewegung der U50 kDa und L50 kDa Domänen aufeinander zu, was zu einem Schließen des 50 kDa Spaltes in der Myosin-Motordomäne der G680-Mutanten führte (Abbildung 3.8A). Das Schließen des Spaltes wurde zum größten Teil durch eine Rotationsbewegung der U50 kDa Domäne um etwa 6-8 Å erreicht. Verbunden damit konnte eine Umlagerung von ~7 Å von Schalter-1 in Richtung Schalter-2 im aktiven Zentrum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, blieb die Konformation von Schalter-2 relativ stabil über die Simulationszeit und fluktuierte nur wenig um ihre geöffnete Position.

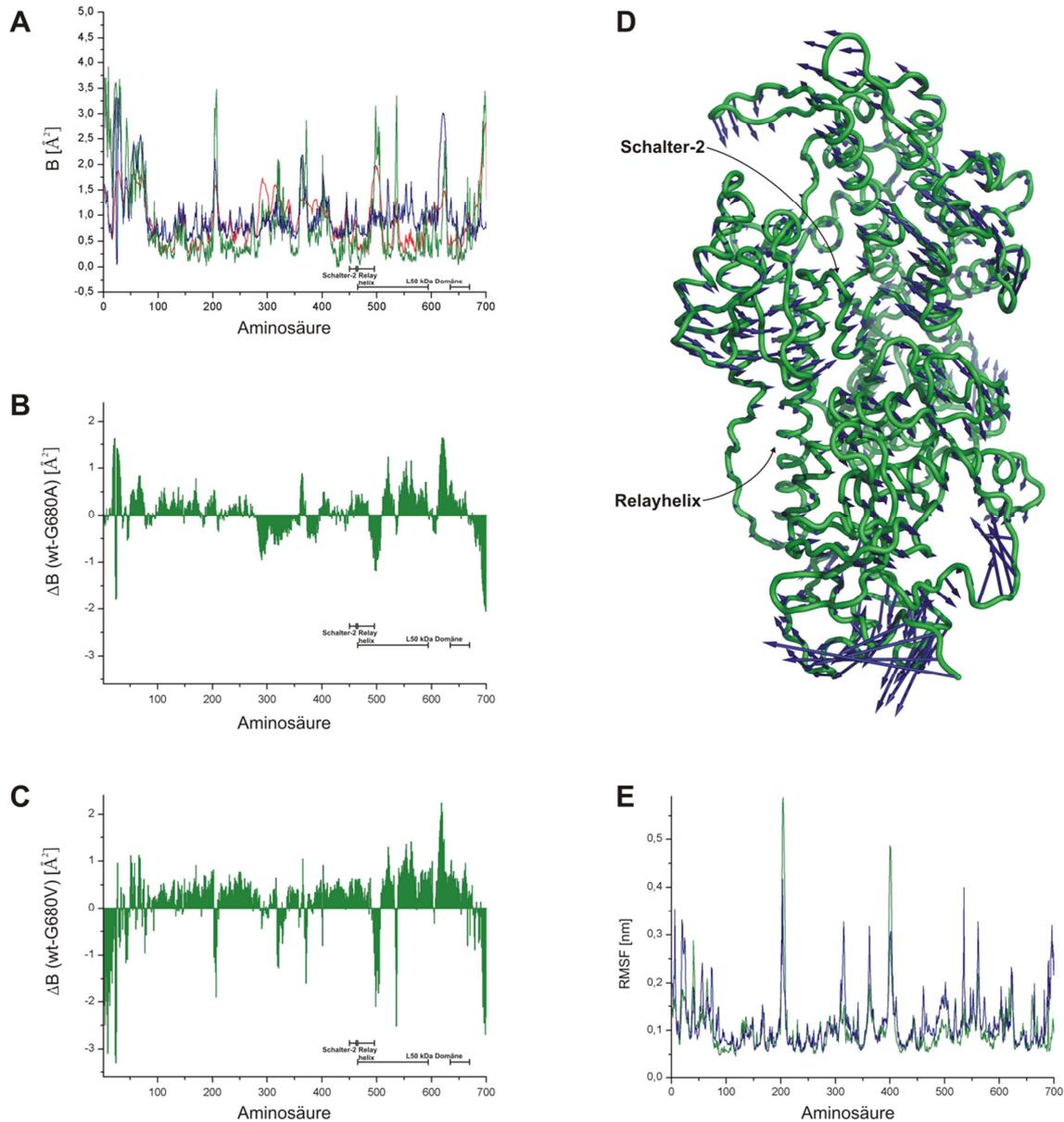


Abbildung 3.7: Analyse der Fluktuationen und internen Mobilität in den Wildtyp- und Mutanten-Myosinen. **(A)** Diagramm der normalisierten kristallographischen B-Faktoren aufgetragen gegen die Aminosäurereste des Wildtyps (Blau), G680A (Rot) und G680V (Grün). Eine Reduzierung der B-Faktoren in der L50 kDa Domäne, der Relayhelix und Schalter-2 ist deutlich zu sehen. **(B)** Histogramm von ΔB (Wildtyp – G680A). **(C)** Histogramm von ΔB (Wildtyp – G680V). Der Effekt ist unverkennbar höher in der G680V-Mutante. **(D)** Darstellung des ersten Eigenvektors, erhalten durch Hauptkomponentenanalyse der MD-Trajektorien und aufgetragen als Verschiebungsvektoren der C_{α} -Atome von G680A. Das Protein ist als Schleifenmodell dargestellt. Sowohl die Relayhelix, als auch Schalter-2 zeigen kaum Mobilität. **(E)** Vergleich der mittleren quadratischen Fluktuationen (RMSF) des Wildtyps (Blau) und von G680A (Grün), berechnet aus den MD-Simulationen.

Zur Identifizierung von umfangreichen kollektiven atomaren Fluktuationen in der Myosin-Motordomäne wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA; engl., *principal component analysis*) der Trajektorien durchgeführt. PCA basiert auf der Berechnung der Kovarianzmatrix kollektiver Atombewegungen und Diagonalisierung der Kovarianzmatrix liefert eine Matrix von Eigenvektoren und ein Set von Eigenwerten. Eine Projizierung der Eigenvektoren auf die G680A-Mutantenstruktur ist in Abbildung 3.7D gezeigt. Die atomaren Fluktuationen um die

reaktive Thiolregion, einschließlich der Relayhelix und Schalter-2, sind deutlich herabgesetzt. Die Diagonale der Kovarianzmatrix stellt die mittleren quadratischen Fluktuationen (RMSF; *engl., root mean square fluctuations*) des Systems dar. Abbildung 3.7E zeigt einen Vergleich der RMSF der Mutanten-Motordomäne gegen den Wildtyp. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung mit der kristallographischen B-Faktor-Analyse und deuten auf eine Reduzierung der internen Flexibilität der Myosin-Motordomäne durch die G680-Mutation.

Zusätzlich wurden *in silico* Mutationen der Wildtyp *Dd* Myosin-2 Motordomäne zu G680A, bzw. G680V durchgeführt, um den Einfluss der Mutation auf die reaktive Thiolregion zu untersuchen. Das mutierte System wurde vor den 100 ns MD Simulationen wie oben beschrieben energieminiert und equilibriert. Entlang der Simulationen bewegte sich die SH1/SH2-Verbindungsschleife weg von der Relayhelix und erreichte die endgültige Position etwa 2-3 Å entfernt von der Ausgangsposition nach ~50 ns Simulationszeit (Abbildung 3.8B). Die Verschiebung des N-terminalen Abschnitts der SH2-Helix war weitaus stärker, als die des C-terminalen Teils. Die Verrückung der reaktiven Thiolregion war deutlich ausgeprägter im Falle der Einführung der G680V-Mutation.

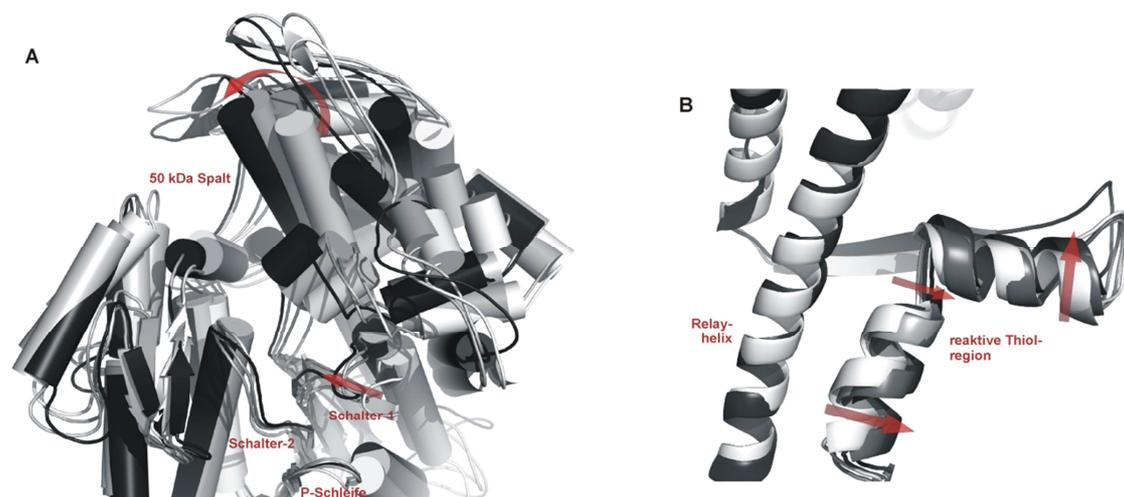
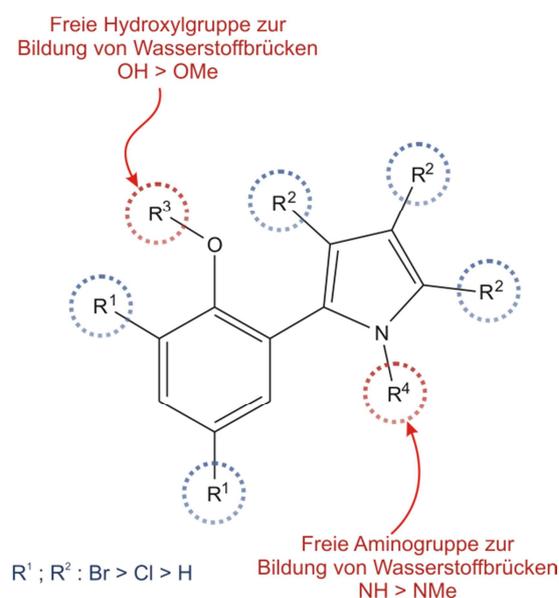


Abbildung 3.8: Momentaufnahmen der MD-Simulationen bei 300 K. **(A)** Die U50 kDa Domäne der G680A-Mutante vollführt eine Rotationsbewegung entlang der Trajektorie um den 50 kDa Spalt in der Myosin-Motordomäne zu schließen. Schalter-1 ändert seine Konformation maßgeblich, während die Position von Schalter-2 stabil bleibt. **(B)** Die reaktive Thiolregion bewegt sich deutlich weg von der Relayhelix während der 100 ns *in silico* mutierten Myosin-MD-Simulationen. Die Start- und Endpositionen sind in Weiß, bzw. Schwarz angezeigt. Intermediäre Strukturen entlang der Trajektorie sind in Grau gegeben und die Verschiebungen durch rote Pfeile angedeutet.

3.2 Untersuchung von *Dd* Myosin-2 Effektoren

3.2.1 Struktur-Aktivitätsbeziehung halogener Pseudiline

Halogenierte Pseudiline (2-Phenylpyrrole) gehören zu den antibiotischen Naturstoffen und wurden zuerst aus den marinen Bakterien der Gattung *Chromobacterium*, und *Pseudomonas bromoutilis* und *Alteromonas luteoviolaceus* isoliert. Sie besitzen antiproliferative, antimikrobielle und phytotoxische Aktivitäten und zeigen eine hemmende Wirkung auf humane 12- und 15-Lipoxygenasen, sowie Leberesterase.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Verschiedene Synthesewege wurden bereits für die Totalsynthese halogener Pseudiline beschrieben.^{158,161-163} Für die Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten halogenierten Pseudiline wurde eine Silber(I)-katalysierte, oxidative Cyclisierung von Homopropargylaminen zu 2-arylsubstituierten Pyrrolen verwendet und in der Arbeitsgruppe von Prof. H.-J. Knölker, Technische Universität Dresden durchgeführt.¹⁶⁴ Hinweise auf eine mögliche inhibitorische Wirksamkeit halogener Pseudiline wurden zunächst in einem kolorimetrischen Prüfverfahren, basierend auf einem Malachitgrün-gekoppelten Testsystem, einer Substanzbibliothek gewonnen.¹⁶⁵ Pentabrompseudilin (PBP) (**25**) zeigte dabei die höchste Aktivität und hemmte in nachfolgenden funktionalen Experimenten myosinabhängige Prozesse. Kinetische *steady state* ATPase-Messungen in der Gegenwart von F-Aktin, unter Verwendung verschiedener Myosinisoformen ergaben eine Präferenz des PBPs zur Hemmung von Klasse-5 Myosinen über Mitgliedern der Klassen 1 und 2. Die höchste Affinität und geringste halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von etwa 1,2 μM wurde für das Myosin-5a aus Huhn beobachtet. Im Gegensatz dazu, zeigte das fünffach chlorierte Derivat Pentachlorpseudilin (PCIP) (**29**) in begleitenden Studien und Zusammenarbeit mit anderen Institutsmitgliedern eine völlig andere Spezifität, mit der höchsten inhibitorischen Stärke auf Klasse 1 Myosine ($IC_{50} \approx 1,0 \mu M$ für *Dd* Myosin-1b) und nur einen IC_{50} -Wert von etwa 100 μM auf Myosine der Klassen 2 und 5. Die kristallographische Analyse der PBP- und PCIP- *Dd* Myosin-2 Komplexe deckten eine zuvor unbekannte allosterische Bindungstasche in der Myosin-Motordomäne auf, die sich nahe der Aktinbindungsregion befindet, etwa 7,5 Å entfernt von der Blebbistatin-Bindungsstelle und 16 Å entfernt vom aktiven Zentrum (PDB Codes: 2JHR und 2XEL). Trotz der beträchtlichen Menge an kinetischen, mechanischen und strukturellen Daten zur Hemmung der Myosin-Aktivität durch PBP und PCIP bleiben die Details, wie die halogenierten Pseudiline wirken ungelöst. Aus diesem Grund wurden umfangreiche Struktur-Aktivitätsstudien (SAR; *engl.*, *structure-activity relationship*) von 11 ausgewählten Pseudilinderivaten durchgeführt. Die Verbindungen sind untereinander sehr ähnlich, aber unterscheiden sich in der Art der Substituenten an den Phenol- und Pyrrolringen. Sowohl bromierte als auch chlorierte Verbindungen, sowie Pseudiline mit gemischter Substitution wurden verwendet. Des Weiteren sind einige der Substanzen an der Hydroxylgruppe oder an der Aminogruppe des Pyrrolrings methyliert (Tabelle 3.3). Die Kombination aus statischen kristallographischen Ansätzen und kinetischen Experimenten in Verbindung mit dynamischen Computersimulationen liefern Einsicht in den Mechanismus, der für die Inhibition der Myosin-Motoraktivität durch halogenierte Pseudiline verantwortlich ist.

Tabelle 3.3: Hemmung der Myosin ATPase-Aktivität durch die halogenierten Pseudilinen.

Verbindungen	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ [μM]
23	H	H	H	H	kein Effekt
24	H	H	Me	H	kein Effekt
25	Br	Br	H	H	24.4 ± 1.5
26	Br	Br	Me	H	91.9 ± 1.2
27	Br	Br	H	Me	125.4 ± 7.5
28	H	Br	Me	H	182.2 ± 14.4
33	Cl	Br	H	H	47.2 ± 3.2
29	Cl	Cl	H	H	126.3 ± 21.0
30	Cl	Cl	Me	H	274.5 ± 16.5
31	Cl	H	Me	H	n/a
32	H	Cl	Me	H	n/a

3.2.1.1 Strukturelle Analyse

Die Kristallstrukturen der Komplexe von *Dd* Myosin-2 mit den Liganden **25** und **29** (PDB Codes: 2JHR und 2XEL) im *post-recovery stroke* Zustand (Anmerkung: in der Literatur wird hier auch oft vom *pre-power stroke* Zustand gesprochen) wurden in begleitenden Studien durch Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern des Arbeitskreises gelöst und deckten eine völlig neue allosterische Bindungstasche in der Myosin-Motordomäne auf. Die von den Pseudilinen bevorzugte Bindungstasche ist, wie zuvor beschrieben, etwa 16 Å von der Nukleotidbindungstasche entfernt, in der Nähe der Aktinbindungsregion an der Spitze des 50 kDa Spaltes. Die Tasche besitzt Öffnungen zum Äußeren des Proteins, sowie zur 50 kDa Spalte, die die U50 kDa und L50 kDa Domänen im Myosinkopf unterteilt. Trotz der konservierten Bindungsstelle wurden die Pseudiline **25** und **29** in abweichenden Bindungskonformationen vorgefunden und beteiligen sich an unterschiedlichen Wechselwirkungen zum Protein.

Um den Bindungsmodus halogenerter Pseudiline mit gemischter Substitution aufzuklären und einen Vergleich der Bindungsverhalten verschiedener Pseudiline zu ermöglichen, wurde der ternäre Komplex, gebildet aus der *Dd* Myosin-2 Motordomäne, Adenosindiphosphat-*meta*-Vanadat (ADP·VO₃) und 2,4-Dichlor-6-(3,4,5-tribrom-1*H*-pyrrol-2-yl)phenol oder Tribromdichlorpseudilin (TBDCIP) (**33**), kristallisiert. Zusätzlich wurde der Komplex von *Dd* Myosin-2 mit PBP (**25**) in Anwesenheit von ADP·VO₄ gelöst, um den Einfluss des Nukleotidzustandes auf die Bindung der Pseudiline zu untersuchen. Die Komplexkristallstrukturen wurden mittels Molekularen Ersatzes bis zu einer Auflösung von 2.4 Å (*Dd* Myosin-2-**33**·ADP·VO₃; PDB Code: 2XO8), bzw. 3.0 Å (*Dd* Myosin-2-**25**·ADP·VO₄) gelöst. Verbindung **33** bindet an die gleiche Bindungsstelle, die zuerst mit PBP (**25**) und auch für

PCIP (**29**) entdeckt wurde, allerdings in einer deutlich anderen Art und Weise als die vorher beobachteten Bindungsmuster. Die Phenol- und Pyrrolringe von **33** und **29** nehmen beide die *anti*-Konformation ein, während Verbindung **25** in der *syn*-Konformation, sowohl in der Komplexstruktur mit *meta*-Vanadat, als auch mit *ortho*-Vanadat, gefunden wurde. In der neuen Komplexstruktur von Myosin-2 mit Substanz **33** werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe des Phenolrings und Arg428, sowie zwischen der Aminogruppe des Pyrrolrings und Lys265 ausgebildet (Abbildung 3.9). Verschiedenste Wechselwirkungen, sowohl polarer, als auch hydrophober Natur, werden zwischen den Halogenen des Pseudilins und Proteinseitenketten beobachtet.

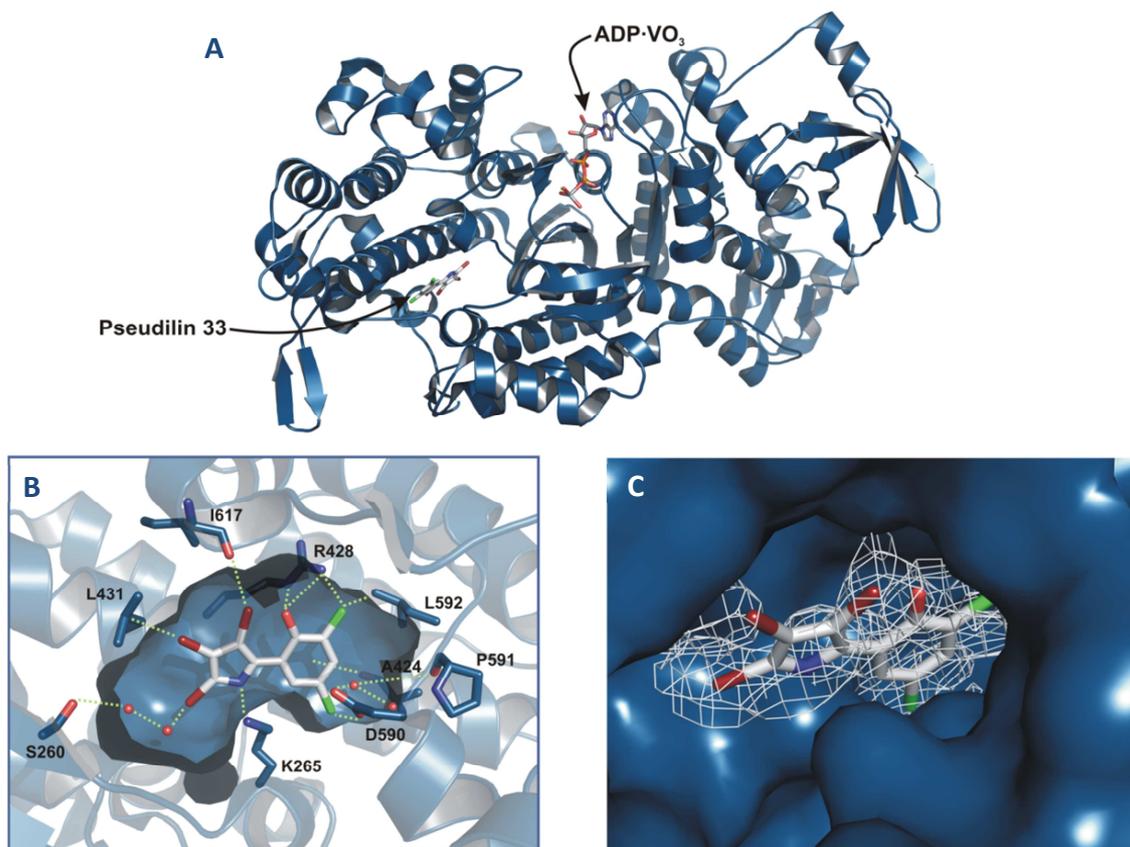


Abbildung 3.9: Röntgenkristallstruktur der *Dd* Myosin-2 Motordomäne im Komplex mit Inhibitor **33** und ADP-VO₃. **(A)** Übersicht des verfeinerten Modells der Röntgenstruktur als Bänderdarstellung. **(B)** Bindungsmodus und Wechselwirkungsmuster von Pseudilin **33** in der Myosinbindungstasche. **(C)** Ausschnitt der *composite* 2F_o-F_c Elektronendichtekarte, berechnet ohne Anwesenheit des Inhibitors und konturiert bei 1,0 σ.

Im Gegensatz dazu ist Arg428 nicht an direkten Wasserstoffbrücken, weder zur Hydroxylgruppe, noch zur freien Aminogruppe, in den Strukturen von **25** und **29** beteiligt. In diesen Strukturen interagiert Arg428 mit dem aromatischen Phenolring der Pseudiline. Lys265 ist in allen drei Fällen an Wasserstoffbrückenbindungen entweder zur OH- oder NH-Gruppe der Verbindungen beteiligt und scheint von außerordentlicher Bedeutung. Dieser Umstand wird besonders offenkundig beim Vergleich der Pseudilinkomplexstrukturen mit der Wildtyp-Röntgenstruktur ohne gebundenen Inhibitor im gleichen Zustand (PDB Code: 2JJ9). Die Konformation dieser Seitenkette weicht zwischen den Strukturen bis zu ~3,2 Å voneinander ab, mit einer mittleren quadratischen Abweichung (RMSD) von bis zu 1,04 Å².

Ein weiteres konserviertes Merkmal der Bindungsmodi der verschiedenen Pseudiline ist die Anwesenheit eines geordneten Zweiwasserclusters, welches die Wechselwirkung der Inhibitoren zum Motorprotein vermittelt. Diese Wassermoleküle werden vorrangig durch die Aminosäurereste Ala420, Asp590 und Pro591 in Position gehalten. Ein Vergleich der Position der Verbindung **33** mit gemischter Halogensubstitution und Inhibitor **25** zeigt eine Verschiebung von 1,0-1,3 Å des Pyrrolrings, wohingegen die Phenolringe einen Versatz von ~2,5 Å und eine Rotation um ~180° gegeneinander aufweisen. Ligand **29** ist, im Vergleich zu **33**, um etwa 3,0-3,4 Å in Richtung von Schleife 2 verschoben und um annähernd 180° rotiert (Abbildung 3.10). Eine Reihe von kleineren Anpassungen der Aminosäuren in der Bindungstasche wird zusätzlich beobachtet, als Ergebnis der Komplexbildung.

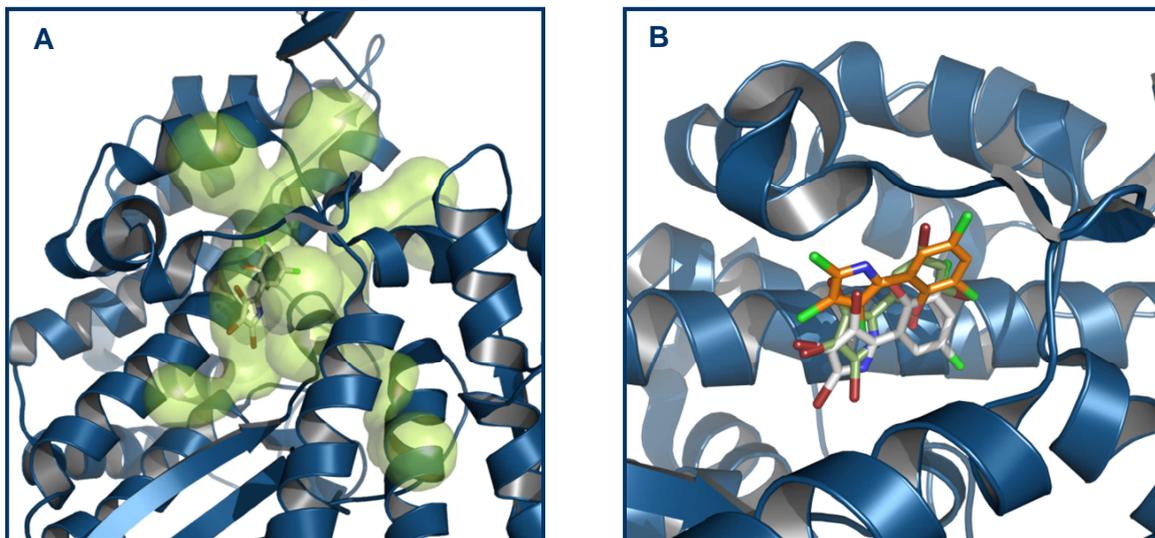


Abbildung 3.10: (A) Darstellung der verschiedenen Öffnungen und Tunnel (Hellgrün, transparente Oberflächendarstellung) der Pseudilinbindungstasche, die zum Äußeren des Proteins führen. Berechnet mit Caver.¹⁶⁶ (B) Die verschiedenen Bindungsorientierungen der Pseudiline, die in den Röntgenkristallstrukturen beobachtet wurden. Farbcode der Liganden: Kohlenstoff: Oliv = Inhibitor **25**, Weiß = Inhibitor **33**, Orange = Inhibitor **29**; Stickstoff = Blau; Sauerstoff = Rot; Chlor = Grün und Brom = Braun.

In der Kristallstruktur von PBP (**25**) im Übergangszustand der ATP-Hydrolyse-reaktion von Myosin (*pre-power stroke* Zustand), erzeugt durch die Verwendung des Nukleotidanalogs ADP·VO₄ in den Kristallisationsansätzen, nimmt das Pseudilin **25** die gleiche Bindungskonformation ein, wie in der zuvor gelösten Struktur in Anwesenheit von ADP·VO₃ (PDB Code: 2JHR). Die Kristallstruktur wurde, wie oben beschrieben, bis zu einer Auflösung von 3,0 Å verfeinert. Die Elektronendichten für **25** sowie das Nukleotidanalogs ADP·VO₄ waren dabei eindeutig (Abbildung 3.11).

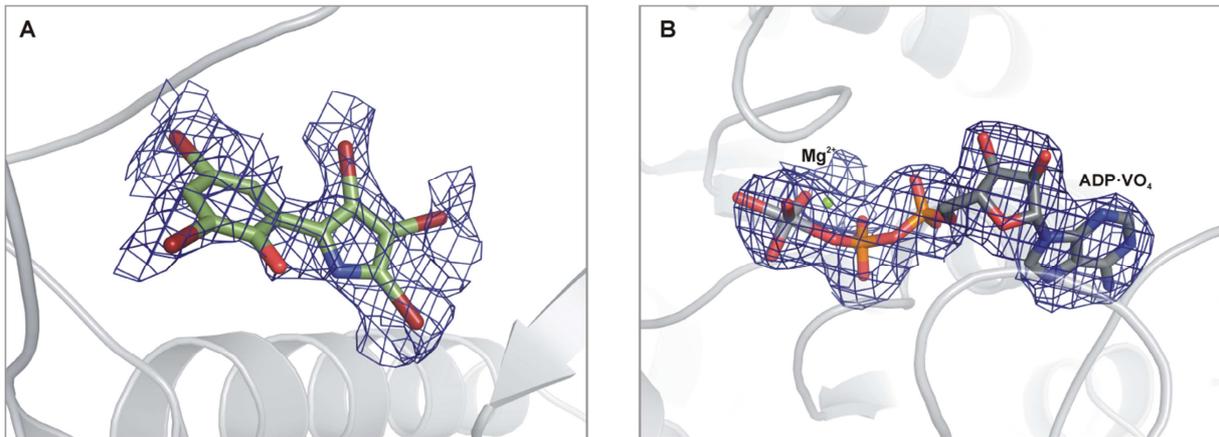


Abbildung 3.11: Ausschnitte der 2F_o-F_c Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von *Dd* Myosin-2 mit ADP-VO₄ und PBP (25). (A) Elektronendichte von Pseudilin 25 in der allosterischen Bindungstasche. (B) Elektronendichte für das Nucleotidanalogue ADP-VO₄ im aktiven Zentrum.

Nichtsdestotrotz, konnte ein leichter Versatz in der Bindungsposition von 25 in den beiden Strukturen beobachtet werden. Der Phenolring des Pseudilins ist um etwa 1,2 Å verschoben. Die Wechselwirkungen zwischen PBP und Myosinseitenketten in der Bindungstasche bleiben aber trotz dieser Verschiebung bestehen (Abbildung 3.12).

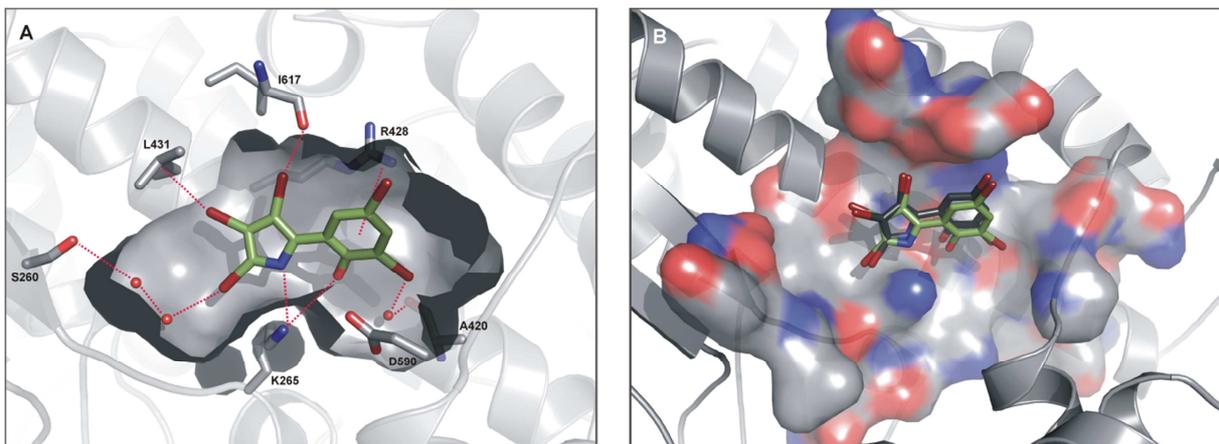


Abbildung 3.12: (A) Bindungsmodus und ausgebildete Wechselwirkung von Pseudilin 25 in der Komplexstruktur mit *Dd* Myosin-2 und ADP-VO₄. (B) Vergleich der beobachteten Bindungspositionen von Pseudilin 25 in den Komplexstrukturen von Myosin-2 mit ADP-VO₃ (Dunkelgrau, PDB Code: 2JHR) und ADP-VO₄ (Oliv). Deutlich zu erkennen ist der leichte Versatz in der Bindungsposition von 25 in den beiden Strukturen.

Um mehr Informationen über den Mechanismus der allosterischen Hemmung durch halogenierte Pseudiline zu erhalten und das Affinitäts- und Spezifitätsverhalten gegenüber unterschiedlichen Myosinisoformen zu rationalisieren, wurden die elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaften der Bindungstasche analysiert. Durch Lösen der Poisson-Boltzmann-Gleichung mit dem Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS)¹⁶⁷, wurde die Elektrostatik der kristallographisch definierten Tasche bestimmt. Die Innenseite der Bindungstasche weist eine Anzahl polarer Ballungspunkte (*hot spots*) auf, die an direkten Wasserstoffbrückenbindungen zu den Pseudilininhibitoren beteiligt sind. Allerdings können auch große Ansammlungen hydrophober Reste oder Flächen, die signifikant zur Bindung der

Inhibitoren beitragen und somit zur Entfaltung des inhibitorischen Effekts, ausgemacht werden. Die Halogensubstituenten der Liganden sind in diesen großen unpolaren Gebieten eingebettet und wechselwirken durch hydrophobe Kräfte mit dem Protein (Abbildung 3.13).

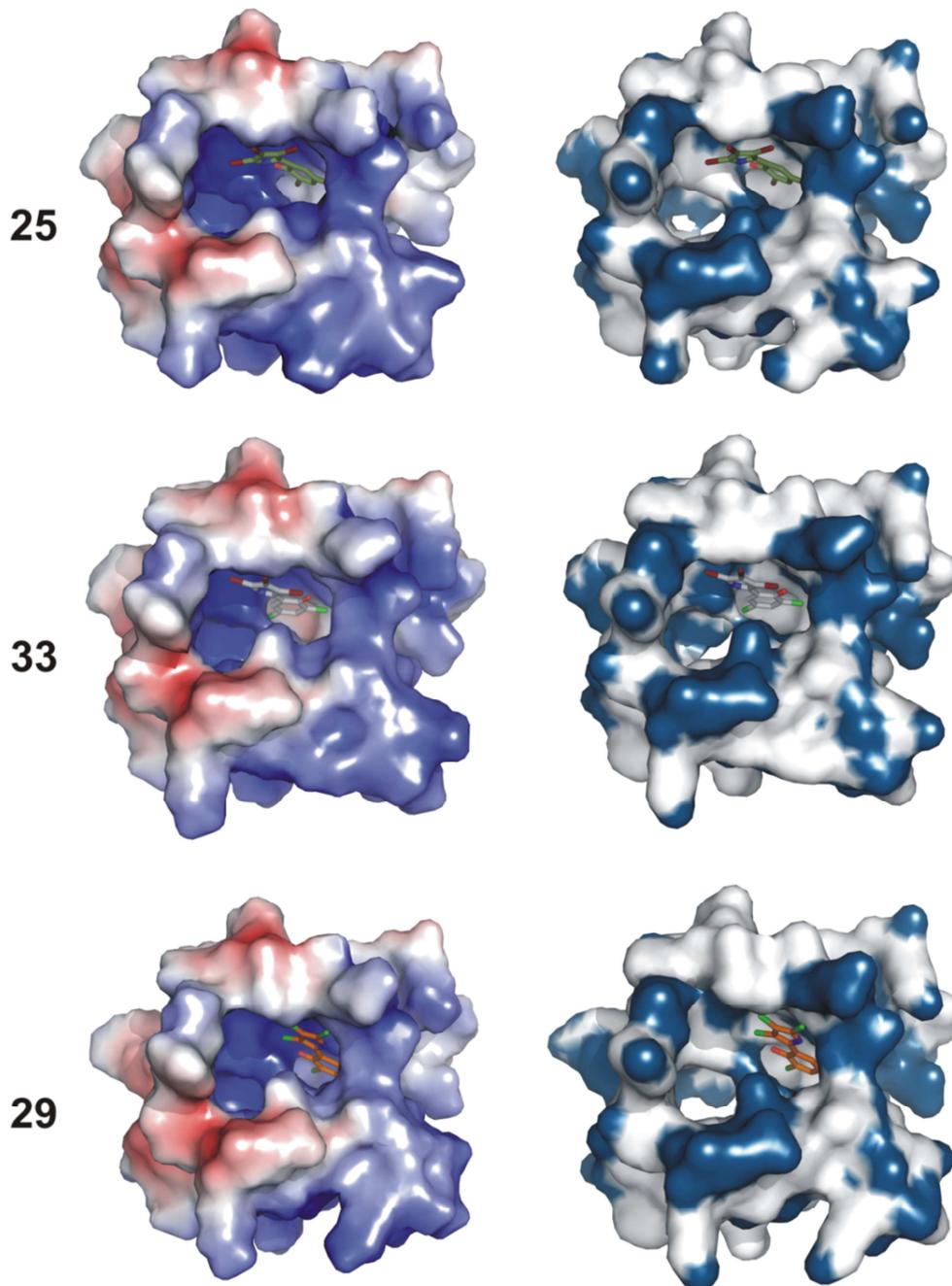


Abbildung 3.13: Darstellung der Eigenschaften der Myosinbindungstasche. Die linke Spalte zeigt das elektrostatische Potential aufgetragen auf die molekulare Oberfläche der *Dd* Myosin-2 Bindungstasche, wie sie in den Röntgenkristallstrukturen beobachtet werden kann. Polare Regionen im hinteren Teil und der vorderen rechten Partie der Tasche sind an Wasserstoffbrückenbindungen mit den Pseudilinen beteiligt. Die rechte Spalte zeigt die hydrophoben Bereiche der gleichen Taschen. Farbcode: Weiß = hydrophob, Blau = hydrophil. Deutlich zu erkennen sind die großen hydrophoben Ballungsflächen in der Bindungstasche und die unterschiedliche Einbettung der Halogensubstituenten der verschiedenen Pseudiline.

Ein Vergleich der kristallographischen B-Faktoren der gebundenen und ungebundenen Formen deuten auf eine Abnahme der globalen Mobilität der Myosin-Motordomäne in der Gegenwart der Inhibitoren. Die Quantität der Erniedrigung der Proteinflexibilität korreliert mit der hemmenden Wirksamkeit der kleinen Substanzen (Abbildung 3.14). Grundsätzlich zeigt der kristallographische B-Faktor die Höhe der atomaren Abweichung um eine mittlere Position und erlaubt somit eine Abschätzung der relativen Mobilität verschiedener Teile des Proteins. Die Differenzbildung der normalisierten B-Faktoren der Inhibitor-freien Struktur und der entsprechenden Strukturen mit gebundenem Inhibitor weisen auf eine globale Erniedrigung der Flexibilität oder eines „Abkühlens“ des größten Teils der Motordomäne etwa bis zur Relayschleifenregion hin.

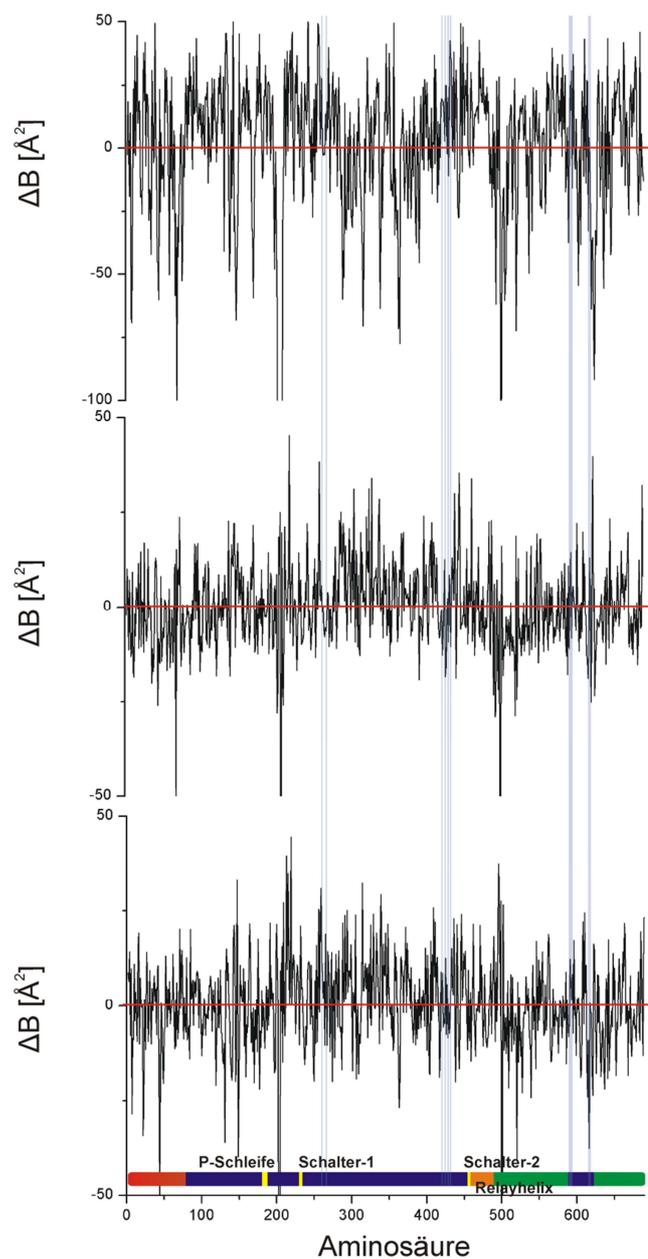


Abbildung 3.14: Diagramm der normalisierten kristallographischen B-Faktoren, als $\Delta B = B_{\text{ungebunden}} - B_{\text{gebunden}}$. Für die gebundenen Strukturen wurden benutzt, von oben nach unten: 2JHR (Pseudilin **25**), 2XO8 (Pseudilin **33**) und 2XEL (Pseudilin **29**). 2JJ9 diene als ungebundene Struktur.

Derivat **29**, welches eine Selektivität gegen Klasse 1 Myosin aufweist, mit einem IC_{50} von $1,0 \mu\text{M}$ gegen *Dd* Myosin-1b, wurden für das hybride Pseudilin **33** mit gemischter Substitution relativ ähnliche IC_{50} -Werte um die $40 \mu\text{M}$ gegen Myosinisoformen der Klassen 1, 2 und 5 beobachtet (Abbildung 3.16).

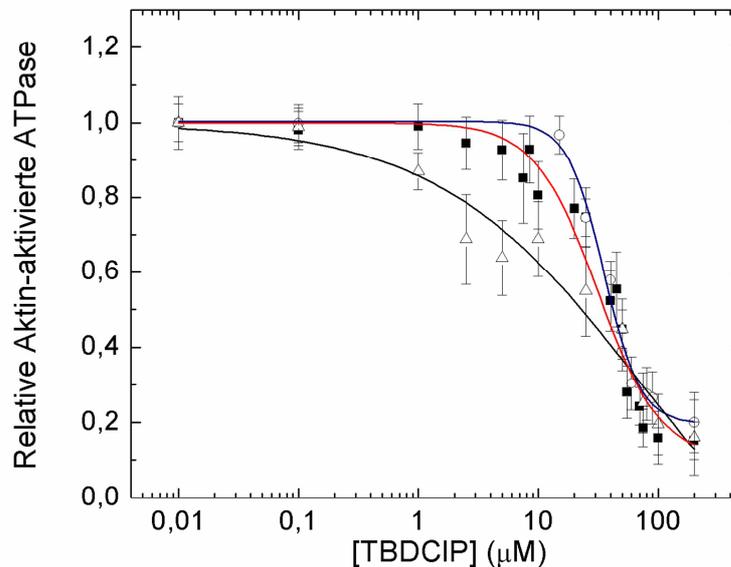


Abbildung 3.16: Inhibition der Aktin-aktivierten ATPase verschiedener Myosinisoformen durch TBDCIP (**33**) bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Die drei gezeigten Isoformen sind: *Dd* Myosin-2 (Rot, ■), *Dd* Myosin-1e (Blau, ○) und *Dd* Myosin-5b (Schwarz, △). Pseudilin **33** zeigt keine deutliche Präferenz gegenüber einer dieser Isoformen.

3.2.1.3 Moleküldynamik

Um das dynamische Verhalten der Pseudilininhibitoren in vollständig solvatisiertem Protein zu untersuchen (Myosin-Motordomäne, Aminosäuren 2-755) wurden MD-Simulationen mit dem Gromacs Softwarepaket unter Verwendung des OPLS *all-atom* Kraftfeldes durchgeführt. Der grundsätzliche Ablauf und die verwendeten Parameter waren dieselben wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Als Startkoordinaten dienten die Röntgenkristallstrukturen der *Dd* Myosin-2 Motordomänen im Komplex mit den drei halogenierten Pseudilinen. Für die bromierten Pseudiline wurde der Inhibitor in der Struktur mit gebundenem PBP (**25**) durch das jeweilige Pseudilin ersetzt (PDB Code: 2JHR). Im Falle der chlorierten Derivate wurde die PCIP (**29**) Struktur (PDB Code: 2XEL) und für das gemischt substituierte Pseudilin die TBDCIP (**33**) Struktur (PDB Code: 2XO8) verwendet und das jeweilige Substitutionsmuster *in silico* erzeugt. Die Strukturen wurden, wie in Kapitel 3.1.3 für die G680-Mutanten beschrieben, energieminiert und equilibriert. Die Gesamtlänge der einzelnen MD-Simulationen, die zur Auswertung verwendet wurden, betrug 35 ns.

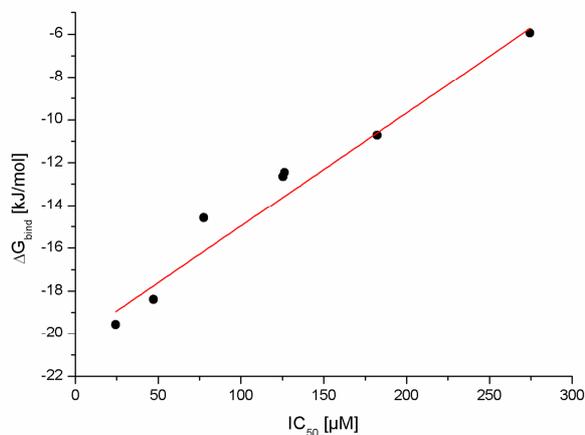
Tabelle 3.4: Vergleich der experimentellen Aktivitäten und der berechneten freien Bindungsenergien.

Verbindungen	IC ₅₀ [μM]	ΔG _{Bind} [kJ·mol ⁻¹]
25	24.4	-19.57
33	47.2	-18.39
26	77.6	-14.59
27	125.4	-12.64
29	126.3	-12.45
32	182.2	-10.72
30	274.5	-5.95

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der untersuchten Reihe halogener Pseudoline gegenüber Myosin-2 aus den MD-Simulationen und um die Ergebnisse der Computerberechnungen mit den experimentell bestimmten IC₅₀-Werten zu vergleichen, wurden die freien Bindungsenergien ΔG_{Bind} mittels der *linear interaction energy* (LIE) Methode ermittelt. Bei der LIE-Formulierung wird die freie Bindungsenergie durch Evaluierung der nicht-gebundenen Energieterme, van-der-Waals und Elektrostatikterme, der Liganden im Komplex mit dem Zielprotein (gebunden) und in Lösung (frei) entlang der Simulationstrajektorie nach Gleichung (3.1) berechnet.

$$\Delta G_{Bind} = \alpha(\langle V_{l-s}^{vdW} \rangle_{gebunden} - \langle V_{l-s}^{vdW} \rangle_{frei}) + \beta(\langle V_{l-s}^{el} \rangle_{gebunden} - \langle V_{l-s}^{el} \rangle_{frei}) \quad (3.1)$$

Als Skalierungsfaktoren wurden $\alpha = 0,18$ und $\beta = 0,50$ für die Berechnung der freien Bindungsenergien der Pseudoline benutzt. Die *in silico* Affinitäten zeigen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen inhibitorischen Aktivitäten und validieren die Güte der MD-Simulationen (Abbildung 3.17 und Tabelle 3.4).

**Abbildung 3.17:** Korrelationskurve zwischen den experimentell ermittelten inhibitorischen Aktivitäten und den freien Bindungsenergien, berechnet aus den MD-Simulationen.

Analysen der MD-Trajektorien ergaben eine Präferenz der nicht-methylierten Pseudiline in der Bindungstasche zur Ausbildung von zwei klassischen Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein. Sowohl die freie Hydroxylgruppe am Phenolring, als auch die NH-Gruppe des Pyrrolrings waren an Wasserstoffbrückenbindungen während der Simulationen beteiligt (Abbildung 3.18).

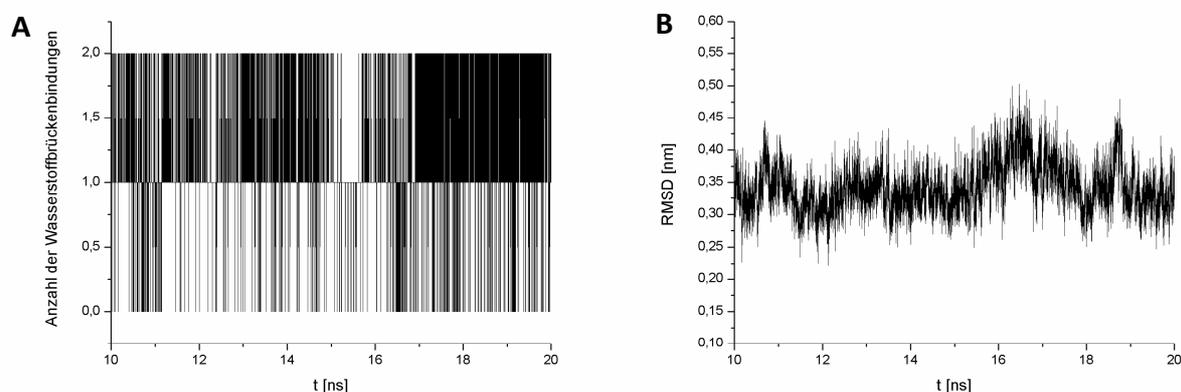


Abbildung 3.18: Untersuchung des Verhaltens der Pseudiline in der Bindungstasche während der MD-Simulationen. Aus Gründen der Anschaulichkeit sind nur 10 ns Ausschnitte der MD-Simulationen gezeigt. **(A)** Diagramm der Anzahl der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Pseudilin **33** und dem Protein entlang der MD-Trajektorie. Verwendete Grenzwerte zur Erkennung von Wasserstoffbrücken waren maximale Abstände von 3,5 Å und Winkel von 30°. **(B)** RMSD-Graph von Pseudilin **33** in der allosterischen Tasche während der MD Simulationen. Die Atomkoordinaten wurden für eine Überlagerung mittels der kleinsten Quadrate verwendet. Deutliche Fluktuationen des Pseudilins in der Tasche sind erkennbar.

Die Verbindungen scheinen jedoch einen hohen Grad an Flexibilität in der Bindungstasche beizubehalten, die zu günstigen entropischen Beiträgen zur freien Bindungsenergie führen könnten. Leider ist die durch die Bindung hervorgerufene Gesamtänderung der Entropie computerchemisch schwer zugänglich und verlässliche Abschätzungen sind daher nicht verfügbar. Außerdem setzt sich die Gesamtänderung der Entropie aus unterschiedlichsten Beiträgen zusammen, einschließlich der Verdrängung von Wassermolekülen aus der Proteintasche, Desolvatisierung des Liganden, Veränderungen in den Translations-, Rotations- und internen Freiheitsgraden des Liganden oder umliegender Aminosäurereste des Proteins. Aus diesem Grund spiegelt die totale Entropieänderung nicht linear die konformationelle Mobilität des Liganden wider. Um trotzdem einen Einblick in die Beiträge der Liganden zur Entropieänderung zu erhalten, wurden Konfigurationsentropien der Liganden in der Bindungstasche und in Lösung über die quasiharmonische Näherung (QH; *engl., quasi harmonic approximation*) aus den MD-Simulationen berechnet. Die QH-Näherung ist bewiesenermaßen einsetzbar zur Berechnung von Konfigurationsentropien aus MD-Trajektorien und berechnet die Konfigurationsentropien aus der massengewichteten Kovarianzmatrix durch Anlegen eines eindimensionalen quantenmechanischen harmonischen Oszillators.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Quasiharmonische Frequenzen ω_i wurden aus den Eigenwerten λ_i der diagonalisierten massengewichteten Kovarianzmatrix σ' berechnet, als:

$$\omega_i = \sqrt{\frac{kT}{\lambda_i}} \quad (3.2)$$

Die absoluten Konfigurationsentropien berechneten sich mittels der Gleichung:

$$S_{ho} = k \sum_i^{3n-6} \frac{\hbar\omega_i/kT}{e^{\hbar\omega_i/kT} - 1} - \ln(1 - e^{-\hbar\omega_i/kT}) \quad (3.3)$$

Die Änderung der internen Konfigurationsentropie der Liganden wurde mittels Gleichung (3.4) aus den absoluten Konfigurationsentropien der Liganden gebunden in der Proteintasche und frei in Lösung erhalten.

$$\Delta S_{konf} = S_{Komplex}(Ligand) - S_{frei}(Ligand) \quad (3.4)$$

Um die gesamten Translations- und Rotationsbewegungen während der Entropieberechnungen zu entfernen, wurden die Liganden entlang der Trajektorie überlagert, unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate mit den Atomkoordinaten der Liganden als Referenzen. Bei allen getesteten Verbindungen war die berechnete Änderung der Konfigurationsentropie relativ gering (20-27 J·mol⁻¹·K⁻¹), d.h. die Pseudiline verlieren nur in geringem Umfang an internen Freiheitsgraden. Des Weiteren wurde die absolute Entropie der Liganden in der Bindungstasche durch Verwenden der Proteinkoordinaten als Referenzen für die Überlagerung mittels der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Diese Vorgehensweise berücksichtigt auch relative Bewegungen der Liganden in der Bindungstasche, also auch Translations- und Rotationsbewegungen. In allen Fällen war die berechnete Entropie weitaus höher, als die Entropie, die die Ligandenkoordinaten während der Überlagerungsprozedur verwendeten. Diese erhöhten absoluten Entropiebeträge deuten auf eine beachtliche Mobilität der Liganden in der Bindungstasche (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Konfigurationsentropien berechnet aus den MD-Simulationen mittels der quasiharmonischen Näherung.

Verbindung	$S_{Komplex}(Ligand)$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$S_{frei}(Ligand)$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	ΔS_{konf} [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$S_{Komplex}^{transl}(Protein)$ [J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]
25	209.765	230.545	-20.780	430.281
33	206.273	228.928	-22.655	426.768
29	201.657	229.049	-27.392	428.094

Zusätzliche Hinweise für die Mobilität der Liganden in der allosterischen Bindungstasche liefern die erheblichen Fluktuationen in den RMSD-Diagrammen der Ligandenkoordinaten in der Proteintasche (Abbildung 3.18B).

Berechnungen der mittleren quadratischen Fluktuationen (RMSF) aus den MD-Trajektorien unterstützen die Ergebnisse der Analyse der kristallographischen B-Faktoren. Die Höhe der Reduktion von Proteinfluktuationen der Myosin-Liganden-Komplexe korreliert mit der inhibitorischen Wirksamkeit der gebundenen Pseudiline (Abbildung 3.19). Um die Ergebnisse der MD-Simulationen zu validieren wurden B-Faktoren aus den RMSF-Werten nach Gleichung 3.5 berechnet und mit den kristallographischen B-Faktoren verglichen.

$$\langle u_k^2 \rangle = \frac{3}{8\pi^2} B_k \quad (3.5)$$

Die B-Faktoren aus den MD-Simulationen folgen dabei dem gleichen Trend, wie die experimentellen Werte, aber unterscheiden sich im Ausmaß der Fluktuationen.

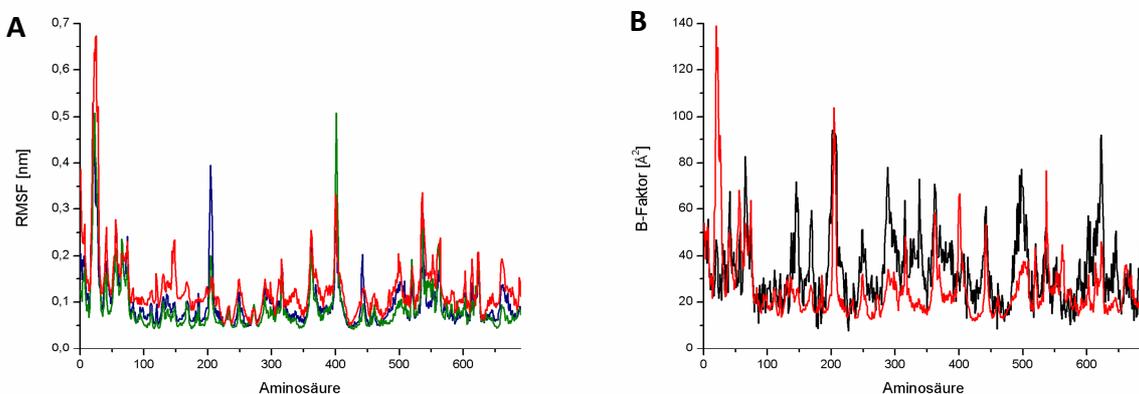


Abbildung 3.19: (A) Vergleich der mittleren quadratischen Fluktuationen (RMSF) des Proteins, berechnet aus den MD-Trajektorien. Farbcode: Grün = **25**, Blau = **33**, Rot = **29**. Die Abnahme der Flexibilität korreliert mit der inhibitorischen Aktivität. (B) Vergleich der experimentellen B-Faktoren (Schwarz) und der B-Faktoren berechnet aus den RMSF-Werten der MD-Trajektorien (Rot) pro C_α-Atom in der Komplexstruktur mit Pseudilin **25**.

3.2.2 Strukturelle Untersuchung des Ca²⁺-Sensitizers EMD 57033

Die Dysfunktion des kardialen Aktomyosinsystems kann zu Herzinsuffizienz und Herzversagen führen. Neue Kurzzeittherapien zur Behandlung dieses Fehlverhaltens, bei dem der Herzmuskel nicht mehr genug Kraft entwickeln kann, um das Blut durch den Körper zu pumpen, verwenden unter anderem inotrope Ca²⁺-Sensitizer, die die Fähigkeit besitzen, die kardiale Kontraktilität zu erhöhen. Ca²⁺-Sensitizer beeinflussen dabei direkt die kardialen Myofilamente und/oder den Aktomyosin-Zyklus und werden grundsätzlich in drei Klassen unterteilt¹⁷¹. Klasse 1 Ca²⁺-Sensitizer üben eine Wirkung auf die Affinität von Troponin C, einem Skelett- und Herzmuskel-assoziierten Protein, das die Aktomyosin-Interaktion reguliert, für Ca²⁺-Ionen aus, die wiederum die Funktion des Troponins regulieren. Im Gegensatz dazu besitzen Ca²⁺-Sensitizer der Klasse 2 keine Fähigkeit die Ca²⁺-Affinität von Troponin C zu ändern, sondern wechselwirken direkt mit den Aktinfilamenten und beeinflussen so die Aktomyosin-Interaktion. Mitglieder der Klasse 3 hingegen beeinträchtigen direkt den chemomechanischen Aktomyosin-Zyklus und wechselwirken somit höchstwahrscheinlich unmittelbar mit einem Bestandteil des Aktomyosinkomplexes.

Zu den Klasse 3 Ca^{2+} -Sensitizern wird unter anderem das Thiadiazinon-Derivat EMD 57033 (**36**), oder (+)-5-(1-[3,4-Dimethoxybenzoyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6-chinoly)-6-methyl-3,6-dihydro-2H-1,3,4-thiadiazin-2-on, gezählt. EMD 57033 ist bisher nicht für die Therapie zugelassen, wurde aber in vielfältigen Forschungsstudien auf seinen positiv inotropen Effekt in isolierten Herzmuskeln aus Meerschweinchen^{172,173}, Frettchen^{174,175}, Ratten¹⁷⁶ und Hunden¹⁷⁷ getestet. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus, wie EMD 57033 seine Wirkung entfaltet, wurde kontrovers in der wissenschaftlichen Literatur diskutiert und beinhalten Wirkmechanismen, die ohne Veränderung der Calciumkonzentration im Sarkoplasma funktionieren.¹⁷⁸⁻¹⁸¹ Sowohl in kardialen Muskelgewebe^{172,182,183}, als auch in isolierten, gehäuteten Muskelfasern des Lendenmuskels aus Kanninchen¹⁸⁴ konnte gezeigt werden, dass EMD 57033 die vom Muskel erzeugte isometrische Kraft um mehr als 50 % erhöht, die ATPase-Aktivität der Muskelfaser, sowie die aktive Steifheit jedoch unproportional dazu nur um etwa 10 % anhebt. Demzufolge besitzt EMD 57033 zwar eine leicht aktivierende Wirkung auf die enzymatische ATPase-Funktion des Aktomyosinsystems, diese Aktivität ist jedoch nicht ausreichend um die inotrope Wirkung von **36** zu erklären. Auf Basis weiterer Studien an isolierten Muskelfasern wurde postuliert, dass EMD 57033 die Spannung in den Myosin-Motorproteinen des Muskels erhöht, insbesondere in den Zuständen entlang des chemomechanischen Zyklus', die eine entscheidende Rolle bei der Krafterzeugung spielen, wodurch die aktive Kraft deutlich erhöht wird. Um dies zu erreichen ist es wahrscheinlich, dass EMD 57033 direkt an Myosin binden muss.

Um den Bindungsmodus von EMD 57033 an Myosin zu bestimmen und daraus Erkenntnisse zur Wirkungsweise des Ca^{2+} -Sensitizers abzuleiten, wurde der Komplex der *Dd* Myosin-2 Motordomäne mit EMD 57033 (**36**) in Anwesenheit des Nukleotidanalogs $\text{ADP}\cdot\text{VO}_3$ kokristallisiert. Die erhaltenen Einkristalle ergaben Beugungsdaten bis zu einer Auflösung von 2,7 Å. Elektronendichte konnte für den Liganden aufgefunden werden, die jedoch nicht den gesamten Liganden abdeckt. Diese Extradichte ist eindeutig nicht vom Protein erzeugt und von der Proteindichte getrennt, und keine anderen Bestandteile des Kristallisationsansatzes, wie z.B. Frostschutzmittel, Pufferbestandteile o.ä., konnten der Elektronendichte zugeordnet werden. Demzufolge spiegelt diese Elektronendichte aller Wahrscheinlichkeit nach die Bindungsposition von EMD 57033 in der Myosin-Motordomäne wider. Der exakte Bindungsmodus, bzw. die genaue Bindungskonformation kann mit dieser partiellen Elektronendichte allerdings nicht eindeutig bestimmt werden. Die Besetzungszahl (*occupancy*) des Liganden liegt deutlich unter dem Idealwert von 1, d.h. EMD 57033 hat nicht in jedem sich im Kristall periodisch wiederholenden Motiv an das Myosin gebunden. Trotzdem ist die Elektronendichte ausreichend gut definiert, dass die wahrscheinliche Bindungsstelle von EMD 57033 in der Myosin-Motordomäne identifiziert werden konnte (Abbildung 3.20). EMD 57033 bindet dabei in einer hydrophoben Bindungsstelle in der N-terminalen Domäne der Myosin-Motordomäne und interagiert höchstwahrscheinlich mit dem N-terminalen β -Fass-Strukturelement. Hydrophobe Aminosäurereste, die möglicherweise zur Bindung von **36** beitragen, beinhalten die Aminosäureseitenketten von Leu27, Tyr34, Ile83 und den Pyrrolidinring von Pro82. Des Weiteren wurden in der

angenommenen Bindungskonformation der vorliegenden Kristallstruktur mit partieller Elektronendichte für EMD 57033, Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und den Proteinresten Lys32, Tyr34, Arg80 und Tyr96 beobachtet, sowie zwei wasservermittelte Interaktion zum Protein. Die Details der Wechselwirkungen zwischen Effektormolekül und Protein sind hinsichtlich des nicht eindeutig bestimmbar Bindungsmodus eher spekulativer Natur und stellen potentielle Wechselwirkung von EMD 57033 zum Myosin dar, die durch weitere kristallographische Studien verifiziert werden müssen. Die Tatsache, dass Myosine ohne N-terminales β -Faß-Strukturelement EMD 57033 nicht binden, spricht aber für eine prinzipiell korrekte Zuordnung der Bindungstasche.

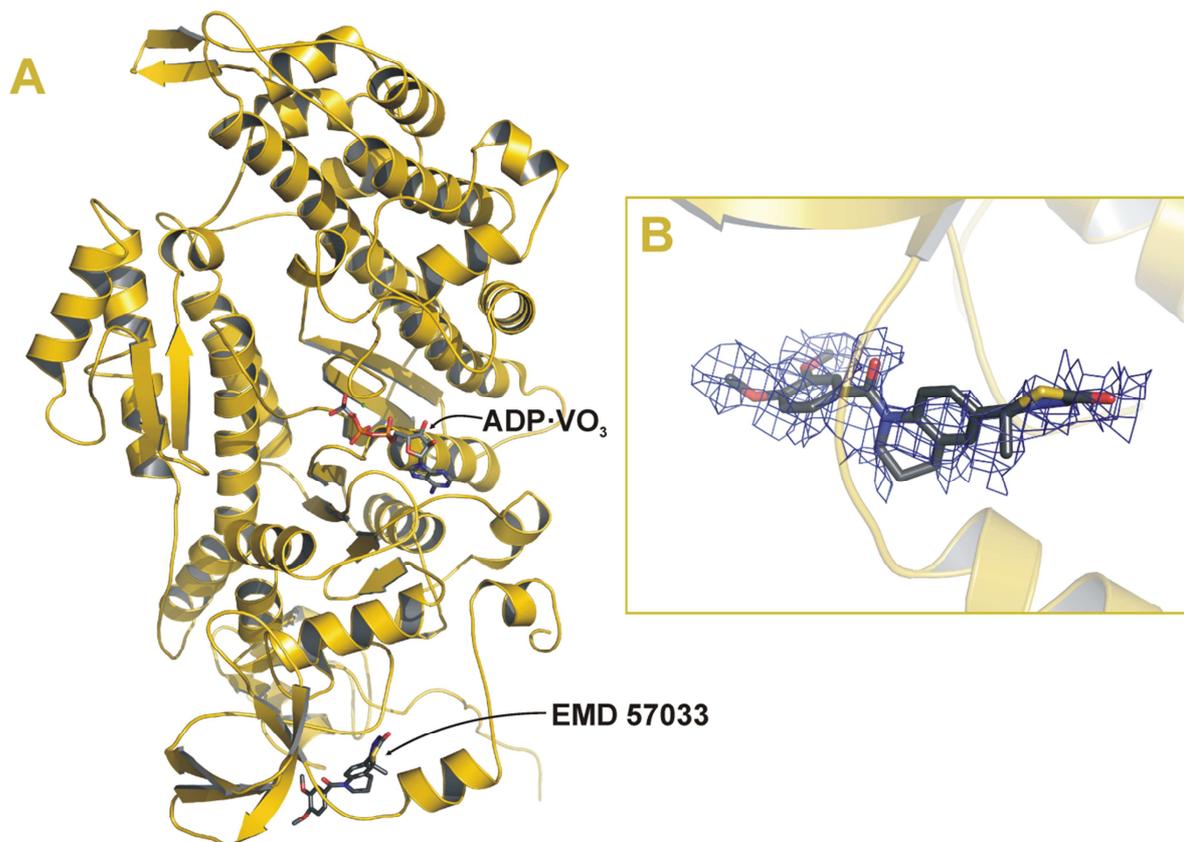


Abbildung 3.20: Röntgenkristallstruktur der *Dd* Myosin-2 Motordomäne im Komplex mit EMD 57033 (36) und ADP-VO₃. (A) Übersicht der verfeinerten Kristallstruktur als Bänderdarstellung. EMD 57033 bindet in unmittelbarer Nähe des N-terminalen β -Faß-Strukturelements. (B) Ausschnitt der gefundenen Elektronendichte der 2F_o-F_c Elektronendichtekarte für EMD 57033. Deutlich zu erkennen ist die partielle Elektronendichte, die nicht vollständig den Liganden abdeckt und somit die Bindungskonformation nicht eindeutig wiedergibt.

Aufgrund der Tatsache, dass EMD 57033 als inotrope Verbindung vorrangig zur Erhöhung der kardialen Muskelkontraktion verwendet wird, wurde ein Homologiemodell des humanen β -kardialen Myosins angefertigt. Das Modell wurde mit dem Programm Modeller¹³⁵ erzeugt, unter Verwendung der Struktur von *Gg* Myosin-2 S1 (PDB Code: 2MYS), und umfasste die Aminosäuren 1-800. Anschließend wurde das Modell validiert und geometrieoptimiert mittels des AMBER Kraftfeldes¹³⁶. Die potentielle Bindungsposition und -konformation von EMD 57033 an das *Hs* β -kardiale Myosin wurde durch Molekulares Docking identifiziert.

Dabei wurde das gesamte Modell nach möglichen Bindungsstellen für EMD 57033 *in silico* abgesucht, sogenanntes *blind docking*. Gemäß des Molekularen Dockings befindet sich die bevorzugte Bindungsstelle von EMD 57033 an das *Hs* β -kardiale Myosin tatsächlich in der N-terminalen Domäne der Myosin-Motordomäne. Im Gegensatz zur Bindungsposition, die aus der Kristallstruktur mit *Dd* Myosin-2 angenommen wird, ist die Position von EMD 57033 um etwa 10 Å in Richtung der U50 kDa Domäne verschoben. Diese Verschiebung des EMD 57033 geht einher mit der Hebelarmbewegung und somit auch mit einer leichten Verschiebung der N-terminalen Domäne. Da das Modell das *Hs* β -kardiale Myosin in einem anderen Zustand zeigt (*post-rigor* Zustand mit Hebelarm in *down* Position), als dem in der Kristallstruktur eingenommenen Zustand (*post-recovery stroke* Zustand mit Hebelarm in *up* Position), ist die veränderte Bindungsposition nicht ausschließlich auf Myosinisoform-spezifische Unterschiede zurückzuführen, sondern könnten auch durch den Nukleotidzustand des Myosins beeinflusst sein. Insgesamt unterstützen die *in silico* Ergebnisse die Annahme aus den kristallographischen Studien, dass EMD 57033 höchstwahrscheinlich an die N-terminale Domäne der Myosin-Motordomäne bindet. Eine schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen EMD 57033 und der *Hs* β -kardialen Myosinbindungsstelle, die durch Molekulares Docking beobachtet wurden, ist in Abbildung 3.21B gezeigt.

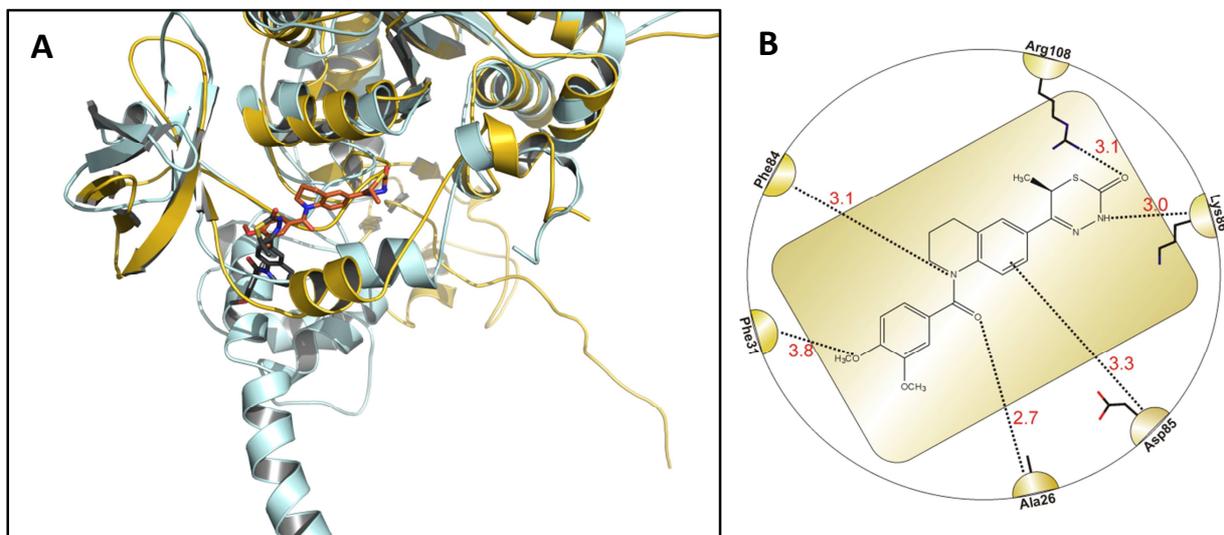


Abbildung 3.21: (A) Vergleich der Bindungsposition von EMD 57033 in der Kristallstruktur mit *Dd* Myosin-2 (Gelb, Ligand in Grau) und des Homologiemodells von *Hs* β -kardialem Myosin (Türkis, Ligand in Orange). Eindeutig erkennbar ist die Verschiebung von EMD 57033. Im Hintergrund ist die unterschiedliche Stellung des Konverters/Hebelarms zu erkennen. (B) Schematische Darstellung der durch Molekulares Docking gefundenen Wechselwirkungen zwischen EMD 57033 und *Hs* β -kardialem Myosin.

3.2.3 Strukturelle Studien des Fluoreszenzfarbstoffes Prodan

Der Fluoreszenzfarbstoff Prodan (**35**), oder 6-Propionyl-2-(*N,N*-dimethyl)aminonaphthalen, ist ein vielseitiges und häufig eingesetztes Reporter-molekül für verschiedenste biologische Untersuchungen. Die Besonderheit von Prodan ergibt sich dabei aus den speziellen Fluoreszenzcharakteristika. Während die meisten Fluoreszenzfarbstoffe auf Veränderungen der Bindungsumgebung mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität reagieren, tritt bei der Verwendung von Prodan zudem eine Verschiebung des Emissionsmaximums auf. Der Prodan-Fluorophor wurde in der Literatur durch die Verwendung der verwandten Substanzen 6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalen (AD) und 6-Bromacetyl-2-dimethylaminonaphthalen (BD), kovalent an Cysteinreste des Zielproteins gebunden, für die Untersuchungen der Aktinpolymerisation¹⁸⁵, sowie für die spektroskopische Beobachtung der ATP-induzierten Veränderungen in der reaktiven Thiolregion von Myosin S1¹⁸⁶ eingesetzt. Im Gegensatz zu diesen kovalenten Varianten wurde berichtet, dass Prodan (**35**) nicht-kovalent sowohl mit Aktin¹⁸⁷, als auch mit der Motordomäne von Myosin¹⁸⁸ interagiert und als nicht-kovalenter Fluoreszenzmarker unter Bewahrung der spektroskopischen Eigenschaften benutzt wurde. Im Falle der Studien an Myosin wurde Prodan verwendet, um die ATP-Hydrolyse-reaktion photometrisch zu verfolgen. Das frei in Lösung vorliegende Prodan besitzt ein Emissionsmaximum im grünen Bereich bei einer Wellenlänge von 520 nm, wohingegen sich das Emissionsmaximum zu Wellenlängen von 460 nm, bzw. 450 nm verschiebt, wenn Prodan an das Myosin S1 bzw. den Myosin-ADP-Komplex gebunden ist. Es findet also eine Verschiebung in den blauen Spektralbereich statt. Da die ATP-Hydrolyse in Anwesenheit von Aktin untersucht werden konnte, scheint die Bindung von Prodan weder mit der ATP-Bindung, noch mit der Akto-Myosin-Interaktion zu interferieren, und es wurde auch keine Beeinflussung der ATPase oder Aktinbindung beobachtet. Des Weiteren vermuteten die Autoren eine einzige Bindungsstelle in der Myosin-Motordomäne, die sehr sensitiv gegenüber Konformationsänderungen in der Nukleotidbindungstasche ist¹⁸⁸, konnten diese aber nicht näher spezifizieren.

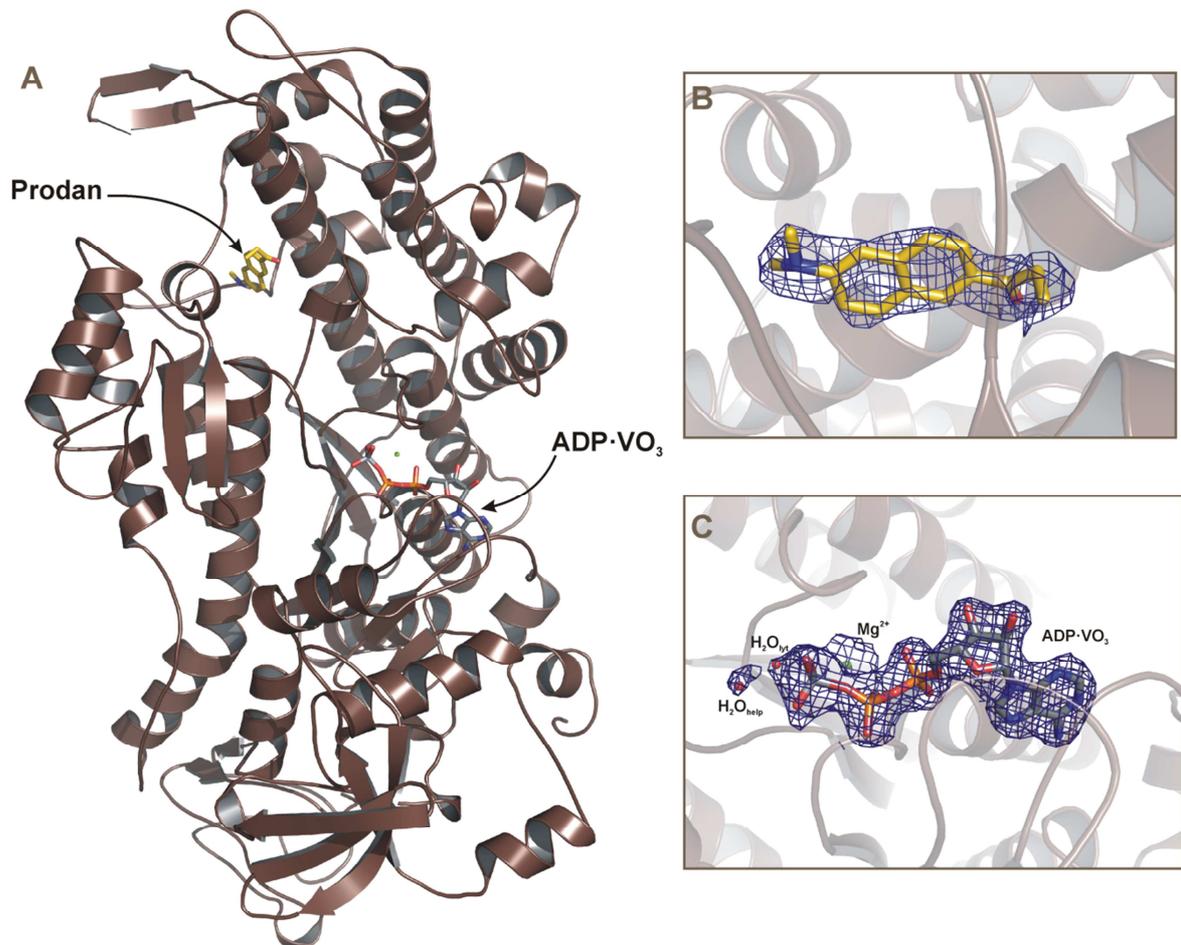


Abbildung 3.22: Kristallstruktur des Myosin-ADP-VO₃-Prodan-Komplexes. **(A)** Bändermodell des *Dd* Myosin-2 mit gebundenem Nukleotid (Silbergrau) und Prodan (Goldgelb) als Stabmodelle. **(B)** Ausschnitt der 2F_o-F_c Elektronendichtekarte für das gebundene Prodan. **(C)** Ausschnitt der 2F_o-F_c Elektronendichtekarte für das Nukleotidanalogen Mg²⁺-ADP-VO₃ und die beiden wichtigen Wassermoleküle im aktiven Zentrum. Die Elektronendichtekarten wurden ohne Ligand und Nukleotid berechnet.

Um die Bindungsstelle von Prodan in der Myosin-Motordomäne zu identifizieren, wurde der ternäre Komplex aus *Dd* Myosin-2 mit dem Nukleotidanalogen ADP-VO₃ und dem Fluoreszenzfarbstoff Prodan (**35**) kokristallisiert und die Struktur bis zu einer Auflösung von 2,4 Å verfeinert (Abbildung 3.22). Die Elektronendichte für Prodan war eindeutig und zeigte nur eine einzige Bindungsstelle in der Kristallstruktur. Prodan bindet in der gleichen Proteintasche wie die halogenierten Pseudiline (vergleiche Kapitel 3.2.1), jedoch in einer abweichenden Position. Die tertiäre Aminogruppe von Prodan bildet dabei Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg428, sowie der Hauptkettencarbonylgruppe von Ala618 aus. Die Carbonylgruppe des Propionylrestes von Prodan bindet zusätzlich über eine Wasserstoffbrückenbindung an die Hauptkettenatome von Ala424, während Wechselwirkungen der Seitenketten von Ala424 mit dem Naphthalenring ausgebildet werden (Abbildung 3.23). Die Ethylkette von Prodan bindet in einer hydrophoben Mulde der Bindungstasche, die durch die Seitenketten der Aminosäuren Ala420, Pro591 und die Methylengruppen von Lys423 gebildet wird.

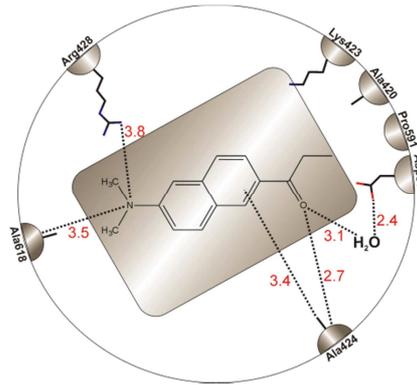


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der Interaktionen von Prodan (**35**) mit den Aminosäuren von *Dd* Myosin-2, wie sie in der Kristallstruktur vorgefunden wurden. Die Aminosäuren Ala420, Lys423 und Pro591 bilden eine hydrophobe Mulde, in die der Propionylrest eingebettet ist.

Der Vergleich der kristallographischen B-Faktoren der Myosin·Prodan-Komplexstruktur mit der Röntgenstruktur der Myosin-Motordomäne ohne gebundenen Liganden (PDB Code: 2JJ9) zeigt keine Erniedrigung der intrinsischen Proteinflexibilität aufgrund der Bindung von Prodan an die allosterische Tasche (Abbildung 3.24).

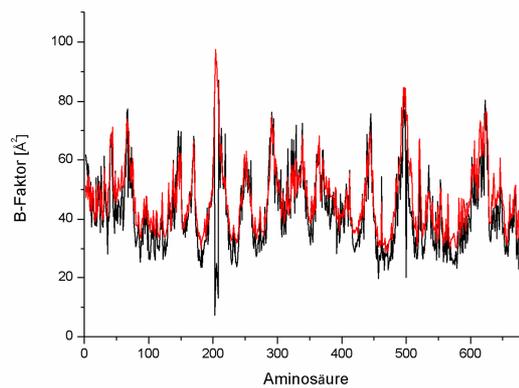


Abbildung 3.24: Vergleich der kristallographischen B-Faktoren der *Dd* Myosin-2-ADP·VO₃-Strukturen mit gebundenem Prodan (Rot) und ohne gebundenen Liganden (Schwarz, PDB Code: 2JJ9).

3.3 *De Novo* Entwicklung von *Pf* Myosin A Inhibitoren

Grundlage für die strukturbasierte Entwicklung neuer Leitstrukturen in der Medizinischen Chemie sind für gewöhnlich Strukturen der Zielproteine, gelöst durch Röntgenkristallographie oder Kernresonanzspektroskopie (NMR). In Fällen, in denen die atomaren Details der Zielstruktur noch nicht bekannt sind, finden entweder ligandenbasierte Methoden Verwendung, oder es werden Modelle des zu hemmenden Proteins erstellt. In dieser Arbeit wurden neuartige Inhibitoren des *Plasmodium falciparum* (*Pf*) Myosin A auf Basis von Homologiemodellen des strukturell bisher nicht aufgeklärten parasitären Motorproteins durch den kombinierten Einsatz von experimentellen und computerchemischen Methoden entwickelt und analysiert. Wie in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben, ist das *Pf* Myosin A maßgeblich an den Invasionsprozessen und somit der Infektion durch den Malariaparasiten beteiligt.

3.3.1 Erstellen struktureller Modelle des Zielproteins

Das Motorprotein Myosin A aus dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* stellt ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung potentieller Leitstrukturen dar, da es sowohl bei der aktiven Invasion von menschlichen Leberzellen, als auch der Penetration von roten Blutkörperchen während des komplexen Lebenszyklus' des Malariaparasiten eine entscheidende Rolle spielt (vergleiche Kapitel 1.2). Zudem erfordert die Verbreitung von Resistenzen der Erreger gegenüber bekannten Wirkstoffen eine neue Generation von Wirkstoffen, die neue Ziele attackieren und sich in ihren Wirkmechanismen deutlich von den bisherigen Wirkungsweisen abheben. Aus diesem Grund sollen in der vorliegenden Arbeit neue Inhibitoren des für die Infizierung und das Überleben des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* essentiellen Myosin A entwickelt werden. Solche Hemmstoffe des Myosin A, als Hauptbestandteil der Bewegungsmechanik der Parasiten, sind demzufolge nicht nur von akademischem Interesse, sondern könnten als Leitstrukturen für die gezielte, anwendungsorientierte Entwicklung neuer Malariatherapeutika dienen.

Pf Myosin A wird zur Myosin-Klasse 14 gezählt, besitzt eine Gesamtlänge von 818 Aminosäuren und konnte bisher nicht strukturell aufgeklärt werden. Aus diesem Grund wurden Strukturmodelle des Motorproteins mittels Homologiemodellierung erstellt, die die Basis für das strukturbasierte *de novo* Design neuer Klasse 14 Myosininhibitoren darstellten. Im ersten Schritt wurde ein Sequenzvergleich der bekannten *Pf* Myosin A Aminosäuresequenz mit anderen Proteinen und speziell anderen Myosinisoformen durchgeführt, deren dreidimensionale Struktur bereits gelöst wurde. Der Sequenzvergleich und die Suche nach verwandten Strukturen wurde mit dem NCBI-Programm Protein-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)¹⁸⁹ unter Verwendung der PDB Datenbank¹²⁶ durchgeführt und zeigte, dass *Pf* Myosin A nur eine maximale Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von knapp ~30 % zu anderen Isoformen besitzt. *Dd* Myosin-2 mit einer Ähnlichkeit von 31 % zu *Pf* Myosin A, wurde als geeignete Vorlage für das Erstellen der Modelle des parasitären Myosins ausgewählt, da eine Vielzahl hochaufgelöster Kristallstrukturen von *Dd* Myosin-2 zur

Verfügung stehen. Letztendlich wurde die *Dd* Myosin-2 Struktur im *post-rigor* Zustand mit dem PDB Code 1FMV für die Homologiemodellierung verwendet. Abbildung 3.25 zeigt den Sequenzvergleich, der während des Prozesses der Modellerzeugung und der Zuweisung der charakteristischen Merkmale für die Modellierung verwendet wurde.

```

Dd Myo2 1  --NPI HDRTSDYHKYLKVKQGDSDLF KLTIVSDKRYI VYNPDFK----- ERDSYECGEI
Pf MyoA 1  WAVTNEEI KTASKI VRRVSNVEAFDKSGSVFKGYGIVTDI SPTIEND-- PNI MFVKCVVQ

Dd Myo2 52 VSETSDSFIFKTV DGGDRQVKKQ----- DANQRNPI KFDGVEDVSELSYLNPEPAVFNHNR
Pf MyoA 59 CGSKKEKLIIVVQI DPPGTGT PYDI DPTFAVNCNSQVDPVPSFGDI GLNHTNI PCVLDLFLK

Dd Myo2 107 VRYNQDLI YTYSGLFLVAVNPFKRIPI YITCEIVDI FKGRRRN- EVAPHI FAI SDVA YRSM
Pf MyoA 119 HRYLKNQI YTTAVPLI VAI NPYKDLGNTTNEVI RRYRDTADHTKLPPIVFTCAREALSNL

Dd Myo2 166 LDDRCNCSLLI TGESGACKTENTK KVI CYLASVAGRG-- VLECCI L CANPI LEAFGNAK
Pf MyoA 179 HGVNKSCTI I VSGESGAKTEATKQI MRYFASKSGNVDRIQTAI WAANPVLEAFGNAK

Dd Myo2 223 ITRNNSSRFGRFIEI CFNNAQFI SGASIQSYLLEKSRVVFCSETERNYHI FYCLLAGAT
Pf MyoA 239 IIRNNSSRFGRFMQLVI SHEGGIRYGSVVAFLLEKSRI I TCDDNERSYHI FYCLLKGAN

Dd Myo2 283 AEEKKALHICAPESFNYLKSGCVDI KGVSDSEEFKI TRCAMDI VGFSCCEEQMSI FKI I A
Pf MyoA 299 STMKSKFGLKCVTEYKLI NPNSS- TEVSGVDDVKDFEEVI ESLKNMELSESIDI EIVFSI VA

Dd Myo2 343 GILHLGNIKFEKGAGECAVLK----- DKTALINAASTVFGVNPVSVLEKALMEPRI LAGRD
Pf MyoA 358 GILTLGNVRLI EKQEACLSDAATMDEDMGVFNKACELMYLDPELI KREI LI KVTVAGCT

Dd Myo2 397 LVAQHILNVEKSSSRDALV KALYGRFLV L VKKI NVLCCF- RKAYFI CVLDI SGFEI FK
Pf MyoA 418 KI EGRVKNDAEVLKSSLCAMYEKFLVI I RHLNSRI EPEGGFKTVMGLDI FGFVFK

Dd Myo2 456 VNSFECLCI NYITNEKLCQFFNHMFVKVECEEYLKEKI NVGLDSCATI DLI DGR-- CPGP
Pf MyoA 478 NNSLECLFINI TNEMLCKNVVDI VFERESKLYKDEGI STAELKYTSNKEVI NVLCEKGGKS

Dd Myo2 513 IIALIDECVFFNATDNTLI TKLHSHFSKKNAKYEEPRFSKTEFGVTIYACVVMYEI QDW
Pf MyoA 538 VLSYLEDCLAPGGTDEKFFVSSCATNLKENNKFTPAKVASNKNFI I CPTI CPI QYCAESF

Dd Myo2 573 ILEKNKDPICQDL ELCFKDSSDNVITKLNDFP- NI ASRANFI T VAAQYKECLASLMTLE
Pf MyoA 598 LLKKNKDVLRGDLVEVI KDSPNPI VQQLFEGQVIEKGI AKGSLI GSCFLNCLTSLMNLIN

Dd Myo2 631 TTNPHFVRCII PNKQLPAKLEDKVVLDCLRCNGVLEGI RI TRKCFPNRI I YADFVKRYI
Pf MyoA 658 STEPHFI RCI KPNENKPLEVCEPKI LI CLHALSI LEALVLRQLCYSYRRTFEEFLYQMK

Dd Myo2 691 LLAPNVPRDAE- DSCATDAVLKHLNI DPECYRFGI-----
Pf MyoA 718 FVDI AAAEISSVENCNKCVNI LKLSGLSESMYKI GKSIVFLKQEGAKI LTKI CREKLVEV

Dd Myo2 726 -----TKI FFRAGQLARI EEARE
Pf MyoA 778 ENCVSVI EAAI LKHKYKCKVKNKI PSLLRVQAHI RKKMVAQ

```

Abbildung 3.25: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Pf* Myosin A und *Dd* Myosin-2 für die Zuordnung der charakteristischen Merkmale und die Erzeugung der Homologiemodelle.

Unter Verwendung des Programms Modeller¹³⁵ wurden 20 dreidimensionale Modelle des Zielproteins erstellt und evaluiert. Evaluierung fand zum einen automatisch statt, durch Vergleich der im Programm intern erzielten Endwerte der Optimierung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, sowie durch manuelle Analyse der Sekundärstruktur der Modelle. Die Konformation von Schleifen an der Proteinoberfläche, oder Bereiche, die nicht von der Vorlagestruktur abgedeckt waren, wurden durch spezielle, auf vereinfachte Kraftfelder, sogenannte *scoring functions*, basierende MD-Simulationen verfeinert und das beste Modell wurde anschließend unter Verwendung des AMBER Kraftfeldes¹³⁶ und der Methode der konjugierten Gradienten energieminiert. Abbildung 3.26 zeigt das fertige Modell des parasitären *Pf* Myosin A.

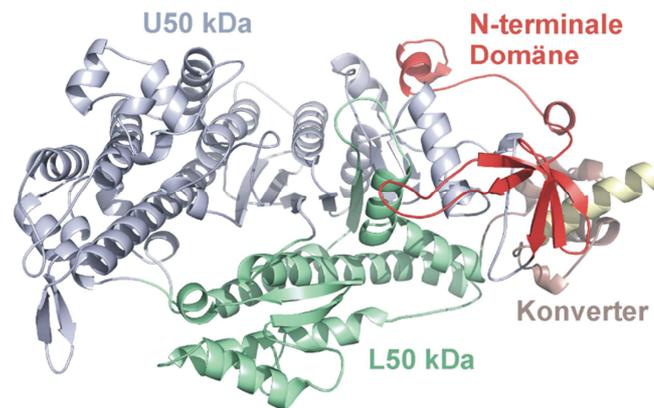


Abbildung 3.26: Bänderdarstellung des fertigen Homologiemodells von *Pf* Myosin A. Die Motordomäne wurde kurz hinter der Konverterdomäne abgeschnitten, da der nachfolgende Teil nicht von der Vorlagestruktur abgedeckt war.

3.3.2 Untersuchung der allosterischen Bindungstasche, *De Novo* Design und Docking

Als Basis für die strukturbasierte *de novo* Entwicklung neuer *Pf* Myosin A Inhibitoren und potentieller antiparasitärer Leitstrukturen wurden die Ergebnisse der in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen und daraus gewonnenen Erkenntnissen von *Dd* Myosin-2 Effektoren verwendet. Als Ziel- und Bindungsbereich der neuen Inhibitoren soll die durch die halogenierten Pseudiline aufgedeckte allosterische Bindungstasche dienen (vergleiche Kapitel 3.2). Diese allosterische Tasche besitzt als Bindungsstelle neuer Inhibitoren deutliche Vorteile im Vergleich zum aktiven Zentrum. Das aktive Zentrum ist hochkonserviert innerhalb der Myosin-Superfamilie und in den meisten anderen ATPasen, während die allosterische Tasche deutliche Unterschiede in Größe, sequentieller Zusammensetzung und den elektrostatischen Eigenschaften zwischen den einzelnen Isoformen aufweist. Diese Abweichungen in Sterik und Eigenschaften der Bindungstasche können während der *de novo* Entwicklung neuer Inhibitoren berücksichtigt werden, um die chemischen Strukturen der Liganden den gegebenen, Isoform-spezifischen Bedingungen anzupassen und somit Spezifität und Selektivität der Inhibitoren auf bestimmte Myosinisoformen zu erhöhen. Des Weiteren wird somit ein kompetitives Bindungsverhalten mit dem Nukleotid um die Bindungsstelle verhindert, was in den meisten Fällen zu verbesserten Wirkcharakteristika der Substanzen führt.

Die Eigenschaften der allosterischen Tasche in dem erzeugten Modell von *Pf* Myosin A wurden zunächst *in silico* in Bezug auf attraktive Wechselwirkungsstellen, Sterik und Elektrostatik untersucht. Die Grundlage solch einer Betrachtungsweise wurde schon im 19. Jahrhundert durch Emil Fischer gelegt und ist allgemein als „Schloss-Schlüssel-Prinzip“ bekannt. Dabei findet eine Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein und der damit verbundene biologische Effekt nur dann statt, wenn die Strukturen des Liganden und des Proteins komplementär zueinander sind. Mit Hilfe des Programmpaketes LigBuilder¹⁹⁰

wurden dafür Schlüsselpositionen, sogenannte *hot spots*, in der Bindungstasche von Pf Myosin A identifiziert, an denen attraktive Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein stattfinden können. Bei dieser Methode wird die Bindungstasche mit einem Gitternetz ausgefüllt und jeder Gitterpunkt mit einer Probe eines Wasserstoffdonors, Wasserstoffakzeptors, sowie einer hydrophoben Gruppe nacheinander besetzt und die jeweilige Bindungsenergie berechnet. Der Abstand der Gitterpunkte betrug $0,5 \text{ \AA}$. Auf diese Weise können Bereiche bestimmt werden, an denen bevorzugt funktionelle Gruppen mit den entsprechenden Eigenschaften binden. Als Testatome zur Abrasterung der Bindungstasche wurden ein positiv geladenes sp^3 -hybridisiertes Stickstoffatom (Ammoniumkation) als Wasserstoffdonor, ein negativ geladenes sp^2 -hybridisiertes Sauerstoffatom als Wasserstoffakzeptor und ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom (Methan), das eine hydrophobe Gruppe darstellt, verwendet. Die ermittelten Daten werden anschließend gefiltert und damit sogenannte Schlüsselinteraktionskarten (*key interaction maps*) erstellt, die Bereiche zeigen, in denen vorrangig funktionelle Gruppen mit den entsprechenden Eigenschaften binden und im Designprozess positioniert werden können (Abbildung 3.27A). Den sterischen Begebenheiten der Proteintasche wird durch Besetzen jedes Gitterpunktes mit einem Wasserstoffatom Rechnung getragen, wodurch die Zugänglichkeit des Gitterpunktes bestimmt wird. Ein Zusammenstoß mit dem Protein wird erhalten, wenn der interatomare Abstand kleiner ist, als die Summe der van-der-Waals-Radien minus $0,5 \text{ \AA}$.¹⁹⁰ Die Werte der einzelnen van-der-Waals-Radien wurden dabei vom Tripos Kraftfeld entnommen. Die Kombination der Interaktionskarten und der Sterik ergab Pharmakophormodelle, die für den *de novo* Designprozess verwendet wurden (Abbildung 3.27B). Zusätzlich wurden Informationen über die elektrostatischen Eigenschaften der Tasche, durch Lösen der nicht-linearen Poisson-Boltzmann-Gleichung und Berechnung des elektrostatischen Potentials mit dem Programm APBS¹⁶⁷ ermittelt, und aufgetragen als Isooberfläche, in den Designprozess miteinbezogen.

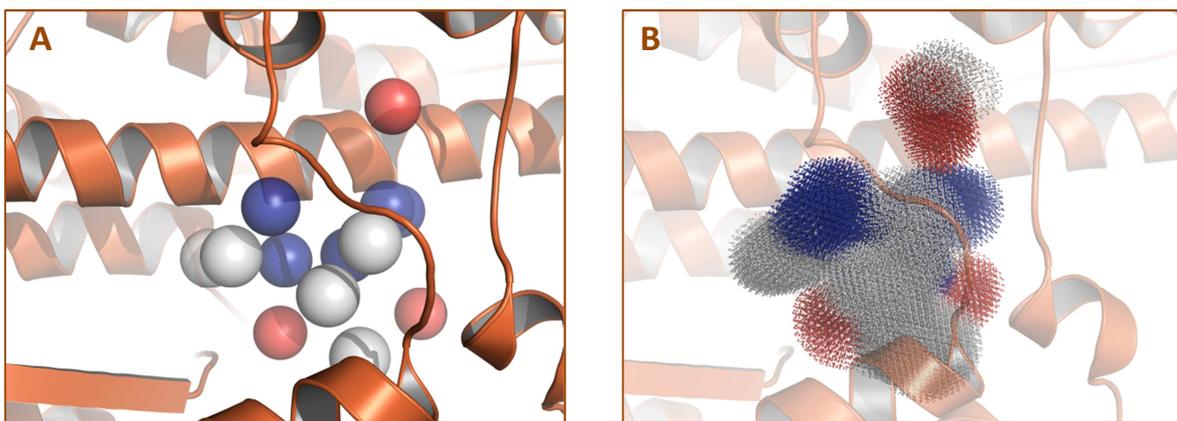


Abbildung 3.27: Darstellung der identifizierten und während des Designprozesses verwendeten Interaktionsmerkmale der Bindungstasche. **(A)** Schlüsselinteraktionskarte, in der die Kugeln Schlüsselstellen darstellen, an denen bevorzugt Interaktionen mit den angegebenen komplementären Wechselwirkungspartnern stattfinden können. **(B)** Pharmakophormodell, das für das Design der neuen Myosininhibitoren verwendet wird. Es besitzt neben den Bereichen für attraktive Wechselwirkungen auch Informationen über die Sterik der Bindungstasche.

Das rationale *in silico* Design neuer Substanzen unter Berücksichtigung der analysierten Eigenschaften der Bindungstasche führte zu einer ersten Bibliothek von 1000 virtuellen Substanzen. Die Verbindungen wurden gezielt so aufgebaut, dass die Komplementarität zur Bindungstasche maximiert wurde und den Wechselwirkungscharakteristika und den sterischen Begebenheiten der Tasche Rechnung getragen wurde. Bestimmte Filterkriterien, wie die 5er-Regel nach Lipinski (*Lipinski's rule of five*)¹⁹¹, wurden während der Entwicklungsphase auf die neuen Moleküle angewandt, um möglichst die Anforderung an Wirkstoff-ähnliche Verbindungen zu befriedigen. Zudem wurde besondere Rücksicht auf die chemisch-synthetische Zugänglichkeit der Substanzen gelegt. Der sequenzielle und strukturelle Vergleich der allosterischen Bindungstaschen in *Dd* Myosin-2 und *Pf* Myosin A erlaubte schon zu diesem Zeitpunkt die Möglichkeit bestimmte abweichende Begebenheiten in die Entwicklung mit einzubeziehen, um eventuelle Selektivitäten zumindest zu diesen Myosinisoformen zu erzeugen. So wurde zum Beispiel versucht Glu441 in *Pf* Myosin A mit in das vom Liganden wahrscheinlich aufgebaute Wechselwirkungsnetzwerk miteinzubauen, da diese Position in *Dd* Myosin-2 durch Gly427 besetzt ist, einer viel kleineren Aminosäure ohne Seitenkette und ohne negative Ladung. Ein weiteres Beispiel ist durch die Aminosäuren Ile630-Lys634 in *Pf* Myosin A gegeben, die einen deutlich anderen Verlauf als die entsprechenden Aminosäuren in Strukturen von *Dd* Myosin-2 aufweisen, in denen die Bindungstasche an dieser Stelle vergrößert ist, wodurch andere sterische Begebenheiten an dieser Position in den beiden Taschen herrschen.

Alle erzeugten Verbindungen der Substanzbibliothek wurden anschließend geometrieoptimiert mit dem Programm PCGameSS¹⁹² des Gamess-US Quantenchemie-Paketes¹⁹³ unter Verwendung der semi-empirischen AM1-Methode. Zur Bestimmung der Bindungsaffinität der Substanzen zu *Pf* Myosin A wurden die Verbindungen durch Molekulares Docking mittels AutoDock4¹³⁷ in das Zielprotein gedockt und die freien Bindungsenergien berechnet. Benzyl-2,2'-(6,6'-dimethoxybiphenyl-3,3'-diyl)diacetat (6) zeigte gegenüber *Pf* Myosin A eine Bindungsaffinität von $\Delta G_{\text{berechnet}} = -10,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ und wurde als geeignete Leitstruktur ausgewählt. In nachfolgenden Optimierungszyklen zur Erhöhung der Affinität und Verbesserung der Löslichkeit der Substanzen wurden weitere vielversprechende Derivate der ausgewählten Biphenylleitstruktur, sowie deren monomeren Baustein, dem Hydroxyphenylelessigsäureesterkern, *in silico* entwickelt und getestet. Die vielversprechendsten Derivate wurden schließlich chemisch synthetisiert.

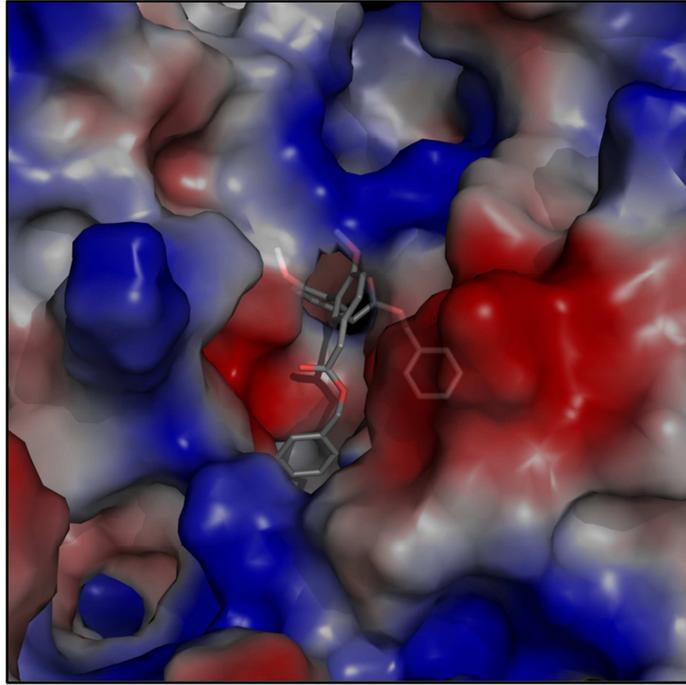


Abbildung 3.28: Vorhergesagte Bindungsposition von Verbindung **6** in *Pf* Myosin A durch Molekulares Docking. Verbindung **6** ist als Stabmodell gezeigt und das Myosin in einer Oberflächendarstellung, gefärbt entsprechend des elektrostatischen Potentials (Rot = elektropositiv, Blau = elektronegativ).

3.3.3 Synthese der Leitstrukturen

Die Synthese der neuen potentiellen *Pf* Myosin A Inhibitoren erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Kalesse, Leibniz Universität Hannover. Die Verbindungen **6** und **18** wurden durch Mitglieder der Arbeitsgruppe Kalesse dargestellt.

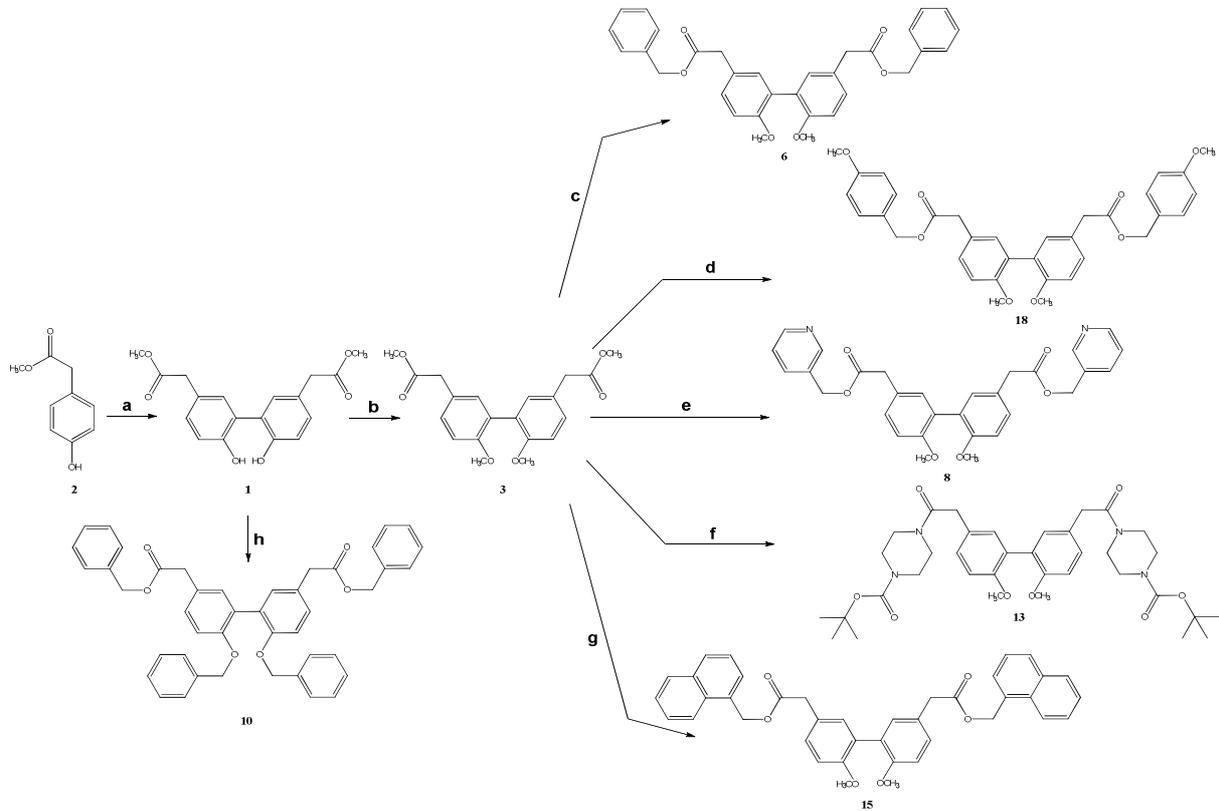


Abbildung 3.29: Syntheseroute der Verbindungen mit Ester- und Amidfunktion.

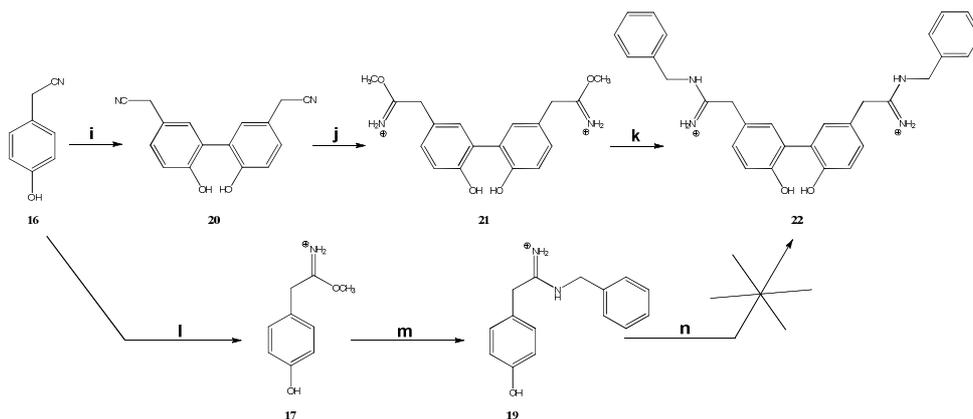
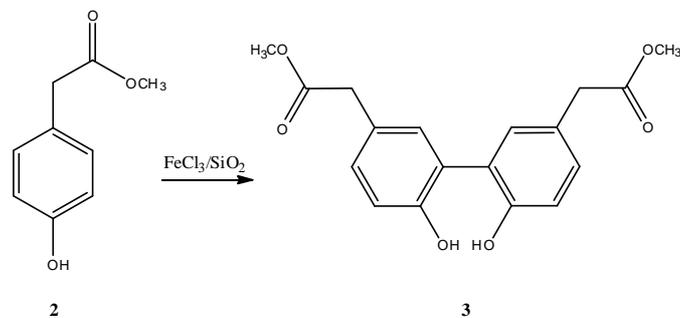


Abbildung 3.20: Syntheseroute der Verbindungen mit Nitril-, Imidoester- und Amidfunktion.

3.3.3.1 Synthese von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**1**)

Für die Synthese von Verbindung **1** und die Darstellung des Biphenylgrundkörpers wurde eine biomimetische eisenvermittelte, oxidative Phenolkupplung¹⁹⁴ verwendet. Im ersten Schritt wurde Eisenchlorid·Hexahydrat in einem Lösemittelgemisch von Diethylether und Methanol an Kieselgel adsorbiert. Die symmetrische Arylkupplung fand als Festphasenreaktion durch Umsetzen von (4-Hydroxyphenyl)essigsäuremethylester (**2**) in Anwesenheit des Eisenchlorid/Kieselgel-Gemisches im Vakuum statt. Dabei oxidiert das Eisen(III) den Phenolring und führt zur Bildung von intermediären Cyclohexandienonradikalen, die durch ihre erhöhte Reaktivität schnell miteinander dimerisieren. Die spontane Tautomerisierung der gebildeten Biscyclohexandienone zu den entsprechenden Biphenolen lieferte das Produkt **1**, welches durch Aufnahme in Methanol und anschließender Filtration und Säulenchromatographie gereinigt wurde. Aufgrund des Vorhandenseins der Essigsäuremethylesterfunktion in *para*-Stellung zu den phenolischen Hydroxygruppen, wurden ausschließlich *ortho*-gekuppelte Biphenole erhalten.



Das ¹H-NMR Spektrum von Verbindung **1** ist in Abbildung 3.31 zu sehen.

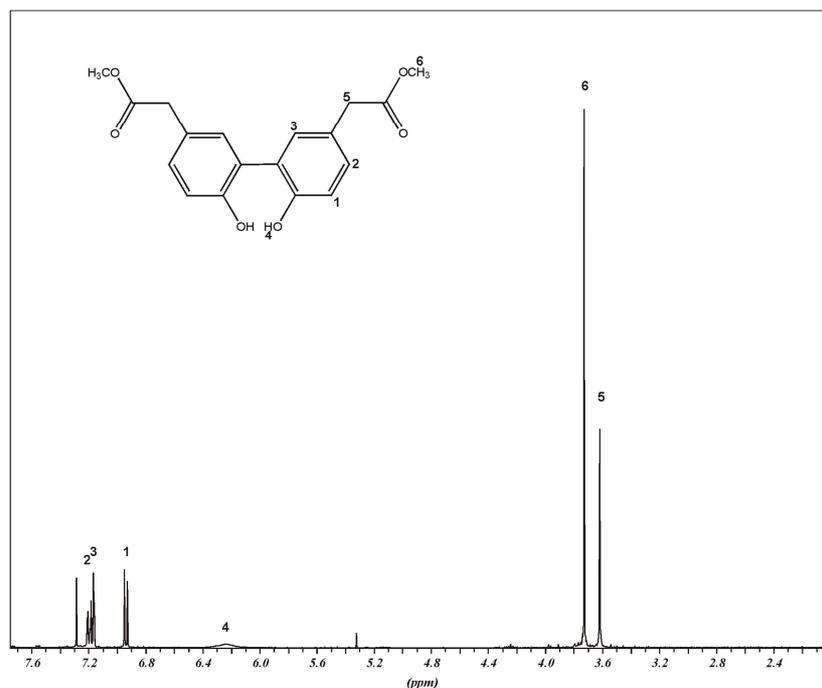


Abbildung 3.31: Ausschnitt des ¹H-NMR Spektrums von **1** in CDCl₃.

3.3.3.2 Synthese von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**3**)

Verbindung **3** wurde durch Veretherung der freien Hydroxygruppen des Biphenyls **1** mit 2,2 Äquivalenten Methyljodid in trockenem *N,N*-Dimethylformamid dargestellt. Da es sich um phenolische Hydroxygruppen handelte, wurde Kaliumcarbonat als Base für die Veretherung eingesetzt. Die Reaktion verlief mit hoher Ausbeute und brachte Verbindung **3** als farbloses, hochviskoses Öl hervor.

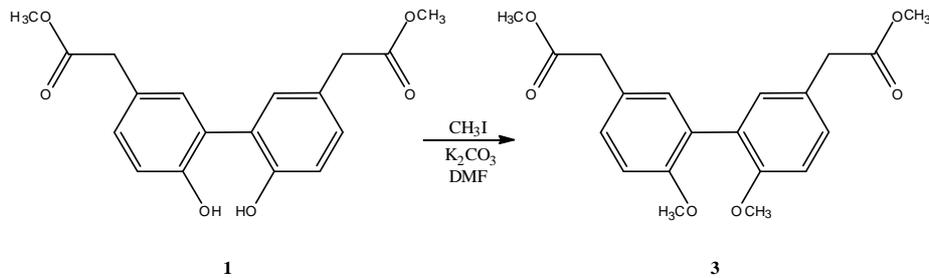


Abbildung 3.32 zeigt das Kernresonanzspektrum von Verbindung **3**.

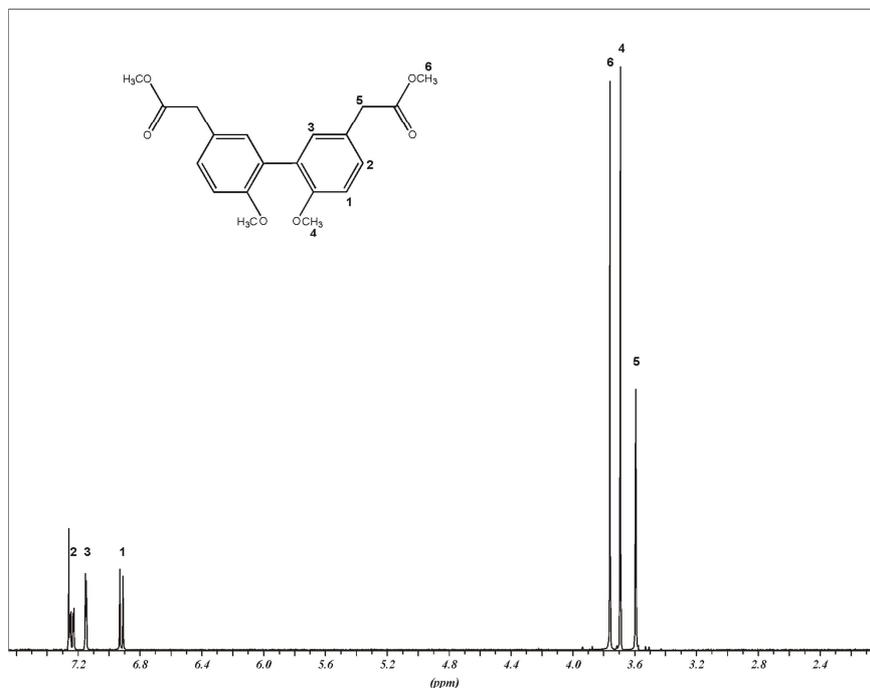
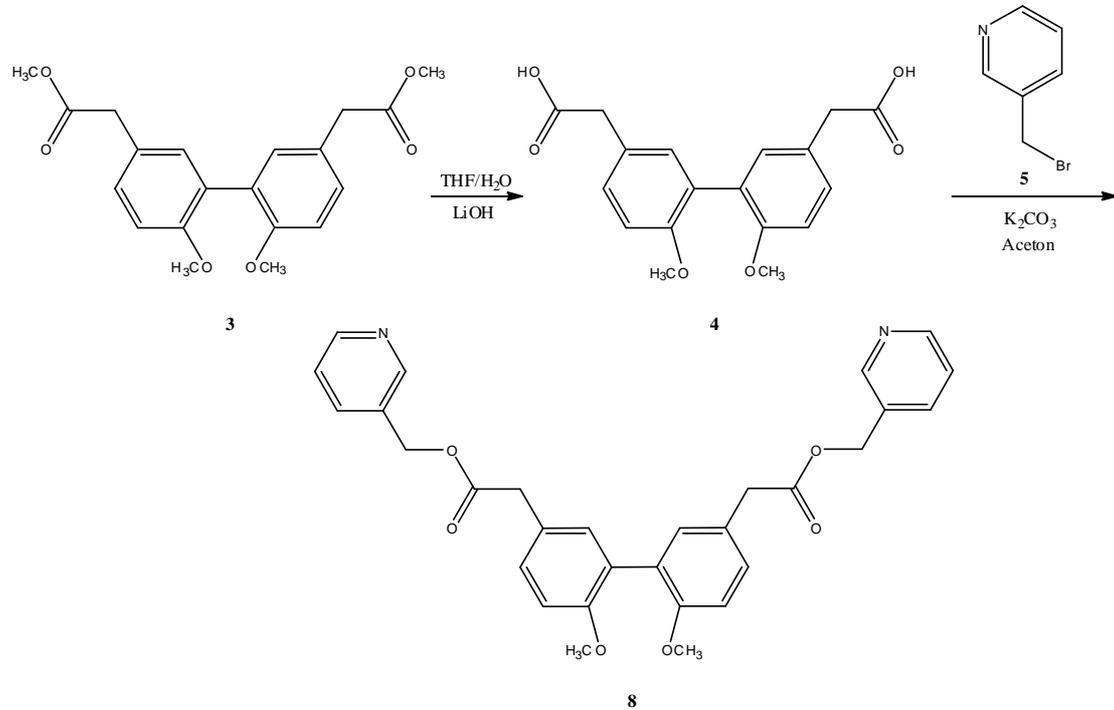


Abbildung 3.32: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **3** in CDCl_3 .

3.3.3.3 Synthese von Bis(pyridin-3-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxybiphenyl-3,3'-diyl)diacetat (**8**)

Zur Darstellung von Biphenyl **8**, das einen ähnlichen Aufbau wie Verbindung **6** besitzt, aber durch Einführung des Stickstoffs über den Pyridinring als zusätzlichen Wasserstoffakzeptor zu einer Erhöhung der Interaktionen zum Protein führen sollte, wurde Verbindung **1** zunächst mit Lithiumhydroxid bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Wasser in die entsprechende Säure **4** umgewandelt. Anschließend wurde die isolierte

Säure **4** mit 2,2 Äquivalenten 3-(Brommethyl)pyridin (**5**) in Aceton zur Reaktion gebracht. Der bei der Reaktion entstehende Bromwasserstoff wurde durch Zugabe der Base Kaliumcarbonat gebunden. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit einem Lösemittelgemisch von Dichlormethan und Methanol.



Das ¹H-NMR-Spektrum des Inhibitors **8** ist in Abbildung 3.33 dargestellt.

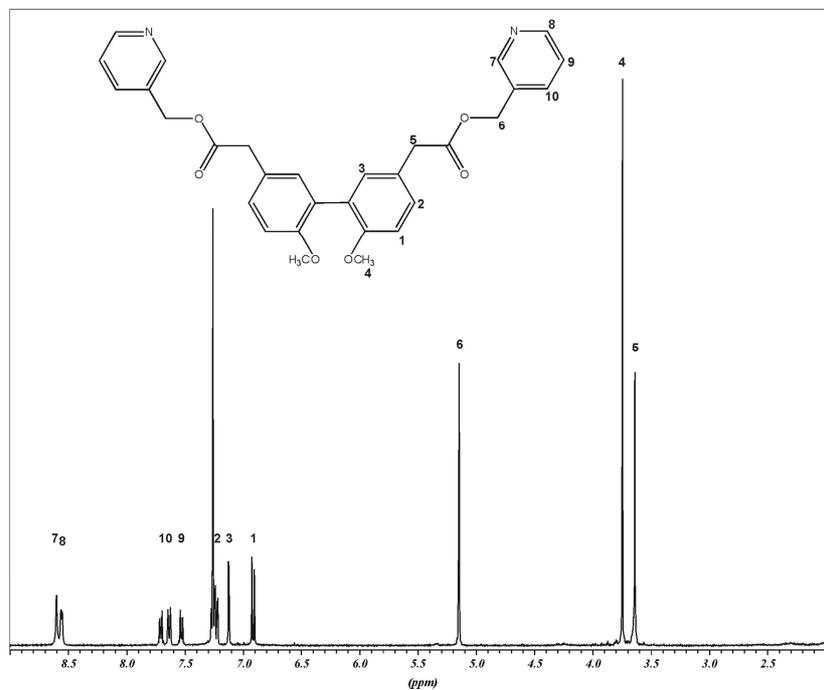


Abbildung 3.33: Ausschnitt des ¹H-NMR Spektrums von **8** in CDCl₃.

3.3.3.4 Synthese von Dibenzyl-2,2'-(6,6'-bis(benzyloxy)-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)-diacetat (**10**)

Für die Synthese von **10** wurde Verbindung **1** im ersten Schritt mit Lithiumhydroxid in einem Lösemittelgemisch von Tetrahydrofuran und Wasser zur Säure **7** umgesetzt. Die anschließenden Reaktionsbedingungen der Umsetzung von **7** mit 4,4 Äquivalenten Benzylbromid (**9**) in Gegenwart von Kaliumcarbonat in Aceton waren sowohl für die Veresterung der Acetatgruppen, als auch für die Williamson'sche Ethersynthese der phenolischen Hydroxygruppen geeignet und lieferte die tetra-Benzyl-substituierte Substanz **10** als farbloses Öl.

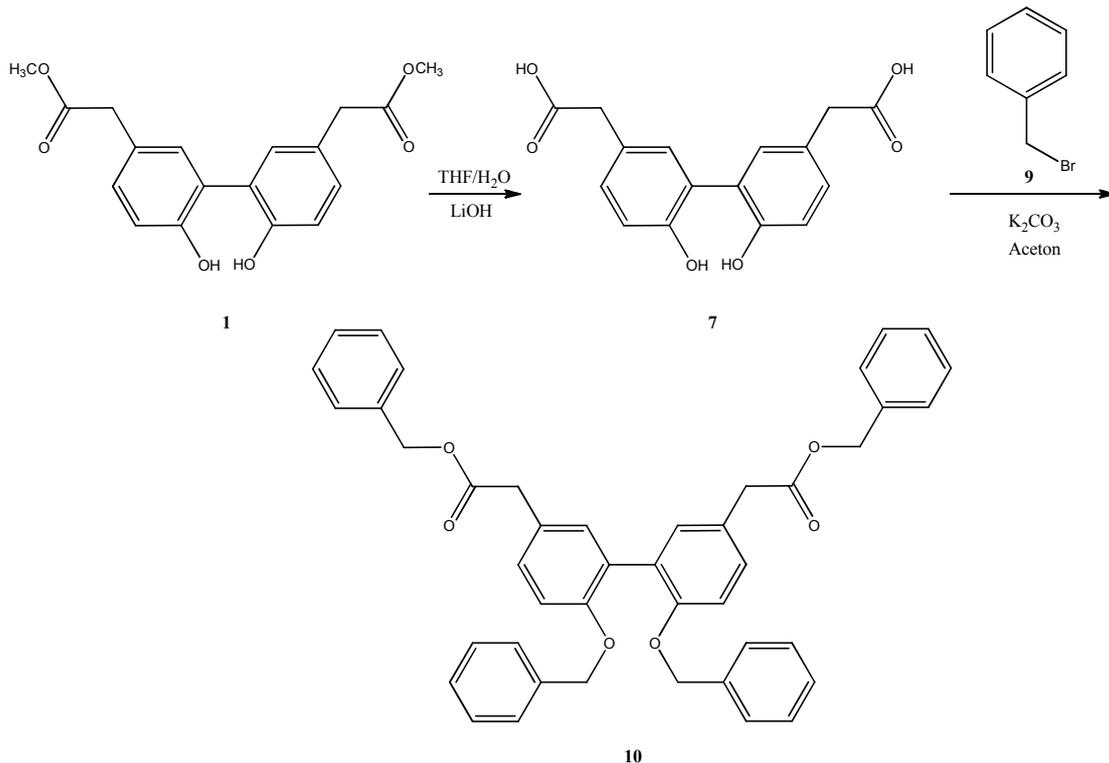


Abbildung 3.34 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ von Verbindung **10**.

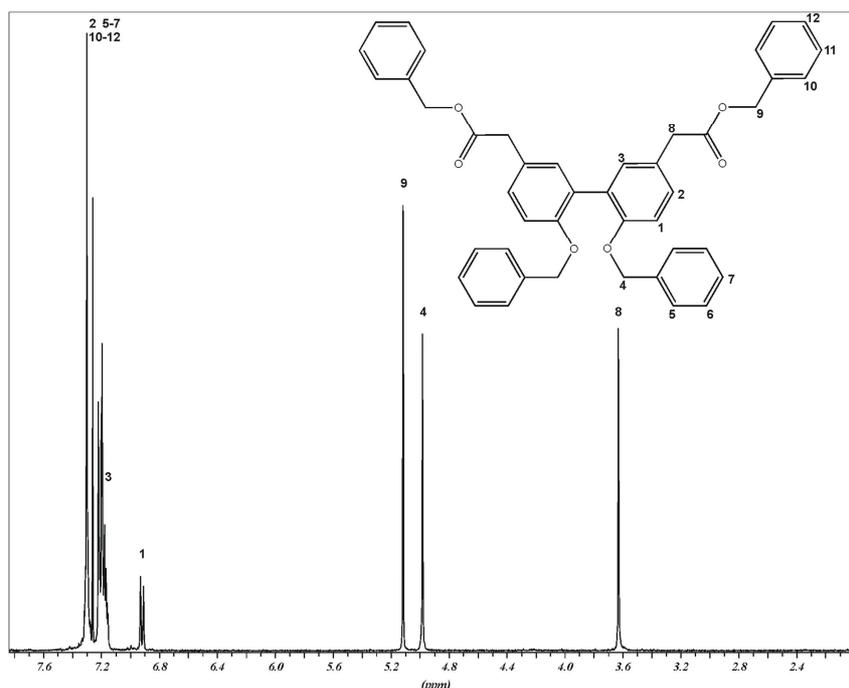


Abbildung 3.34: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **10** in CDCl_3 .

3.3.3.5 Synthese von Di-*tert*-butyl-4,4'-(2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis-(acetyl))-bis-(piperazine-1-carboxylat) (**13**)

Die Darstellung des Biphenyls **13** mit Piperazinsubstituenten wurde mittels einer in der Peptidsynthese gängigen Methode unter Aktivierung durch *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (**12**) erfolgreich durchgeführt. Im ersten Schritt wurde dafür der Methylester **2** durch Lithiumhydroxid in einem Wasser/Tetrahydrofuran-Gemisch in die entsprechende Säure **4** überführt. Für die anschließende Amidbildung bei möglichst milden Bedingungen, um der Abspaltung der BOC-Gruppe (*tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe) des Eduktes *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin (*N*-BOC-Piperazin) (**11**) vorzubeugen, wurde die Reaktion durch Zugabe von EDC·HCl aktiviert. Das Carbodiimid reagiert dabei mit der Carboxylgruppe der erzeugten Säure **4** unter Bildung eines *O*-Acylisoharnstoffes, welcher wiederum durch das *N*-BOC-Piperazin (**11**) nukleophil angegriffen wird und schließlich das Amid **13** unter Abgabe von *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)harnstoff erzeugt. Die Synthese verlief in guten Ausbeuten und das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

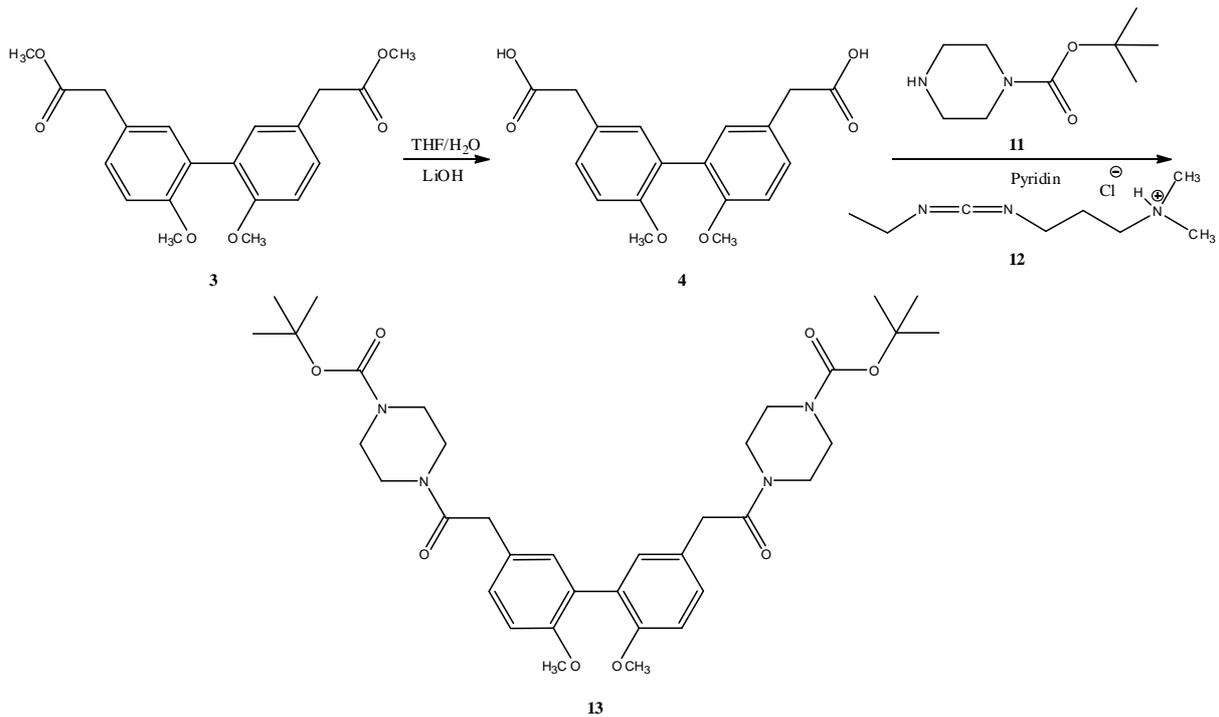


Abbildung 3.35 zeigt das Kernresonanzspektrum von **13** in CDCl_3 . Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Verschiebung der CH_2 -Gruppen des Piperazinringes.

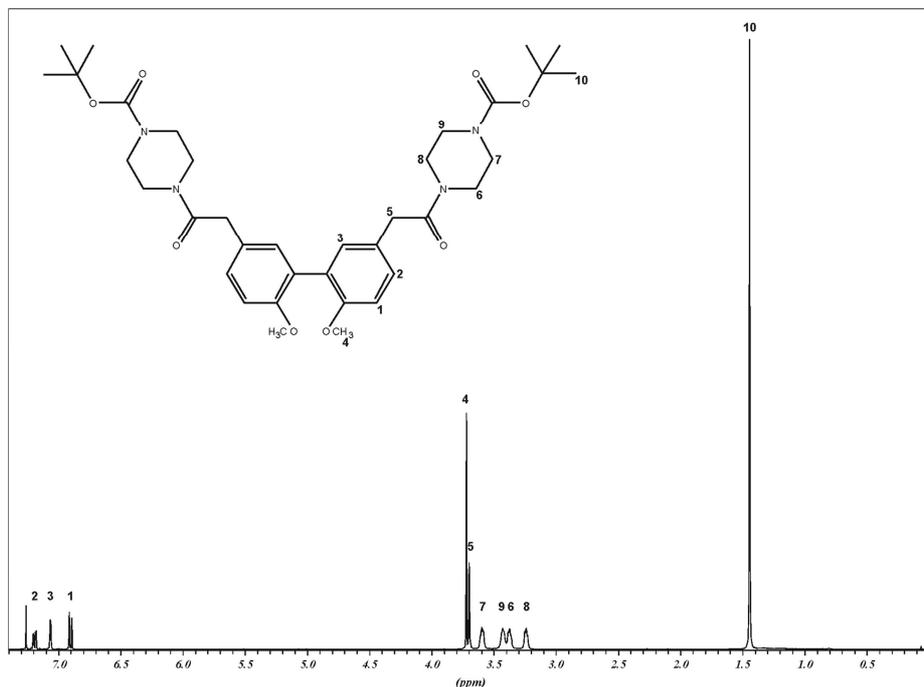


Abbildung 3.35: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **13** in CDCl_3 .

Die genaue Zuordnung der unterschiedlichen Wasserstoffsignale des Piperazinringes, sowie die Verifizierung der erfolgreichen Synthese der Verbindung **13**, fand durch Aufnahme von zweidimensionalen verschiebungskorrelierten COSY-Spektren (*correlated spectroscopy*) statt (Abbildung 3.36). Die sich unterscheidenden chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen

in den Piperazinringen resultieren wahrscheinlich aus einer Einschränkung der Drehbarkeit des Piperazinrings durch Resonanz mit den benachbarten Carbonylgruppen.

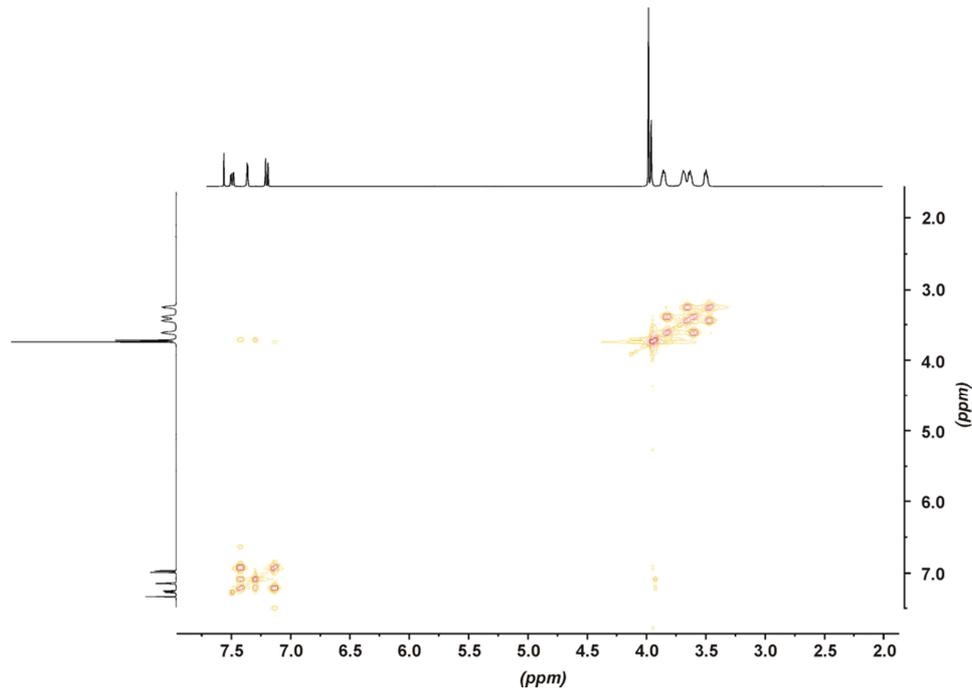
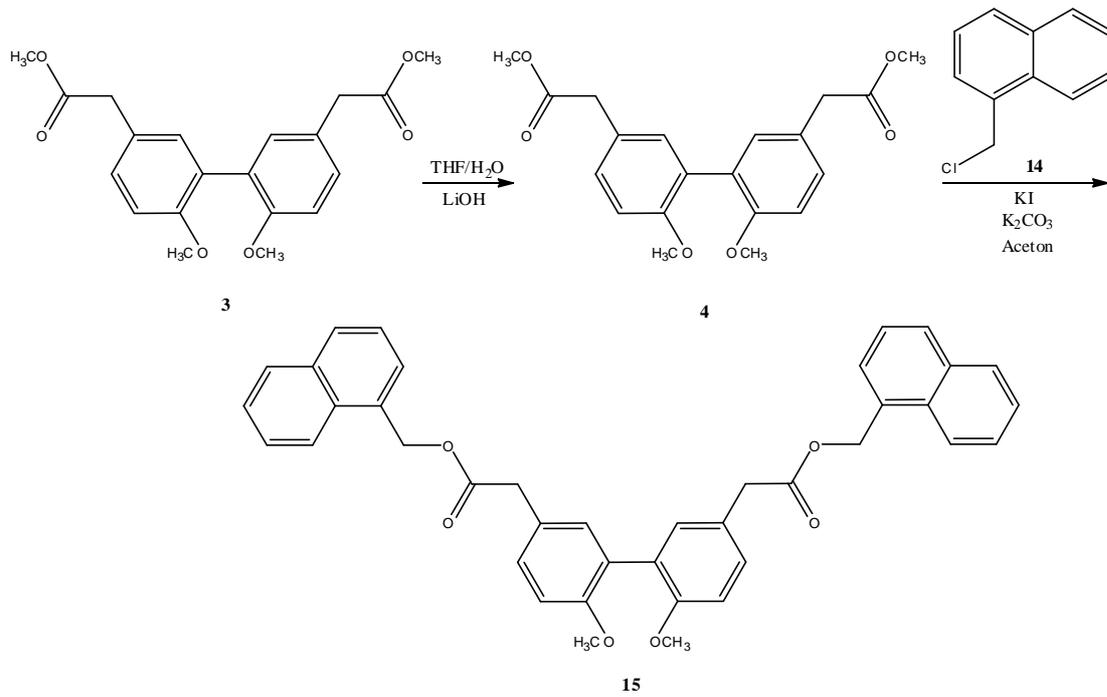


Abbildung 3.36: Ausschnitt des 2D-COSY Korrelationsspektrums der Verbindung **13** in CDCl_3 .

3.3.3.6 Synthese von Bis(naphthalen-1-ylmethyl)-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl] - 3,3'-diyl)-diacetat (**15**)

Die Synthese von **15** ging ebenfalls vom Methylester **3** aus, der zunächst durch Lithiumhydroxid in einem Gemisch aus Wasser und Tetrahydrofuran in die Säure **4** umgewandelt wurde. Die isolierte Säure **4** wurde anschließend mit 2,2 Äquivalenten 1-(Chlormethyl)naphthalen (**14**) versetzt. Da Alkylchloride relativ unreaktiv sind, wurde das Chlorid durch Zugabe von Kaliumiodid in einer Finkelstein-Reaktion *in situ* umhalogeniert und führte erfolgreich zur Darstellung des Biphenyls **15**. Als Base wurde während der Esterbildung Kaliumcarbonat verwendet.



In Abbildung 3.37 ist ein Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **15** dargestellt.

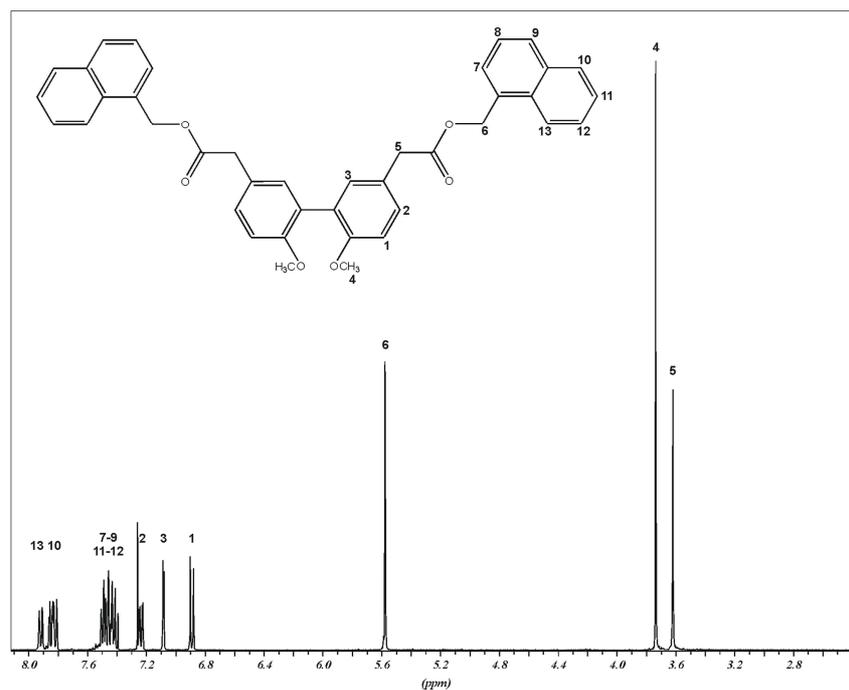
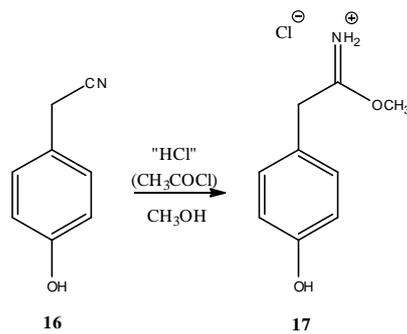


Abbildung 3.37: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **15** in CDCl_3 .

3.3.3.7 Synthese von Methyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidat-Hydrochlorid (**17**)

Der Imidoester **17** wurde durch eine Pinner-Reaktion von 2-(4-Hydroxyphenyl)acetonitril (**16**) mit Chlorwasserstoff in absolutem Methanol hergestellt. Die Reaktion fand in einer Stickstoffatmosphäre statt, um störende Nebenreaktionen zu vermeiden und wasserfreie Bedingungen zu schaffen, da die Anwesenheit von Wasser zur Hydrolyse zu den entsprechenden Amiden und Carbonsäuren führt. Der wasserfreie Chlorwasserstoff wurde *in situ* aus der Reaktion von Acetylchlorid mit absolutem Methanol erzeugt und aktiviert das Nitril durch Protonierung für den nukleophilen Angriff des Methanols. Die Reaktion verlief mit hohen Ausbeuten und ergab das Pinner-Salz **17** als farblosen Feststoff.



Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Imidoesters **17** ist in Abbildung 3.38 gezeigt.

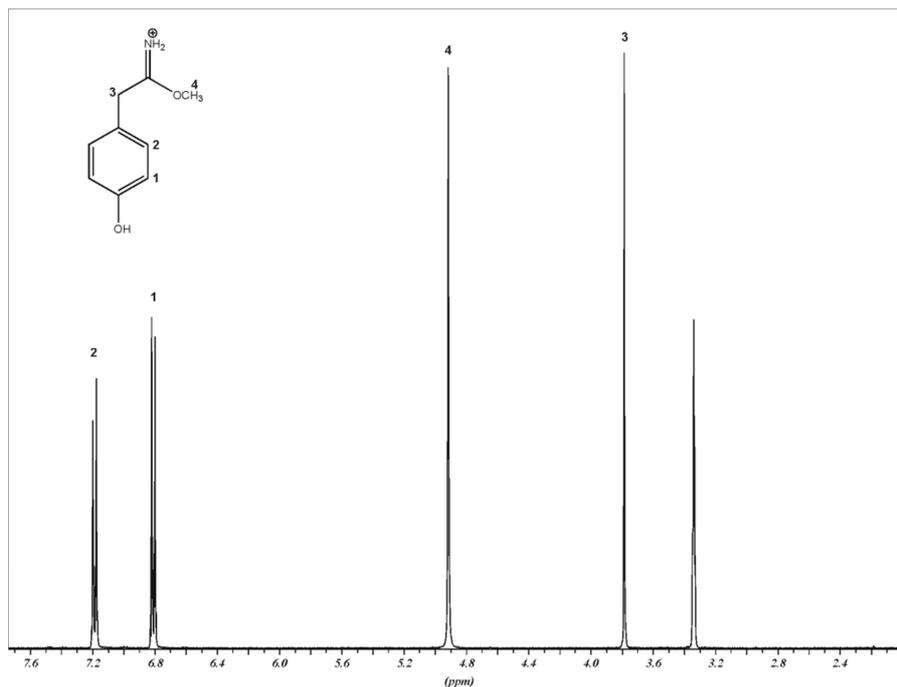
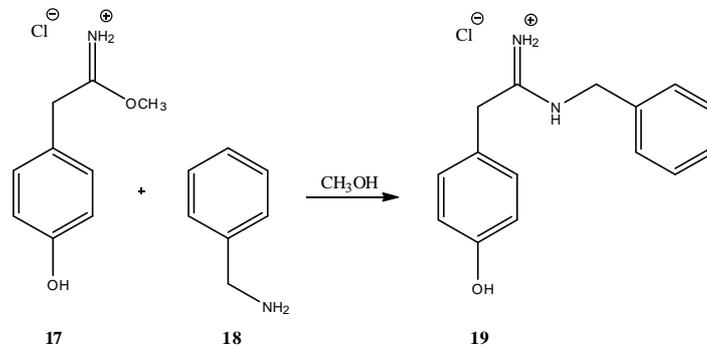


Abbildung 3.38: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **17** in CD_3OD .

3.3.3.8 Synthese von *N*-Benzyl-2-(4-hydroxyphenyl)acetimidamid·Hydrochlorid (**19**)

Das Amidin **19** wurde direkt aus dem in absolutem Methanol gelösten Pinner-Salz **17** unter Wasser- und Luftausschluss in einer Stickstoffatmosphäre durch nukleophile Substitution mit Benzylamin (**18**) dargestellt.



In Abbildung 3.39 ist das Kernresonanzspektrum des Amidins **19** dargestellt.

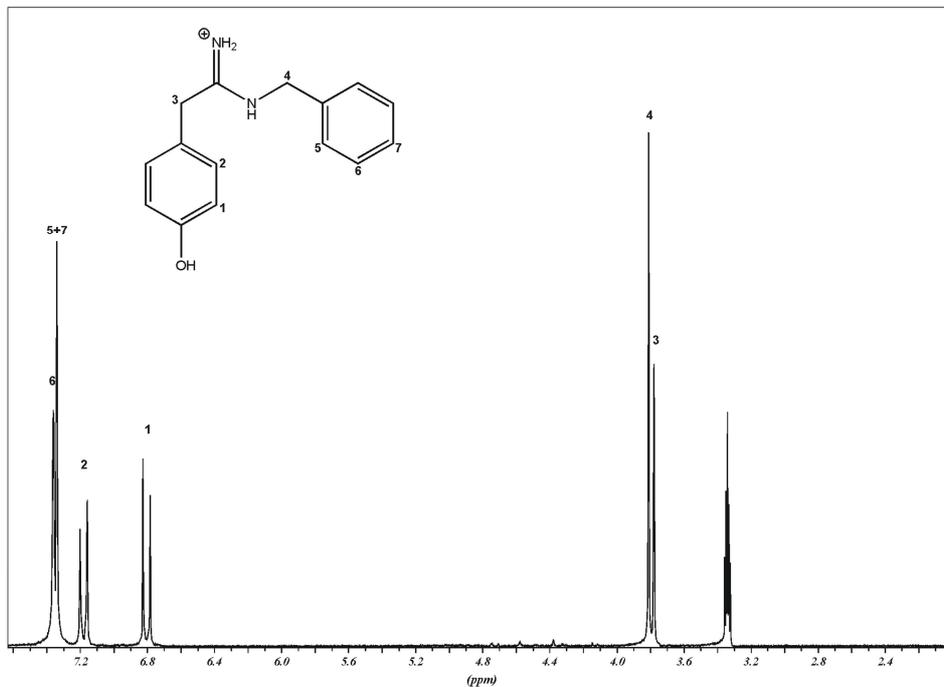
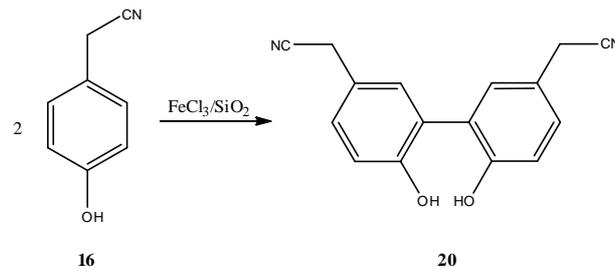


Abbildung 3.39: Ausschnitt des ¹H-NMR Spektrums von **19** in CD₃OD.

3.3.3.9 Synthese von 2,2'-(6,6'-Dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetonitril (**20**)

Für die Synthese des Biphenyldiacetonitrils **20** wurde, analog zur Synthese von Verbindung **1**, eine biomimetische oxidative, eisenvermittelte Arylkupplung von 2-(4-Hydroxyphenyl)-acetonitril (**16**) verwendet. Die Reaktion fand entsprechend der Darstellung von **1** mit Eisenchlorid und Kieselgel im Vakuum statt, lieferte aber deutlich geringere Ausbeuten. Nichtsdestotrotz wurde Verbindung **20** über die $\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$ -Phenolkupplung erhalten und konnte erfolgreich gereinigt werden.



Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **20** ist in Abbildung 3.40 gezeigt.

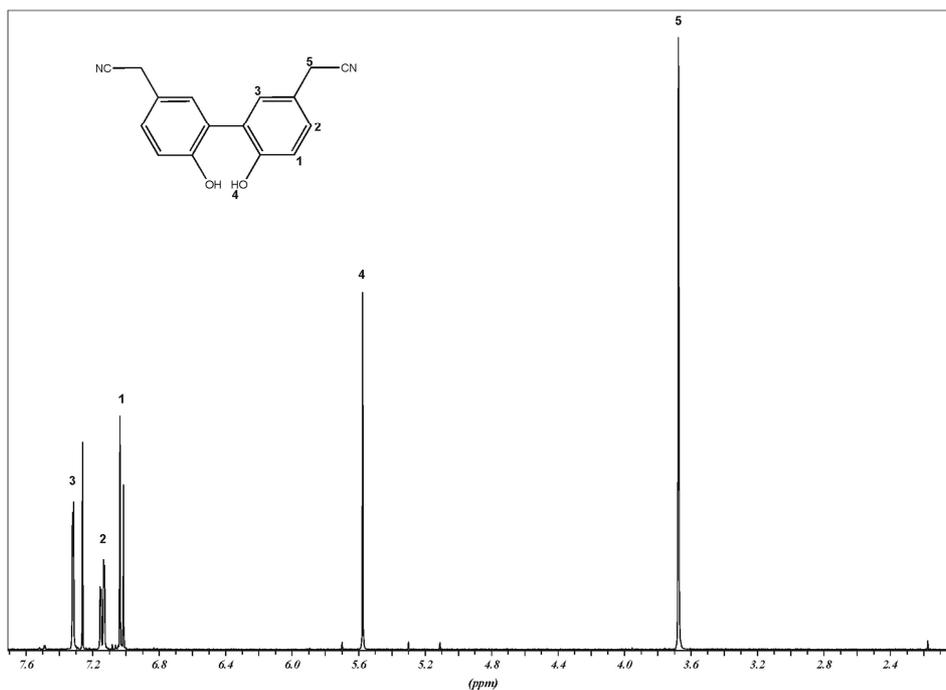


Abbildung 3.40: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **20** in CDCl_3 .

3.3.3.10 Synthese von Dimethyl-2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetimidat (**21**)

Die Reaktion des Acetonitrils **20** zum Biphenyldiimidoester **21** wurde unter Wasserausschluss in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Der für die Pinner-Reaktion benötigte Chlorwasserstoff wurde *in situ* aus Acetylchlorid gewonnen und lieferte in absolutem Methanol den Methylimidoester **21** in guter Ausbeute.

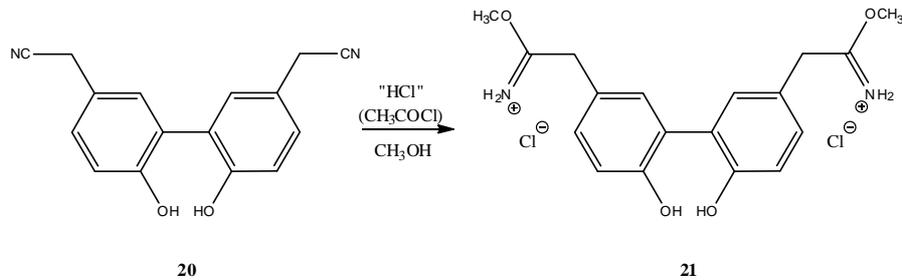


Abbildung 3.41 zeigt das Kernresonanzspektrum von Verbindung **21**.

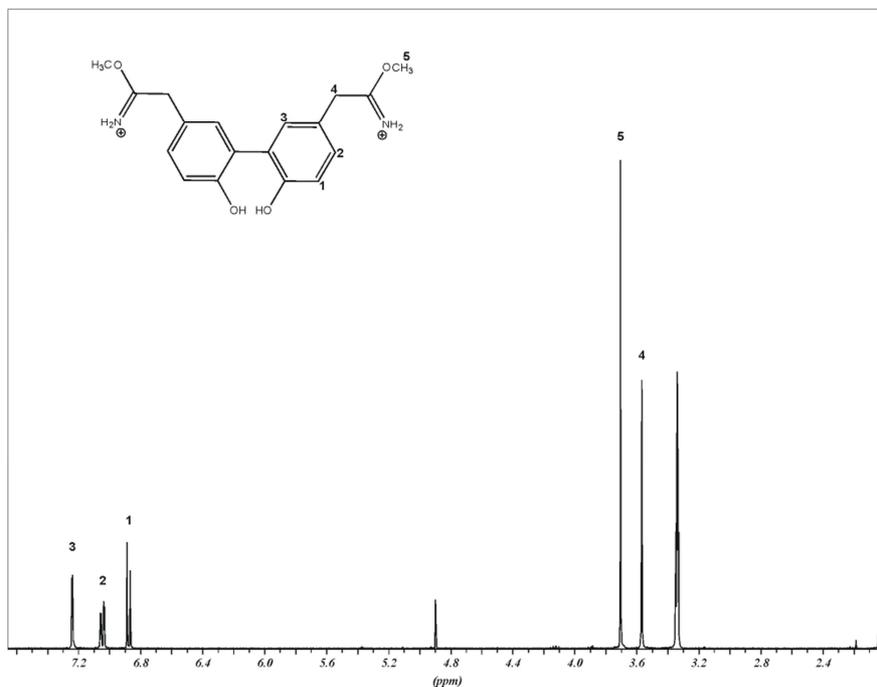
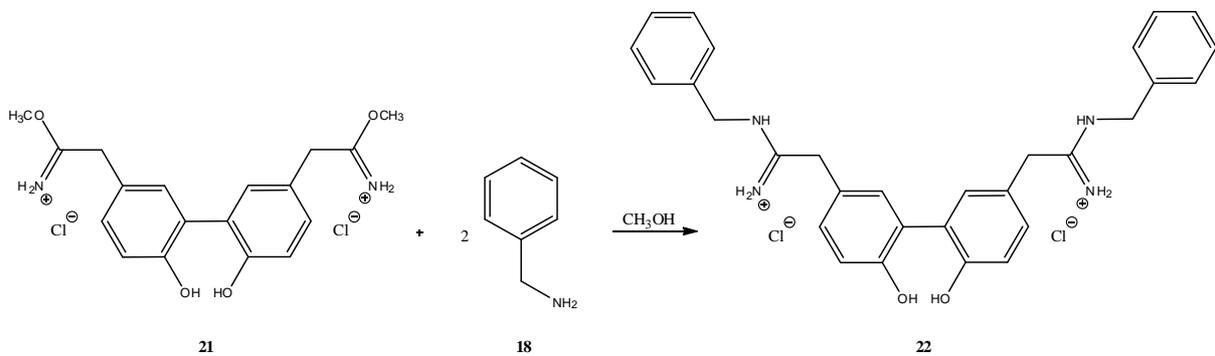


Abbildung 3.41: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **21** in CD_3OD .

3.3.3.11 Synthese von 2,2'-(6,6'-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)bis(N-benzylacetimidamide) (**22**)

Zur Darstellung von Verbindung **22** wurden 2 Synthesestrategien verfolgt. Die erste beinhaltete die Funktionalisierung des Nitrils **16** zum entsprechenden Imidoester **17** und schließlich zum Amidin **19**. Das Amidin **19** sollte anschließend durch eine oxidative Phenolkupplung zum Biphenyldiamidin **22** dimerisiert werden. Die eisenvermittelte Phenolkupplung brachte jedoch kein nachweisbares Biphenyldiamidinprodukt hervor. Für die erfolgreiche Synthese des Biphenyldiamidins **22** wurde schließlich der Imidoester **21** mit 2 Äquivalenten Benzylamin (**18**) in absolutem Methanol unter Luft- und Wasserausschluss in inertem Schutzgas umgesetzt. Die Reaktion verlief mit guter Ausbeute und das Produkt wurde durch Ausfällen mit Diethylether gereinigt und im Hochvakuum getrocknet.



Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Biphenyldiamidins **22** ist in Abbildung 3.42 dargestellt.

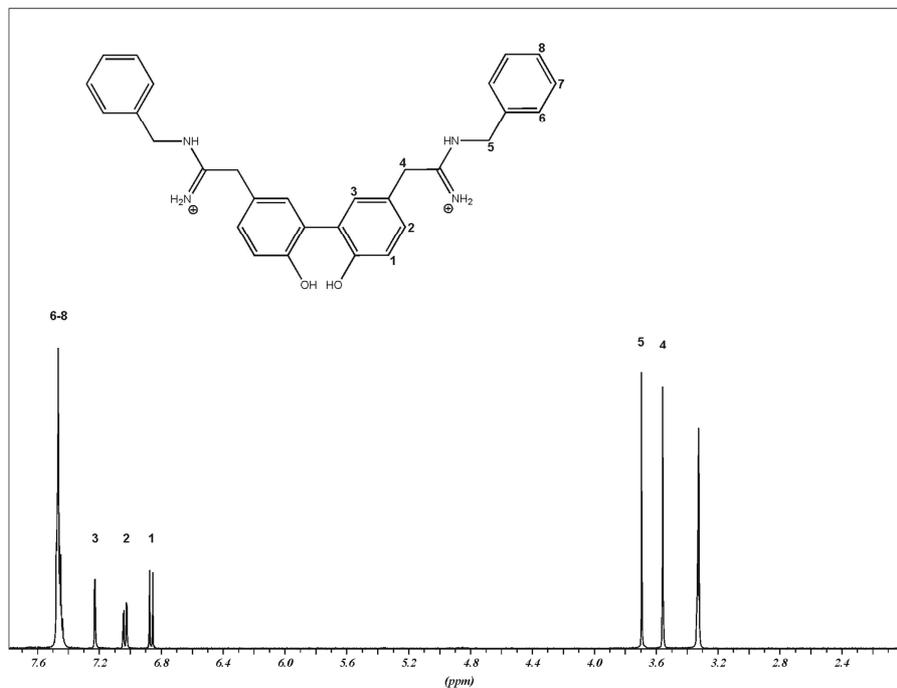
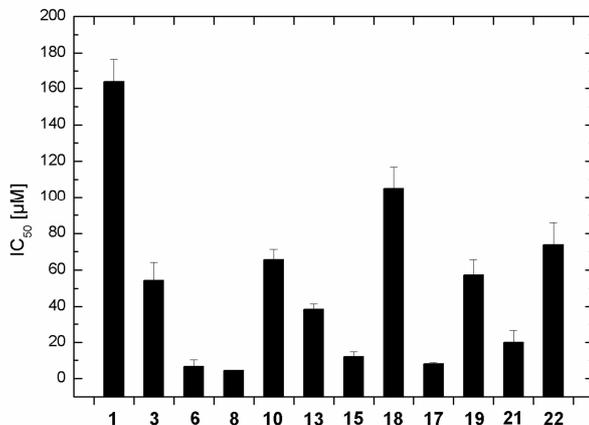


Abbildung 3.42: Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von **22** in CDCl_3 .

3.3.4 Untersuchung der inhibitorischen Aktivität der Verbindungen

3.3.4.1 Inhibierung der enzymatischen ATPase-Funktion

Um die Fähigkeit der dargestellten Verbindungen **1**, **3**, **6**, **8**, **10**, **13**, **15**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21** und **22** zur Hemmung der Myosinfunktion zu bestimmen und die inhibitorische Aktivität zu quantifizieren wurden kinetische *steady-state* Messungen bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. Alle Experimente fanden in Anwesenheit von 30 μM F-Aktin statt. Als Modellsystem für die Bestimmung der inhibitorischen Wirksamkeit der Verbindungen auf die enzymatische ATPase-Aktivität von Myosin wurde das *Dictyostelium discoideum* Myosin-1b ausgewählt, das eine relativ hohe sequenzielle Übereinstimmung der allosterischen Bindungstasche zum parasitären *Pf* Myosin A besitzt. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt und die halb-maximalen inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50} -Werte) durch Auftragen der erhaltenen Werte gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration bestimmt. Die Inhibitionskurven folgen generell einem sigmoidalen Verlauf und wurden durch nicht-lineare Regression ausgewertet. Verbindung **8** zeigte die höchste Aktivität auf *Dd* Myosin-1b mit einem IC_{50} von $4,47 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Des Weiteren wurden potente inhibitorische Aktivitäten mit IC_{50} -Werten unter 15 μM von den Verbindungen **6** ($\text{IC}_{50} = 6,59 \pm 3,8 \mu\text{M}$), **17** ($\text{IC}_{50} = 8,07 \pm 0,8 \mu\text{M}$) und **15** ($\text{IC}_{50} = 12,16 \pm 2,6 \mu\text{M}$) erhalten. Eine graphische Darstellung der gemessenen IC_{50} -Werte ist in Abbildung 3.43 gezeigt.



Verbindung	IC_{50} [μM]
1	163,75 ± 12,7
3	54,25 ± 9,9
6	6,59 ± 3,8
8	4,47 ± 0,3
10	65,59 ± 5,7
13	38,72 ± 2,9
15	12,16 ± 2,6
18	105,08 ± 11,6
17	8,07 ± 0,8
19	57,27 ± 8,3
21	19,89 ± 6,7
22	73,78 ± 12,1

Abbildung 3.43: Graphische Darstellung der gemessenen IC_{50} -Werte der Verbindungen auf die *Dd* Myosin-1b ATPase-Funktion.

Um Hinweise über die Selektivität der Inhibitoren für *Pf* Myosin A, bzw. dem Modellsystem *Dd* Myosin-1b zu bekommen, wurden ausgewählte Substanzen zusätzlich auf ihre inhibitorische Aktivität auf die ATPase-Funktion von *Dd* Myosin-2 unter gleichen Bedingungen geprüft. So zeigt der Inhibitor **6** eine starke hemmende Wirkung auf die ATPase des Klasse-1 Myosins mit einem IC_{50} von $6,59 \pm 3,8 \mu\text{M}$, aber eine deutlich geringere Aktivität gegen *Dd* Myosin-2, mit einem IC_{50} von $82,3 \pm 18,5 \mu\text{M}$ (Abbildung 3.44).

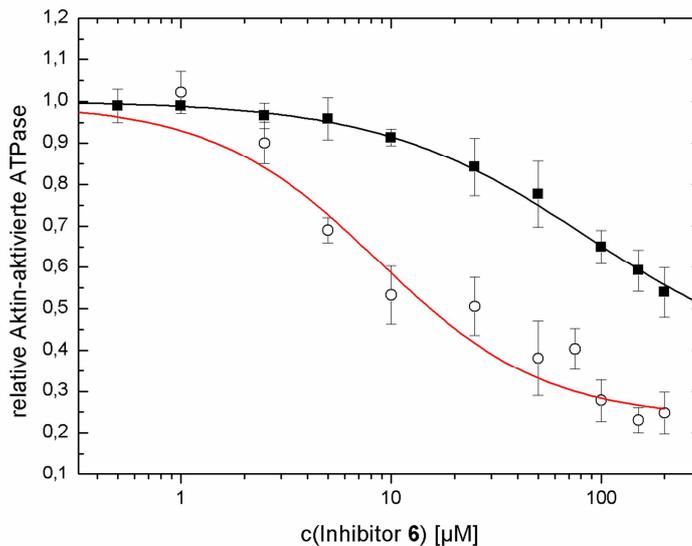


Abbildung 3.44: Inhibition der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von *Dd* Myosin-1b (Rot, ○) und *Dd* Myosin-2 (Schwarz, ■) durch die Verbindung 6. Der Inhibitor besitzt eine deutlich stärkere hemmende Wirkung auf das Klasse 1 Myosin.

3.3.4.2 Inhibierung der Myosinmotorfunktion

Neben der inhibierenden Wirkung auf die enzymatische Myosin-ATPase-Funktion der neuen Verbindungen wurde zusätzlich deren Aktivität auf die Myosin-Motorfunktion unter Verwendung des *in vitro* Motilitätsassays untersucht. Bei diesen Experimenten wird die Gleitgeschwindigkeit von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten über die an einer Glasoberfläche fixierten Motordomänenkonstrukte fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Dabei wurden ausschließlich Motordomänenkonstrukte mit einem künstlichen Hebelarm, der aus zwei aufeinanderfolgenden α -Aktiningruppen besteht, verwendet. Die inhibitorische Aktivität der Verbindungen auf unterschiedliche Myosinisoformen wurde getestet, wobei drei Myosinisoformen aus verschiedenen Klassen verwendet wurden. Als Referenz und Modellsystem wurde wieder das *Dd* Myosin-1b (M1b-2R-YFP) getestet, und zusätzlich zwei humane Myosinisoformen, das humane nichtmuskuläre Myosin-2a (*Hs* NM-2a) und das humane Myosin-7 (*Hs* M7FN3). Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Magnesiumkonzentration bei den Versuchen mit Myosin-7 und nichtmuskulärem Myosin-2a betrug 1,5 mM, wohingegen bei diesen Bedingungen keine Motilität des Myosin-1b zu beobachten war. Aus diesem Grund wurde bei der Verwendung von Myosin-1b die Magnesiumkonzentration auf 150 μ M erniedrigt. Die mittleren Gleitgeschwindigkeiten der Aktinfilamente in der Flusszelle wurden durch Anpassen einer Gaußfunktion im Histogramm der Gleitgeschwindigkeiten gegen die Anzahl der Filamente an die erhaltenen Daten bestimmt. Dabei konnten deutliche Unterschiede in der inhibitorischen Wirkung der einzelnen Verbindungen auf verschiedene Isoformen beobachtet werden (Abbildung 3.45).

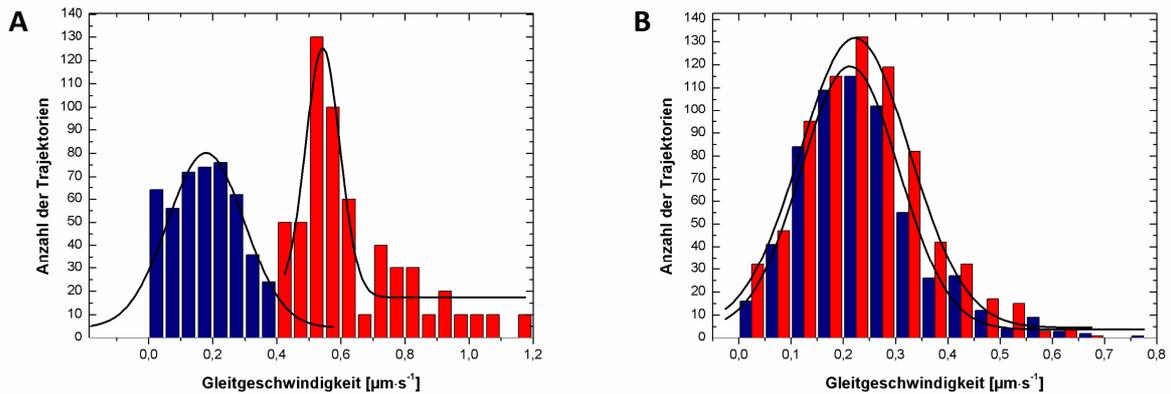


Abbildung 3.45: Darstellung der Hemmung der Gleitgeschwindigkeiten von *Dd* Myosin-1b (A) und *Hs* nichtmuskuläres Myosin-2a (B) durch den Inhibitor Dibenzyl-2,2'-(6,6'-Dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (6). Die unterschiedliche Aktivität der Verbindung auf die Motorfunktion der Myosinisoformen ist deutlich zu erkennen. Die roten Histogramme zeigen die Gleitgeschwindigkeit der Myosine in Abwesenheit von Inhibitor 6 und die blauen Histogramme in Anwesenheit von 100 µM des Inhibitors.

Tabelle 3.6 und Abbildung 3.46 fassen die Ergebnisse der *in vitro* Motilitätsuntersuchungen zusammen. Die stärkste Inhibition der Motorfunktion von *Dd* Myosin-1b erzielten die Verbindungen 8, 6, 15 und 17. Während Verbindung 8 ebenso eine starke Beeinflussung der Funktion von NM-2a ausübt, besitzt Verbindung 6 nur eine geringe Aktivität gegen das Klasse-2 Myosin. Auch Verbindung 13, das die Gleitgeschwindigkeit von Myosin-1b um mehr als die Hälfte reduziert, zeigt keine Wirkung auf das nichtmuskuläre Myosin-2a und eine moderate Aktivität gegen Myosin-7. Die Ergebnisse für *Dd* Myosin-1b korrelieren gut mit den gemessenen IC_{50} -Werten der ATPase-Inhibition.

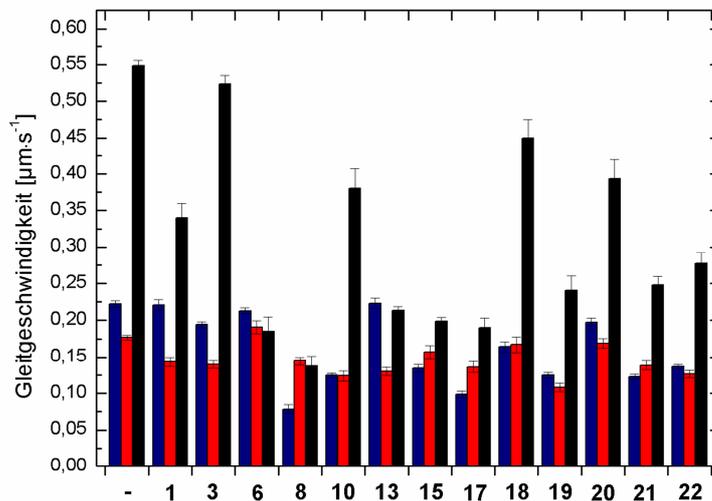


Abbildung 3.46: Graphische Darstellung der Gleitgeschwindigkeiten aus dem *in vitro* Motilitätsassay. Die erste Spalte (-) zeigt die Geschwindigkeiten der Myosine ohne Anwesenheit eines Inhibitors. Farbcode: *Dd* Myosin-1b (Schwarz), *Hs* nichtmuskuläres Myosin-2a (Blau), *Hs* Myosin-7 (Rot).

Tabelle 3.6: Inhibition der Gleitgeschwindigkeit von Aktinfilamenten im *in vitro* Motilitätsassay mit den drei Myosinisoformen bei einer Inhibitorkonzentration der jeweiligen Verbindungen von 100 μM .

Verbindung	Hs NM-2a [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	Hs M7FN3 [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	Dd M1b [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
-	0,2223 \pm 0,0042	0,1766 \pm 0,0036	0,5487 \pm 0,0074
1	0,2209 \pm 0,0073	0,1436 \pm 0,0066	0,3401 \pm 0,0195
3	0,1942 \pm 0,0041	0,1394 \pm 0,0051	0,5239 \pm 0,0113
6	0,2131 \pm 0,0039	0,1905 \pm 0,0088	0,1851 \pm 0,0197
8	0,0783 \pm 0,0062	0,1446 \pm 0,0056	0,1371 \pm 0,0139
10	0,1250 \pm 0,0032	0,1241 \pm 0,0069	0,3805 \pm 0,0269
13	0,2233 \pm 0,0068	0,1299 \pm 0,0059	0,2137 \pm 0,0046
15	0,1343 \pm 0,0056	0,1571 \pm 0,0086	0,1992 \pm 0,0045
17	0,0983 \pm 0,0051	0,1363 \pm 0,0078	0,1901 \pm 0,0130
18	0,1642 \pm 0,0069	0,1671 \pm 0,0109	0,4496 \pm 0,0257
19	0,1247 \pm 0,0039	0,1083 \pm 0,0058	0,2409 \pm 0,0192
20	0,1977 \pm 0,0053	0,1689 \pm 0,0063	0,3932 \pm 0,0267
21	0,1228 \pm 0,0036	0,1385 \pm 0,0059	0,2479 \pm 0,0116
22	0,1366 \pm 0,0029	0,1262 \pm 0,0052	0,2769 \pm 0,0157

3.3.4.3 Untersuchung der Antimalariaaktivität

Um die mit der Inhibition von *Pf* Myosin A einhergehende Antimalariaaktivität der entwickelten Verbindungen nachzuweisen, wurde die hemmende Wirkung der Verbindungen **1**, **3**, und **6** auf die Blutstadien (Merozoiten), sowie die Leberstadien (Sporozoiten) von *Plasmodium falciparum* *in vitro* getestet. Zur Überprüfung ihrer inhibierenden Wirkung auf die Blutstadien der Labor-Parasitenstämme 3D7 und FCR3, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. S. Borrmann, Universität Heidelberg, etablierte *in vitro* Fluoreszenz-Wachstumsassays verwendet. In diesen Wachstumsassays wurde der Lebenszyklus der Merozoiten, der aus den Schritten Invasion humaner Erythrozyten, asexueller Replikation, Abgabe aus den Erythrozyten und erneuter Invasion besteht, in Gegenwart variabler Konzentrationen der drei Verbindungen gemessen und über das Signal des SYBR-green-I-Fluoreszenzfarbstoffes verfolgt.¹⁹⁵ SYBR-green-I ist ein Nukleinsäure-bindender Farbstoff und markiert so spezifisch die parasitäre DNS, da ausgewachsene Erythrozyten weder RNS noch DNS besitzen.¹⁹⁶ Verbindung **6** zeigte dabei eine unverkennbare, hemmende Wirkung auf das Wachstum der Parasiten beider Stämme

im menschlichen Blut, mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von etwa $6 \mu\text{M}$ (Abbildung 3.47). Allerdings stellte sich die Löslichkeit der Substanz in den Blutproben als Problem dar, weshalb die eigentlich effektive Wirksamkeit wahrscheinlich höher liegt. Bei den beiden Methylestern **1** und **3** hingegen wurden deutlich schlechtere IC_{50} -Werte von $53\text{-}93 \mu\text{M}$ erhalten.

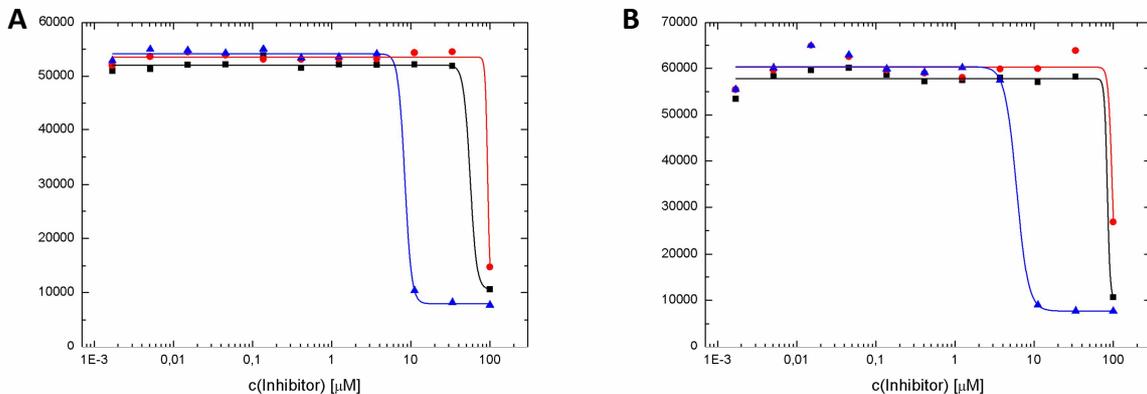


Abbildung 3.47: Ergebnisse der Hemmung durch die Verbindungen **1** (Rot), **3** (Schwarz) und **6** (Blau) in *in vitro* Wachstumsassays. **(A)** Wachstumsassay mit dem Parasitenstamm 3D7. **(B)** Wachstumsassay mit dem Parasitenstamm FCR3. Die Wachstumsassays wurden experimentell von Judith Straimer, Arbeitsgruppe Prof. S. Borrmann, Universität Heidelberg durchgeführt.

Die inhibierende Wirkung der Verbindungen **1**, **3** und **6** auf die Sporoziten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. F. Frischknecht, Universität Heidelberg, mit einem semi-automatisierten *in vitro* Verfahren zur Messung der Sporoziten-Motilität untersucht, welches erlaubt, die Motilität einer Vielzahl von Sporoziten zeitgleich aufzunehmen und auszuwerten.¹⁹⁷ Die mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) fluoreszenzmarkierten Sporoziten bewegen sich unter normalen Bedingungen durch eine Gleitbewegung gegen den Uhrzeigersinn auf Kreisbahnen. Zugabe der neuen Myosininhibitoren reduziert die Anzahl der kreisförmig sich bewegenden Sporoziten zu lediglich winkenden oder unbeweglichen Sporoziten (Abbildung 3.48).

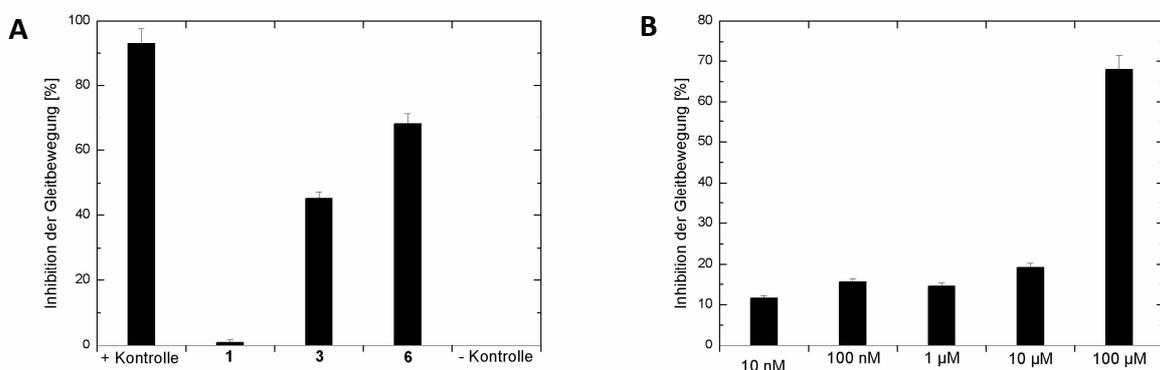


Abbildung 3.48: Ergebnisse der *in vitro* Sporoziten-Motilitätsmessungen. **(A)** Inhibition der beobachteten kreisförmigen Gleitbewegung entgegen dem Uhrzeigersinn durch die Verbindungen **1**, **3** und **6** bei einer InhibitorKonzentration von $100 \mu\text{M}$. Als Positivkontrolle (+ Kontrolle) wurde der potente Aktininhibitor Cytochalasin D (CytoD) verwendet. **(B)** Hemmung der parasitären Gleitbewegung der Sporoziten bei unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors **6**. Experimentelle Durchführung der *in vitro* Sporoziten-Motilitätsmessungen fand durch Stephan Hegge, Arbeitsgruppe Prof. F. Frischknecht, Universität Heidelberg statt.

Tabelle 3.7 fasst die Ergebnisse aus den Versuchen zur Antimalariaaktivität der Verbindungen **1**, **3** und **6** nochmal zusammen. Die Experimente belegen eine inhibierende Wirkung der Substanzen gegen beide Entwicklungsstadien der Plasmodien, sowohl dem Blutstadium als auch dem Leberstadium. Die stärkste hemmende Wirkung der drei getesteten Substanzen zeigte Verbindung **6** mit einem IC_{50} von etwa 6 μM und bestätigt somit die Vorhersage der *in silico* Berechnungen. Aufgrund der problematischen Löslichkeit der Substanzen unter den experimentellen Bedingungen und der damit verbundenen undefinierbaren Menge an präzipitierendem Inhibitor, ist die effektive Wirksamkeit der Substanzen wahrscheinlich höher.

Tabelle 3.7: Ergebnisse aus den Versuchen zur Antimalariaaktivität der Verbindungen. Die Werte der prozentualen Inhibition der Gleitbewegung wurden bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM bestimmt. Zum Vergleich sind die durch Molekulares Docking vorhergesagten freien Bindungsenergien angegeben.

Verbindung	IC_{50} [μM] (Wachstumsassay)		Inhibition der Gleitbewegung [%]	$\Delta G_{\text{berechnet}}$ (Docking) [kcal·mol ⁻¹]
	3D7	FCR3		
1	63,261	93,427	1	-7,82
3	53,887	52,898	45	-6,81
6	6,010	5,632	68	-10,13

3.3.5 Strukturelle Validierung der Bindungsstelle

Die rationale, strukturbasierte Entwicklung neuer *Pf* Myosin A Inhibitoren brachte Verbindungen hervor, die eindeutig eine hemmende Wirkung auf die Motorfunktion isolierter Myosine, sowie auf verschiedene Stadien des Malariaparasiten aufweisen. Somit ist eine Bindung der Biphenylinhibitoren an die Myosin-Motordomäne bereits indirekt nachgewiesen. Um die in den *in silico* Entwicklungsphasen vorhergesagte Bindungstasche der Substanzen zu validieren, wurde die Kristallstruktur der *Dd* Myosin-2 Motordomäne mit gebundenem Inhibitor **3** in Anwesenheit von ADP-VO₄ bis zu einer Auflösung von 2,5 Å gelöst. Die erhaltene Elektronendichte für **3** ist sehr gut definiert und zeigt die Konformation und den Bindungsmodus des Inhibitors in der erwarteten Myosin-Bindungstasche (Abbildung 3.49).

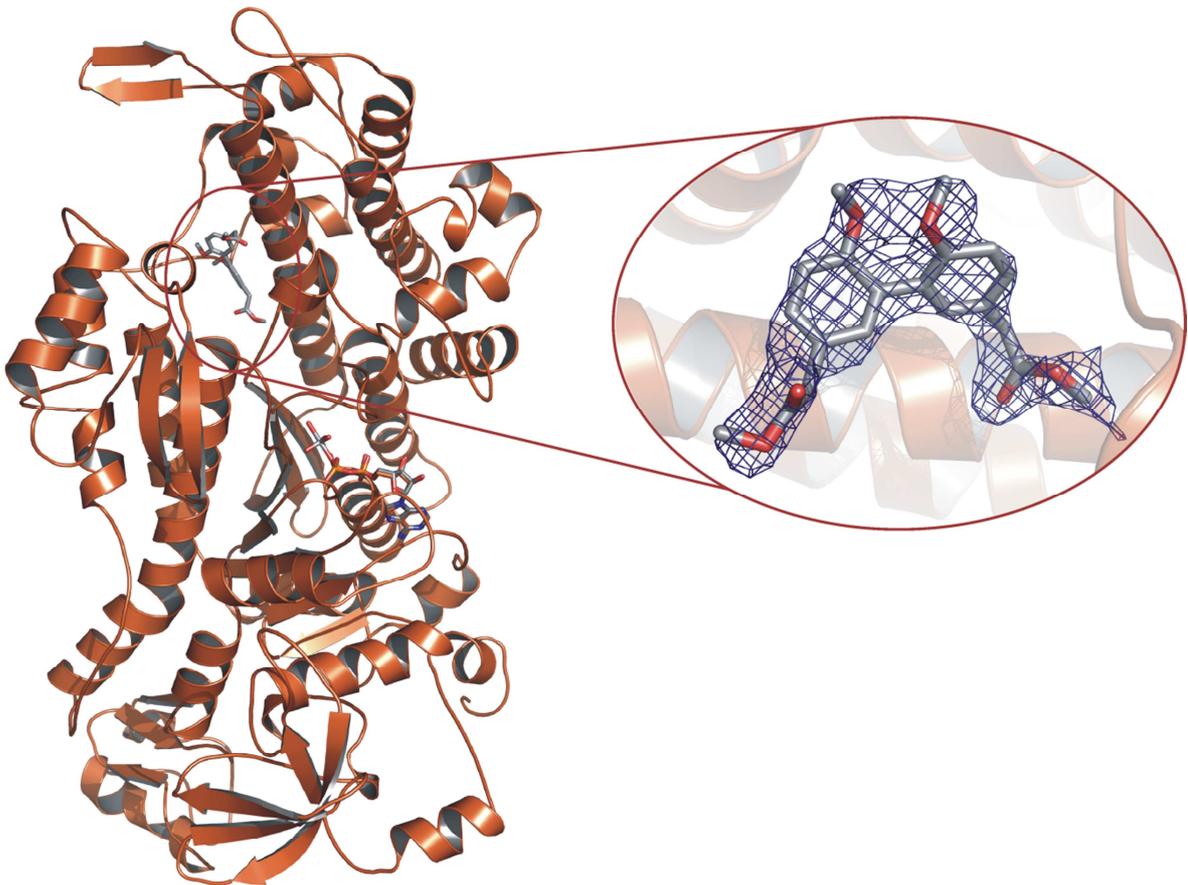


Abbildung 3.49: Kristallstruktur des *Dd* Myosin-2 Komplexes mit gebundenem ADP-VO₄ und Verbindung **3**. Die 2F_o-F_c Elektronendichtekarte, berechnet ohne Anwesenheit des Liganden, zeigt, dass **3** in der allosterischen Tasche bindet, für die der Inhibitor entwickelt wurde und validiert so das *in silico* Design.

Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**3**) bildet dabei ein umfangreiches Wechselwirkungsnetzwerk mit dem Protein aus. Die Sauerstoffe der Methoxygruppen bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Arg428 und Arg620 aus, sowie eine Wasser-vermittelte Interaktion mit Gln633. Eine der beiden Methylesterfunktionen wechselwirkt über eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen

mit den Aminosäuren des Myosins, einschließlich des für die inhibitorische Wirkung der Pseudiline bedeutende Lys265. Die weiteren Wechselwirkungen beinhalten Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäureresten Ala420, Asp590 und Pro591. Ein Zweiwassercluster, das die Interaktion der zweiten Methylesterfunktion mit den Proteinresten Ser260 und Leu263 vermittelt, wurde, wie auch schon bei den halogenierten Pseudilinen, in der Komplexstruktur des Inhibitors **3** vorgefunden. Zudem finden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Proteinseitenketten und den aromatischen Ringen des Biphenylgrundkörpers statt, einschließlich der Interaktionen mit Ala424, Leu431 und Leu592. Eine Darstellung der beobachteten Wechselwirkungen in der Röntgenkristallstruktur von *Dd* Myosin-2 und Dimethyl-2,2'-(6,6'-dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-3,3'-diyl)diacetat (**3**) ist in Abbildung 3.50 gezeigt.

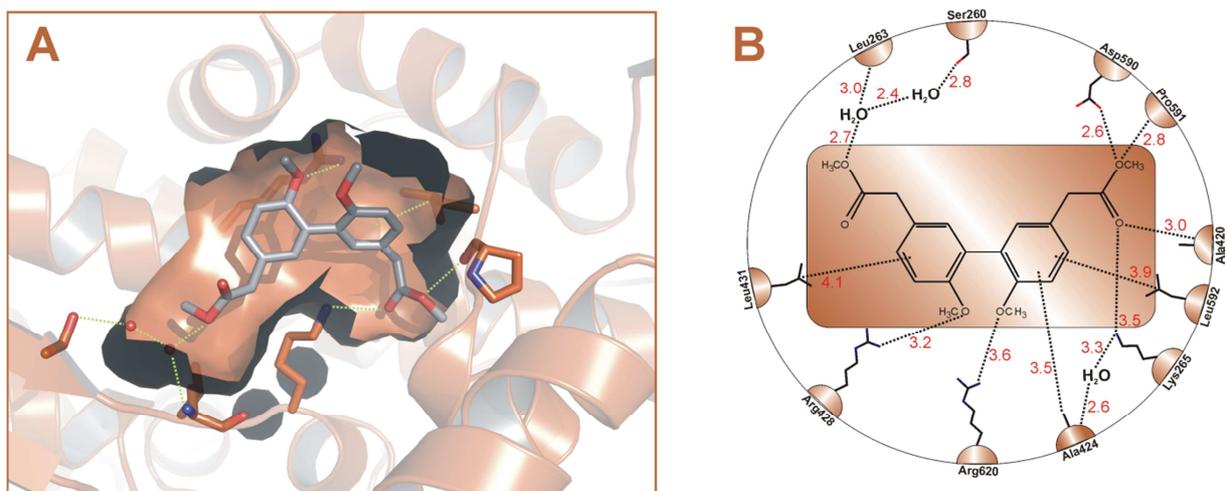


Abbildung 3.50: Darstellung der Wechselwirkungen in der Kristallstruktur zwischen dem Inhibitor **3** und *Dd* Myosin-2.

Zum Vergleich des in der Komplexkristallstruktur mit *Dd* Myosin-2 vorgefundenen Bindungsmodus' von **3** und der aus dem *de novo* Design des Inhibitors erwarteten Bindungsposition in *Pf* Myosin A, wurden die Kristallstruktur und das Modell durch Überlagerung der Hauptkettenatome superpositioniert. Abbildung 3.51 zeigt einen Ausschnitt von *Pf* Myosin A mit der superpositionierten, in *Dd* Myosin-2 kristallographisch identifizierten Bindungskonformation des Inhibitors **3** und des während der *de novo* Entwicklung verwendeten Pharmakophormodells. Die Bindungsposition des Inhibitors ist leicht verschoben und verdreht, im Vergleich zu der nach dem Pharmakophormodell aufgebauten und erwarteten Konformation. Dennoch ist eindeutig erkennbar, dass der größte Teil des Biphenylgrundkörpers in hydrophoben Bereichen der Bindungstasche eingebettet ist, sowie einige der funktionellen Gruppen in den entsprechenden Schlüsselbereichen für attraktive Wechselwirkungen binden. Allerdings gibt es auch deutliche Abweichungen der superpositionierten Bindungsorientierung und der erwarteten Position, was möglicherweise durch die unterschiedliche sequenzielle und strukturelle Zusammensetzung der Bindungstasche in *Pf* Myosin A und in *Dd* Myosin-2 zurückzuführen ist und dadurch abweichende Bindungsmodi der Biphenylinhibitoren an die beiden ungleichen Myosinisoformen zu erwarten lässt. Die kristallographisch bestimmte Bindungskonformation

des Biphenylinhibitors **3** bietet die Möglichkeit für Optimierungen der Inhibitorstruktur zur Erhöhung der Aktivität auf Basis der kristallographischen Position.

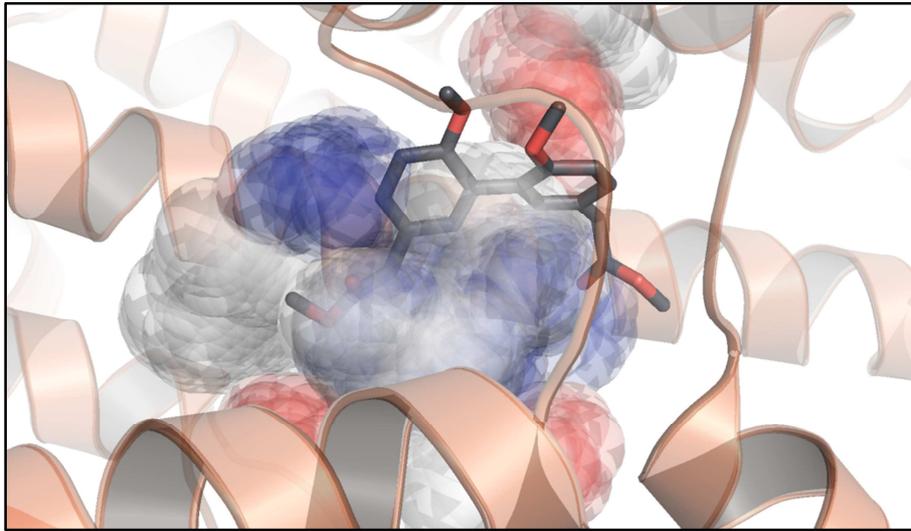


Abbildung 3.51: Ausschnitt der Bindungstasche im Modell von *Pf* Myosin A mit der kristallographisch bestimmten Bindungsposition von Inhibitor **3** und dem im Designprozess verwendeten Pharmakophormodell. Die Position des Inhibitors wurde durch Superposition der Hauptkettenatome des Modells und der *Dd* Myosin-2-Kristallstruktur erhalten. Das Pharmakophormodell ist als transparente Oberflächendarstellung gezeigt und gibt die zum Protein komplementären Wechselwirkungsbereiche wieder. Farbcode: Blau = Wasserstoffdonor, Rot = Wasserstoffakzeptor, Weiß = Hydrophob.

4. Diskussion

4.1 Allosterische Beeinflussung der *Dd* Myosin-2 Funktion durch G680-Mutationen

Die Mutation von G680 in *Dd* Myosin-2 beeinflusst nachweislich die Myosin-Aktivität und -Funktion. Nukleotidbindung, Hydrolyse und Produktabgabe werden durch die Mutation beeinträchtigt^{147,149,151-153}, wobei erhöhte Temperaturen zur Wiederherstellung der Myosin-Aktivität der Mutanten führen.^{149,153} Die strukturelle Analyse der gelösten Mutanten Röntgenstrukturen zeigen, dass die G680A- und G680V-Mutation eine Konformation der Myosin-Motordomäne induziert, die dem Wildtyp *post-rigor* Zustand in Abwesenheit von Aktin ähnelt. Im Gegensatz zum Wildtyp-Myosin-2 ohne gebundenes Nukleotid, weisen die Mutanten-Myosinstrukturen in der apo-Form aber einen geöffneten 50 kDa Spalt in der Motordomäne auf. Die Relayhelix ist langgestreckt und der Konverter und Hebelarm in der *down* Position. Transientenkinetik ergab eine erhöhte Nukleotidaffinität der G680A-Mutante gegenüber Wildtypkonstrukten in der Abwesenheit von Aktin und eine 100-fach verlangsamte ADP-Dissoziationsrate. Des Weiteren konnte während der Verfeinerung der G680A-Nukleotid-Komplexstruktur keine Elektronendichte für das γ -Phosphat-nachahmende *meta*-Vanadat in der Nukleotidbindungstasche gefunden werden, trotz der Anwesenheit von 2 mM ADP und 2 mM Natrium-VO₃ in den Kristallisationsansätzen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die G680A- und G680V-Myosin-2 Mutanten die Besetzung eines einzigen Zustands stabilisieren, mit hoher Präferenz für einen *post-rigor* ähnlichen Zustand. ADP ist stark an das aktive Zentrum gebunden, tatsächlich sogar stärker als beim Wildtyp, $\Delta\Delta G^\circ = 3,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, mit einem erhöhten enthalpischen Beitrag ΔH° von ungefähr $18\text{-}19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (~25 %). In der Gegenwart von Aktin ist die ADP-Affinität des Wildtyp-Myosins dramatisch herabgesetzt (von 7 auf ~240 μM), wohingegen die Affinität der Mutanten größtenteils unverändert bleibt oder sogar leicht ansteigt. Berechnung der thermodynamischen Parameter zeigt eine Erniedrigung der Energiebarriere ΔH^\ddagger der ADP-Bindung durch Aktin, wohingegen die freie Energie der ADP-Bindung ΔG° unverändert bleibt. Trotz ähnlicher Affinitäten von G680A in der Gegenwart und Abwesenheit von Aktin, sind die Entropien sehr unterschiedlich und in der Anwesenheit von Aktin ist die ADP-Bindung Enthalpie-gesteuert. Die Entropie $-\Delta S^\circ$ der ADP-Bindung ist deutlich reduziert im G680A-Konstrukt. Auf der einen Seite, wird diese Erniedrigung der Entropie zu einem großen Anteil durch das stärkere Binden des Nukleotids an die Myosintasche und den damit verbundenen Verlust an Mobilität hervorgerufen. Auf der anderen Seite, geht in den Entropieterm nicht ausschließlich der Beitrag des Substrates ein, sondern ebenso andere Effekte, wie die Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche oder Veränderungen in der Flexibilität umliegender Aminosäuren. Alle drei Mutanten-Röntgenstrukturen zeigen das aktive Zentrum im geöffneten Zustand. Schalter-1 und Schalter-2 haben sich voneinander weg bewegt und die kritische Salzbrücke zwischen Arg238 und Glu459 ist unterbrochen. Um das dynamische Verhalten des aktiven Zentrums und der Motordomäne insgesamt zu

untersuchen, wurden Moleküldynamik-Simulationen der G680A- und G680V-Mutanten in wässriger Lösung, basierend auf den Röntgenstrukturen im apo-Zustand, durchgeführt. Über die 100 ns Simulationszeit blieb die Position von Schalter-2 stabil, während Schalter-1 seine Konformation änderte und sich in Richtung Schalter-2 bewegte. Die Umlagerung von Schalter-1 war mit einer Rotation der gesamten U50 kDa Domäne und dem Prozess des Schließens des 50 kDa Spaltes verbunden. Dieses Verhalten konnte in allen durchgeführten MD-Simulationen der Mutanten-Motordomänen beobachtet werden. Analyse der kristallographischen B-Faktoren, sowie Hauptkomponentenanalyse der MD-Trajektorien deuten weiterhin auf eine Erniedrigung der thermischen Flexibilität verschiedenster Teile der L50 kDa Domäne, einschließlich der Relayhelix und Schalter-2. Somit lassen die Daten vermuten, dass die G680-Mutanten weiterhin die Fähigkeit besitzen den 50 kDa Spalt aufgrund der Bindung an Aktin zu schließen und dadurch die Konformation von Schalter-1 zu verändern. Diese Annahme wird ebenfalls durch die Tatsache unterstützt, dass Aktin nach wie vor die ADP-Bindung und -Abgabe in *stopped flow* Experimenten zu beschleunigen vermag.¹⁴⁷ Der offene Spalt und die beobachtete Position von Schalter-1 in den Strukturen der Mutanten scheinen eine Folge der Kristallisationsbedingungen zu sein. Dennoch deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Schalter-2 und die nachfolgende Relayhelix aufgrund der Mutationen in einer definierten Position gefangen oder eingefroren sind. Die damit einhergehende Beeinträchtigung der Funktion als γ -Phosphatsensor von Schalter-2 führt zu einer Erniedrigung der Geschwindigkeitskonstante der Nukleotidbindung an die Myosinmutanten. Zusätzlich könnte die Abnahme der thermischen Flexibilität der Grund sein für die Möglichkeit die geringe Motoraktivität der Myosinmutanten in *in vitro* Motilitätsmessungen durch Temperaturerhöhung zu verbessern^{149,153} und könnte ebenfalls an der Herabsetzung der Entropie der ADP-Bindung beteiligt sein. Wie vorher bereits erwähnt, ist die Aminosäure G680 in der Verbindungsschleife gelegen, die die SH1- und SH2-Helices miteinander verbindet. Um diese Verbindungsschleife findet sich in bekannten Wildtyp-Myosinen ein umfangreiches Netzwerk an Interaktion zwischen der SH1/SH2-Region, der Relayhelix, sowie dem zentralen β -Faltblatt. Dieses Netzwerk umfasst mindestens 9 Aminosäurereste und 5 Wassermoleküle. Die Einführung einer aliphatischen Seitenkette, wie die Methylgruppe in Alanin, oder die Isopropylgruppe in Valin, scheint die reaktive Thiolregion sterisch von der Relayhelix und dem zentralen β -Faltblatt wegzudrücken. Aufgrund dieses Entfernens können die meisten dieser Wasserstoffbrückenbindungen nicht mehr länger ausgebildet werden und der Spalt zwischen Relayhelix und SH1/SH2-Region wird verbreitert. Darüber hinaus befindet sich die Position G680 in unmittelbarer Nähe zum Drehpunkt der Hebelarmbewegung. Beide Aminosäuren, Alanin und Valin, besitzen im Vergleich zu Glycin eingeschränkte Rotationsfreiheitsgrade, aufgrund der Anwesenheit der Seitenkette. Diese beeinträchtigte Rotationsflexibilität kann zusätzlich einen Einfluss auf die Bewegung des Hebelarms haben.

Die reaktive Thiolregion dient als eine der zentralen Punkte (*hot spot*) für die energetische Kopplung in der Myosin-Motordomäne. Im Falle der G680-Mutante, in der die Kommunikation der SH1/SH2-Region zu den benachbarten Strukturelementen unterbunden

ist, kann dieser Transfer energetischer und konformationeller Informationen nicht länger stattfinden. Als Konsequenz ist die feinabgestimmte Verstärkermechanik des Myosinmotors gestört und die Fähigkeit der Relayhelix die abgeknickte Form einzunehmen und somit die Konverterdomäne, die direkt an die SH1/SH2-Region gebunden ist, in die *up* Position zu ziehen unterdrückt. Schalter-2, am N-terminalen Ende der Relayhelix gelegen, ist auf die gleiche Weise von der Beeinträchtigung der Relayhelix betroffen und in der offenen Konformation gefangen. Somit beeinflusst die Funktion oder Dysfunktion der reaktiven Thiolregion allosterisch das aktive Zentrum und damit die Nukleotidbindung und Hydrolysefähigkeit, sowie die Abgabe der Hydrolyseprodukte. Die Ergebnisse der *in silico* Mutationen und der nachfolgenden 100 ns MD Simulationen bei Raumtemperatur ($T = 300$ K) unterstützen den Mechanismus der durch Mutation induzierten Verschiebung der reaktiven Thiolregion weg von der Relayhelix und dem zentralen β -Faltblatt. Dadurch verliert die SH1/SH2-Region ihre Funktion in der energetischen Weiterleitung und in der Vermittlung konformationeller Veränderungen in der Myosin-Motordomäne, die entscheidend für die Bewegung des Hebelarms und für die Krafterzeugung sind.

4.2 *Dd* Myosin-2 Inhibitoren

Halogenierte Pseudiline sind potente Inhibitoren der Myosin-Motorfunktion. Während die Aktivität bestimmter Pseudiline für Klasse 1 und Klasse 5 Myosine im unteren mikromolaren Bereich ist, zeigen sie eine eher moderate Wirksamkeit auf Myosin-2 (im zehner bis hunderter μ M Bereich). Alle Pseudiline binden an die gleiche Bindungstasche, wobei aber die Art, wie sie binden, sich zu einem gewissen Maß unterscheidet. Auf der einen Seite ist diese Variation des Bindungsmodus' durch die Natur der unterschiedlichen Halogensubstituenten hervorgerufen, auf der anderen Seite repräsentieren die kristallographisch bestimmten Bindungspositionen die energetisch bevorzugten und somit dominanten Ensemble von Konformeren in der allosterischen Bindungstasche. Um diese Annahmen zu untersuchen wurden klassische MD Simulationen der Komplexe in Lösung durchgeführt. Über die Länge der Simulationen besetzten die nicht-methylierten halogenierten Pseudiline bevorzugt Konformationen mit zwei intakten Wasserstoffbrückenbindungen zur Myosin-Motordomäne. Demnach bilden sowohl die OH- als auch die NH-Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus, die wichtig für die Bindung sind. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der ATPase-Messungen unterstützt, da die inhibitorische Aktivität der Pseudiline deutlich reduziert ist, wenn entweder die OH- oder die NH-Gruppe methyliert ist. Trotzdem sind diese zwei interagierenden Gruppen nicht die einzigen Faktoren für die Affinitäteeigenschaften und Wirksamkeit, da die nicht-halogenierten Verbindungen **23** und **24** überhaupt keine Aktivität aufweisen. Die Frage stellt sich, was die erhöhte Wirksamkeit der bromierten Verbindungen über solche mit Chlorsubstituenten verursacht. Analyse der Eigenschaften der allosterischen Bindungstasche in *Dd* Myosin-2 deckte polare Bereiche auf, die an der Aufrechterhaltung der Wasserstoffbrücken zu den Inhibitoren beteiligt sind, sowie Cluster hydrophober Aminosäuren. Diese unpolaren Aminosäurereste interagieren über eine Vielzahl hydrophober Wechselwirkungen hauptsächlich mit den Halogenen der Pseudiline.

Da Brom weniger elektronegativer ist als Chlor und somit die C-Br-Bindung weniger polar als die C-Cl-Bindung, können stärkere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Bromsubstituenten und den aliphatischen und aromatischen Seitenketten des Proteins ausgebildet werden. Zusätzlich unterstützen die größeren Ausmaße der Bromatome die sterische Einnistung der Pseudiline in die Bindungstasche, wie in der Struktur des mit Verbindung **25** gebildeten Komplexes zu sehen ist (Abbildung 3.13). Die Verbindung zwischen der Polarität der allosterischen Bindungstasche, der Affinität und der biologischen Aktivität der Pseudiline mit unterschiedlichen Halogensubstituenten wirft die Frage nach der Interaktion halogener Pseudiline mit verschiedenen Myosinisoformen auf. Die Polarität der Pseudilin-Bindungstasche in den meisten Myosinen der Klasse 1 ist, durch die Anwesenheit einer höheren Anzahl an polaren und geladenen Aminosäuren, deutlich erhöht. Die inhibitorische Aktivität von Pentachlorpseudilin (**29**) gegenüber Klasse-1 Myosinen ist deutlich stärker, während **29** eine geringe hemmende Wirksamkeit gegen Myosin-2 und -5 besitzt. Im Gegensatz dazu weist Pentabrompseudilin (**25**) eine erhöhte inhibitorische Wirkung und Affinität auf Myosin-5, welches eine mehr hydrophobe allosterische Bindungsstelle besitzt, und ist weniger aktiv gegenüber Myosin-2 mit einer mäßig hydrophoben Tasche. Pseudilin **33** mit gemischter Halogensubstitution zeigt keine klar ausgeprägte Präferenz für irgendeine Myosinisoform (Abbildung 3.16). Diese Ergebnisse deuten darauf, dass chloresubstituierte Pseudiline potenter im Kontext von Myosinisoformen mit polaren allosterischen Bindungstaschen sind, wohingegen bromierte Pseudiline eine höhere Wirksamkeit im Kontext von hydrophoberen Bindungstaschen zeigen.

Während der Komplexbildung erfahren Liganden für gewöhnlich einen Verlust an Translations-, Rotations- und internen Freiheitsgraden. Der Verlust an internen konformationellen Freiheitsgraden der Pseudiline ist sehr gering, wie die Berechnung der Konfigurationsentropie durch Überlagerung der Inhibitorkoordinaten entlang der MD-Trajektorie ergab. Die Verwendung der Proteinatome für den Überlagerungsprozess erlaubt die Untersuchung der relativen Bewegungen des Liganden zum Protein und stellt somit einen direkten Zugang zur Beschreibung der Translationsentropie ($S_{Komplex}^{transl}(Protein)$) der Pseudiline im Protein dar. Die Werte der Translationsentropie sind erheblich höher, als die Konfigurationsentropien und deuten auf eine signifikante Mobilität der Pseudiline in der Proteintasche. Demzufolge weisen die Ergebnisse der MD-Simulationen darauf hin, dass die halogenierten Pseudiline einen Teil ihrer Mobilität beibehalten, während sie in der allosterischen Tasche gebunden sind und so einen positiven entropischen Beitrag zur freien Bindungsenergie ausmachen.

Die Art und Weise zu erfassen, wie diese kleinen Moleküle ihre hemmende Wirkung entfalten, stellt sich als recht schwierig heraus, da die Röntgenstrukturen der Komplexe keine größeren Unterschiede zueinander aufweisen. Das Binden der Inhibitoren induziert somit keine eindeutigen Umlagerungen von Proteindomänen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass die allosterische Inhibition durch halogenierte Pseudiline durch kombinierte Effekte von globalen Veränderungen der Proteindynamik und direkte Kommunikation zwischen dem katalytischen und allosterischen Zentrum über eine Kaskade

kleiner Konformationsänderungen herbeigeführt wird. Der direkte Signalrelaismechanismus wirkt über eine Distanz von $\sim 19 \text{ \AA}$ und beinhaltet mindestens 8 Aminosäuren und 2 Wassermoleküle (Abbildung 4.1).

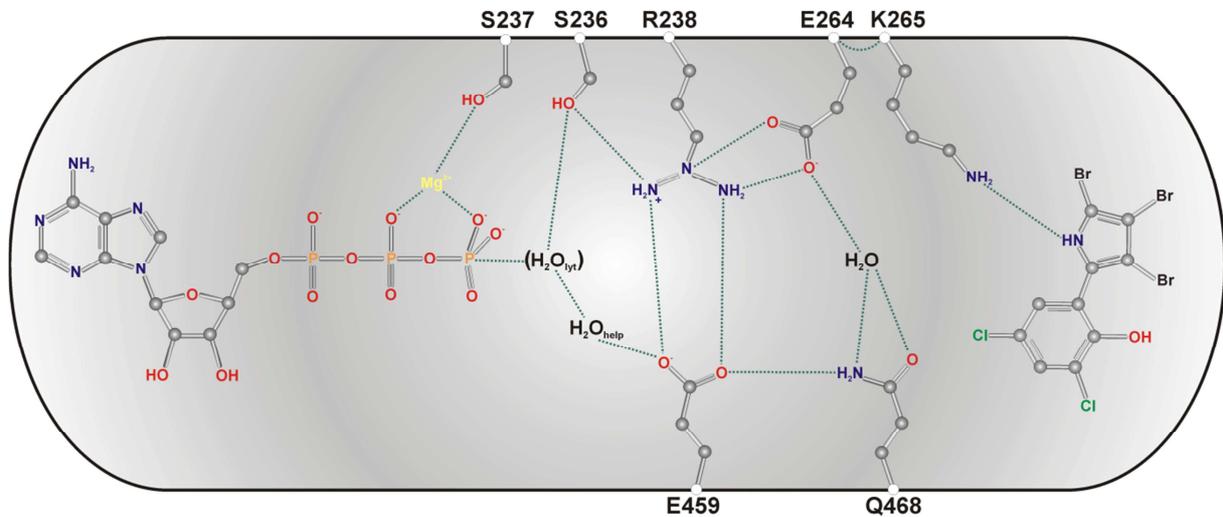


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des direkten Relaispfades, der die allosterische Bindungsstelle mit dem aktiven Zentrum über ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen verbindet. Die Abwesenheit des lytischen Wassers ($\text{H}_2\text{O}_{\text{lyt}}$) in den Inhibitor-gebundenen Strukturen ist durch Klammern angedeutet. Eine Wasserstoffbrücke zwischen Hauptkettenatomen der Aminosäuren Lys265 und Glu264 ist an der Kopplung der Liganden-induzierten Bewegung von Lys265 an den Rest des Relaisnetzwerkes beteiligt. Das Binden der halogenierten Pseudiline führt zu einer Reihe von Umlagerungen der Aminosäureseitenketten entlang des Pfades und schließlich zur Abwesenheit des lytischen Wassermoleküls.

Wie in den meisten Kristallstrukturen der Myosin-Motordomäne im *post-recovery stroke* Zustand, wurde auch in der Myosin-ADP- VO_3 -Struktur ohne gebundenen Inhibitor (PDB Code: 2JJ9) das lytische Wassermolekül ($\text{H}_2\text{O}_{\text{lyt}}$), welches hervorragend für einen *inline* Angriff auf das γ -Phosphat-Mimikry des Nucleotidanalogs positioniert ist, in der entsprechenden Position vorgefunden. Hingegen ist dieses kritische Wassermolekül in keiner der Komplexstrukturen mit gebundenem Pseudilin erhalten (Abbildung 4.2). Die Abwesenheit des lytischen Wassers ist eine Konsequenz von Umlagerungen in Proteinseitenkettenorientierungen entlang des allosterischen Pfades, der durch das Binden des halogenierten Pseudilins an die Myosin-Motordomäne eingeleitet wird. Lys265 kann dabei als Ausgangspunkt des direkten Relaismechanismus' angesehen werden. In jeder der fünf verglichenen Röntgenstrukturen ist Lys265 unterschiedlich positioniert und wechselwirkt entweder mit der Hydroxygruppe der halogenierten Pseudiline (Verbindungen **25** und **29**), oder der Aminogruppe des Pyrrolrings (Verbindung **33**). Weitere hervorstechende Veränderungen entlang des Relaispfades beinhalten eine leichte Umlagerung in der Seitenkettenorientierung von Glu264, verbunden mit einer Verschiebung oder der vollständigen Abwesenheit des gebundenen Wassermoleküls weg von den interagierenden Aminosäureresten (Glu264 und Gln468), sowie eine Bewegung der Aminosäuren Arg238 und Glu459 der für das Myosin kritischen Salzbrücke weg voneinander. Globale Kommunikation scheint vorrangig in einigen der Oberflächenschleifen aufzutreten, aber bezieht auch starrere Teile der Motordomäne, wie das zentrale β -Faltblatt und

angrenzende Helices, mit ein. B-Faktor-Analyse der Röntgenstrukturen deuten auf eine Korrelation zwischen der inhibitorischen Aktivität der halogenierten Pseudiline und dem Ausmaß, mit dem deren Bindung eine globale Reduzierung der Proteindynamik hervorruft. Solch eine Erniedrigung der Proteinflexibilität könnte mit den für die Motoraktivität notwendigen Veränderungen des Proteins interferieren. Die Berechnung der Proteinfuktuationen mittels RMSF-Werte aus den MD-Trajektorien gibt weitere Hinweise auf eine Herabsetzung der Proteinflexibilität durch die Bindung der halogenierten Pseudiline.

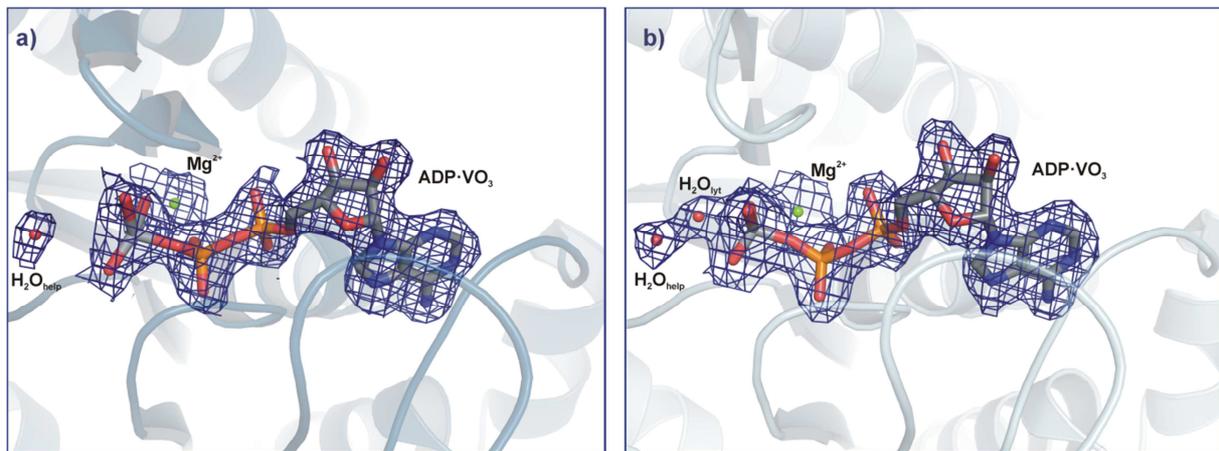


Abbildung 4.2: Ausschnitte der $2F_o-F_c$ Elektronendichtekarten des aktiven Zentrums in *Dd* Myosin-2. **(A)** Die Abwesenheit des lytischen Wassers ist eine Folge der Inhibitor-induzierten Veränderungen entlang des allosterischen Relaispfades. **(B)** In den Strukturen ohne gebundenen Inhibitor ist das lytische Wasser im aktiven Zentrum gebunden.

Im Gegensatz dazu, ist das lytische Wassermolekül im aktiven Zentrum der Myosin-Prodan-Struktur erhalten, obwohl Prodan (**35**) an die gleiche Bindungstasche bindet. Wie aus den Untersuchungen zu den halogenierten Pseudilinen eindeutig hervorgeht, besteht eine nachweisliche Kommunikation und allosterische Beeinflussung des aktiven Zentrums und dieser abgelegenen Bindungstasche. Dieser Umstand liefert eine Erklärung für die Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften des an Myosin gebundenen Prodans während der Hydrolysereaktion. Im Unterschied zu den halogenierten Pseudilinen, interagiert Prodan allerdings nicht mit Lys265 und besitzt deshalb wahrscheinlich keinen inhibitorischen Effekt auf die ATPase-Funktion von Myosin. In Übereinstimmung damit, ist das lytische Wassermolekül im aktiven Zentrum, das als Ergebnis von Konformationsänderungen der Aminosäuren entlang des Relaispfades in den Strukturen der halogenierten Pseudiline nicht vorzufinden war (Abbildung 4.1), in der Myosin-Prodan-Komplexstruktur erhalten (Abbildung 3.22C). Die Seitenketten der Aminosäuren entlang des allosterischen Relaispfades liegen in der Prodan-gebundenen und -ungebundenen Struktur fast identisch vor und zeigen so gut wie keine konformationelle Abweichungen zueinander. Des Weiteren zeigt die Analyse der kristallographischen B-Faktoren keine Beeinflussung der Proteinflexibilität durch die Bindung an Myosin (Abbildung 3.24). Prodan (**35**) bindet demzufolge zwar an die gleiche Tasche, wie die halogenierten Pseudiline, besitzt aber keinen inhibitorischen Effekt auf die Myosinfunktion, da es weder mit den Aminosäureresten des Relaispfades interagiert, noch einen Effekt auf die Proteindynamik ausüben kann.

4.3 Der Ca²⁺-Sensitizer EMD57033

Inotrope Ca²⁺-Sensitizer werden zur Behandlung von Herzinsuffizienz verwendet, da sie die Kontraktilität des Herzmuskels positiv fördern. Der Klasse 3 Ca²⁺-Sensitizer EMD 57033 (**36**) zeigt dabei nachweislich eine direkte Wirkung auf das kardiale Aktomyosinsystem.^{171,184,198} EMD 57033 stimuliert die enzymatische ATPase-Funktion und erhöht die aktive Steifheit der Myosinmotoren um bis zu 10 %. Dennoch ist diese Aktivität nicht ausreichend, um den durch EMD 57033 hervorgerufenen Anstieg der erzeugten Kraft der einzelnen Motorproteine um mehr als 50 % zu erklären. Auf Basis von früheren Studien an isolierten Muskelfasern wurde daher postuliert, dass EMD 57033 die Spannung einzelner Myosine in den krafterzeugenden Zuständen entlang des chemomechanischen Zyklus erhöht, was zu einem Anstieg der aktiven Kraft führt.¹⁸⁴

Um diese Hypothese zu untersuchen und den Bindungsmodus von EMD 57033 an die Myosin-Motordomäne zu bestimmen, wurde die Kristallstruktur von *Dd* Myosin-2 im *post-recovery stroke* Zustand in Anwesenheit von ADP-VO₃ und EMD 57033 bis zu einer Auflösung von 2,7 Å gelöst. Dabei wurde nur eine partielle Elektronendichte für den Liganden aufgefunden, die das Thiadiazinon-Derivat **36** nicht vollständig darstellt. Aus diesem Grund konnte der exakte Bindungsmodus nicht zuverlässig bestimmt werden. Allerdings definiert die erhaltene Elektronendichte den Liganden ausreichend, dass die wahrscheinliche Bindungsstelle in der Myosin-Motordomäne identifiziert werden konnte. EMD 57033 bindet in einer relativ hydrophoben Bindungsstelle in der N-terminalen Domäne des Myosins und interagiert höchstwahrscheinlich mit dem N-terminalen β-Fass. Diese Position stellt eine neue, bisher nicht bekannte allosterische Bindungsstelle in der Myosin-Motordomäne dar. Aufgrund der unvollständigen Besetzung im Kristall und der damit verbundenen schlechten Elektronendichte, können keine zuverlässigen Aussagen über die exakten Wechselwirkungen zwischen EMD 57033 und dem Myosin getroffen werden. Weiterführende strukturelle Studien werden benötigt, um den genauen Bindungsmodus eindeutig beschreiben zu können und die Bindungsstelle zu verifizieren. Dennoch geben die in dieser Arbeit gezeigten kristallographischen Untersuchungen erste Hinweise auf die neue Bindungsstelle von EMD 57033 in der N-terminalen Domäne des Myosins.

Weitere Hinweise auf die neu entdeckte Bindungsstelle ergaben *in silico* Dockingstudien von EMD 57033 an die Motordomäne des humanen β-kardialen Myosins. Die Bindungsposition mit der höchsten Affinität und damit die bevorzugteste Position, wurde ebenfalls in der N-terminalen Domäne des Proteins vorgefunden. Im Vergleich zur kristallographisch bestimmten Bindungsposition ist die *in silico* identifizierte Bindungsstelle etwa 10 Å in Richtung der U50 kDa Domäne verschoben. Diese Verschiebung kann zum einen durch die Unterschiede der verwendeten Myosinisoforamen begründet sein, oder im Rahmen der Ungenauigkeit der Methode liegen. Andererseits liegen die Myosine auch in verschiedenen Zuständen vor. Während die Kristallstruktur das Myosin eindeutig im *post-recovery stroke* Zustand zeigt, in dem sich der Hebelarm in der *up* Position befindet, wurde das Modell des *Hs* β-kardialen Myosins im *post-rigor* Zustand erstellt, bei dem der Hebelarm in der *down* Position steht (Abbildung 3.21A). Das bedeutet, die beiden Strukturen entsprechen

Zuständen des Myosins vor und nach der Hebelarmbewegung und Krafterzeugung. Während der Krafterzeugung findet eine Reihe von Umlagerungen in der Myosin-Motordomäne statt (vergleiche Kapitel 1.1), wodurch letztendlich der Konverter zusammen mit dem Hebelarm eine Rotationsbewegung um etwa 60° vollführen. Die Konformationsänderungen beinhalten auch die koordinierte Verschiebung der N-terminalen Domäne, wie eindeutig in Abbildung 3.21 zu erkennen ist. EMD 57033 scheint genau in dem Grenzgebiet zu binden, das durch die Rotationsbewegung des Hebelarms direkt beeinflusst wird. Die Bindung von EMD 57033 könnte demzufolge eine stabilisierende Wirkung auf die N-terminale Domäne und die Rotation des Hebelarms haben und so die Spannung in dem Myosinmotor während des Kraftschlags erhöhen.

4.4 *De Novo* Entwicklung antiparasitärer Myosininhibitoren

Die rationale, strukturbasierte Entwicklung neuer allosterischer Inhibitoren der *Pf* Myosin A Motorfunktion ergab Verbindungen, die die Myosinfunktion effektiv inhibieren und eine antiparasitäre Wirkung besitzen. Dazu wurden auf Basis gelöster Röntgenkristallstrukturen von *Dd* Myosin-2 Modelle des strukturell bisher unbekanntem parasitären *Pf* Myosin A erstellt und mit Hilfe der Analyse verschiedener Myosineffektoren potentielle Zielbereiche in der Motordomäne der Molekularen Motoren definiert. Die allosterische Bindungstasche an der Spitze des 50 kDa Spaltes in der Myosin-Motordomäne wurde *in silico* auf ihre Eigenschaften untersucht und für das Design neuer Inhibitoren verwendet. Dabei wurden sowohl Informationen über die Wechselwirkungseigenschaften, als auch über Sterik und Elektrostatik der Bindungstasche mit in die Entwicklung der neuen Inhibitoren miteinbezogen. Aus der erzeugten und durch Molekulares Docking getesteten Substanzbibliothek potentieller Hemmstoffe, wurden die funktionalisierten Biphenyle als vielversprechende Verbindungen für die weiteren Studien ausgewählt und durch eine biomimetische, eisenvermittelte, oxidative Phenolkupplung und anschließender Derivatisierung synthetisch dargestellt. Untersuchungen zur inhibitorischen Aktivität der synthetisierten Verbindungen auf die enzymatische ATPase-Funktion von Myosin wurden durch kinetische Messungen im Fließgleichgewicht bei variierender Inhibitorkonzentration durchgeführt und zeigten Inhibition im niederen mikromolaren Bereich. Zudem besitzen die Verbindungen die Fähigkeit die Motorfunktion von Myosinen in *in vitro* Motilitätsuntersuchungen zu hemmen. Die Verbindungen wurden gegen drei verschiedene Myosinisoformen unterschiedlicher Klassen geprüft und besitzen deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit gegen die unterschiedlichen Isoformen. Inhibitor **8** wies dabei die höchste Aktivität gegen das Modellsystem *Dd* Myosin-1b auf. Um eine mögliche Antimalariawirkung, bzw. antiparasitäre Aktivität der neuen Myosininhibitoren nachzuweisen, wurden die Effekte von drei ausgewählten Substanzen auf die Leber- und Blutstadien des Malaria Parasiten *Plasmodium falciparum* getestet. Verbindung **6** ergab dabei einen IC₅₀ von etwa 6 µM zu Unterdrückung des Merozoitenwachstums in infizierten, menschlichen Blutproben und bildet damit eine interessante Leitstruktur zur Weiterentwicklung zu Antimalaria-Wirkstoffen. Auch die charakteristische Gleitbewegung der parasitären Sporozoiten wurde

durch Verbindung **6** deutlich gehemmt. Die geringe Löslichkeit der Verbindungen in den Testmedien und den Blutproben limitiert allerdings die Anwendbarkeit der Substanzen als Leitstrukturen und muss in weiterführenden Optimierungen und Arbeiten durch Einführen polarer Gruppen in die chemische Struktur verbessert werden. Ebenso ist die maximal erhaltene Aktivität im niederen mikromolaren Bereich noch nicht ausreichend um als spezifische Wirkstoffe agieren zu können.

Die strukturelle Analyse der gelösten Kristallstruktur von *Dd* Myosin-2 im Komplex mit Verbindung **3** offenbarte die Bindungsposition und den Bindungsmodus der Substanzen an die allosterische Bindungstasche. Dabei wurden Abweichungen zu dem in *Pf* Myosin A erwarteten Bindungsmodus beobachtet. Diese Veränderte Position könnte durch die unterschiedliche Natur der Bindungstaschen in Myosin-2 und Myosin A hervorgerufen sein, oder grundsätzlich eine bevorzugte Position der Biphenylinhibitoren darstellen, die für die Weiterentwicklung der gefundenen Inhibitoren dienen kann. Zudem werden sowohl bei der kristallographisch bestimmten Bindungskonformation, als auch der durch den Entwicklungsprozess definierten Position, der in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen, eine beachtliche Anzahl an möglichen Interaktionsbereichen in der Bindungstasche nicht optimal ausgenutzt. Weiterführende Studien zu Optimierung der Substanzen sollten die durch die Bindungstasche definierten Wechselwirkungseigenschaften besser und umfangreichen ausnutzen. Um dies zu erreichen ist die Darstellung asymmetrischer Inhibitoren unerlässlich, die im Gegensatz zu den in dieser Arbeit entwickelten symmetrischen Inhibitoren unterschiedliche Funktionalisierungen und Substitutionen an den beiden aromatischen Ringen des Biphenylgrundkörpers besitzen. Eine weitere Einschränkung, die während der Synthese und Entwicklung der Biphenylinhibitoren vernachlässigt wurde, betrifft die Stereochemie der Substanzen. Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Biphenylverbindungen wurden nicht enantiomerenrein verwendet oder hergestellt. Da es sich bei den entwickelten Myosininhibitoren um Biphenyle mit ortho-Substituenten handelt, ist die Drehbarkeit der Phenolringe zueinander eingeschränkt und es tritt axiale Chiralität auf. Das bedeutet, dass zwei Enantiomere, bzw. Atropisomere vorliegen, die, im Falle, dass ihre Rotationsbarriere energetisch hoch genug liegt, synthetisch in ihren reinen Formen dargestellt werden können. Im Hinblick auf die Verwendbarkeit der Substanzen für therapeutische oder zellbiologische Anwendungen ist die enantiomerenreine Benutzung von äußerster Wichtigkeit, da die beiden Enantiomere sich deutlich in Wirkung und Verhalten in der chiralen Umgebung eines Proteins unterscheiden können.

Insgesamt konnte die erfolgreiche Anwendung der rationalen, strukturbasierten *de novo* Entwicklung neuer Myosininhibitoren nachgewiesen werden. Die Verbindungen sind zur Hemmung der Myosinfunktion an isolierten Proteinen, als auch zur Reduzierung des Parasitenwachstums und der Motilität von Malariaparasiten befähigt. Die vorliegenden Studien belegen die Einsetzbarkeit und Stärke eines rationalen, strukturbasierten Entwicklungsprozesses zur Erzeugung neuartiger Substanzen mit spezifischen Eigenschaften und Wirkmechanismen und bieten den Ansatz zur Entwicklung neuer Antimalaria-Wirkstoffe auf Basis der Inhibierung der parasitären Bewegungsmechanik. Dieser Ansatz unterscheidet sich deutlich von den bisherigen Wirkmechanismen eingesetzter Antimalaria-

Wirkstoffe, um nicht von vorherrschenden Resistenzen in den Parasitenstämmen beeinträchtigt zu werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*, (Garland Publishing, 1994).
2. Kühne, W. Untersuchungen über Bewegung und Veränderung der kontraktilen Substanzen. *Arch. f. Anat. Physiol. u. wissenschaft. Med.*, 564-642, 748-835 (1859).
3. Pollard, T.D. & Korn, E.D. *Acanthamoeba* myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **248**, 4682-4690 (1973).
4. Hodge, T. & Cope, M.J. A myosin family tree. *J. Cell Sci.* **113 Pt 19**, 3353-3354 (2000).
5. Foth, B.J., Goedecke, M.C. & Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 3681-3686 (2006).
6. Titus, M.A. Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 77-81 (1993).
7. Donaudy, F. et al. Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1571-1577 (2003).
8. Lalwani, A.K. et al. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 1121-1128 (2000).
9. Donaudy, F. et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 770-776 (2004).
10. Walsh, T. et al. From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 7518-7523 (2002).
11. Melchionda, S. et al. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 635-640 (2001).
12. Tamagawa, Y. et al. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 849-852 (1996).
13. Weil, D. et al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat. Genet.* **16**, 191-193 (1997).
14. Wang, A. et al. Association of unconventional myosin MYO15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* **280**, 1447-1451 (1998).
15. Petit, C. Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 271-297 (2001).
16. Heath, K.E. et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 1033-1045 (2001).
17. Seidman, J.G. & Seidman, C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* **104**, 557-567 (2001).
18. Roberts, R. & Sigwart, U. New concepts in hypertrophic cardiomyopathies, part II. *Circulation* **104**, 2249-2252 (2001).
19. Pastural, E. et al. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.* **16**, 289-292 (1997).
20. Betapudi, V., Licate, L.S. & Egelhoff, T.T. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res* **66**, 4725-4733 (2006).
21. Fujita-Becker, S. et al. Functional characterization of the N-terminal region of myosin-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 36102-36109 (2006).
22. Kull, F.J., Vale, R.D. & Fletterick, R.J. The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **19**, 877-886 (1998).

23. Lymn, R.W. & Taylor, E.W. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617-4624 (1971).
24. Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F.J., Jahn, W. & Schröder, R.R. Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**, 423-427 (2003).
25. Rayment, I. et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65 (1993).
26. Volkmann, N. et al. Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1147-1155 (2000).
27. Schröder, R.R. et al. Three-dimensional atomic model of F-actin decorated with *Dictyostelium* myosin S1. *Nature* **364**, 171-174 (1993).
28. Yengo, C.M., De La Cruz, E.M., Chrin, L.R., Gaffney, D.P., 2nd & Berger, C.L. Actin-induced closure of the actin-binding cleft of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **277**, 24114-24119 (2002).
29. Conibear, P.B., Bagshaw, C.R., Fajer, P.G., Kovács, M. & Málnási-Csizmadia, A. Myosin cleft movement and its coupling to actomyosin dissociation. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 831-835 (2003).
30. Fajer, M.I., Li, H., Yang, W. & Fajer, P.G. Mapping electron paramagnetic resonance spin label conformations by the simulated scaling method. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13840-13846 (2007).
31. Korman, V.L., Anderson, S.E., Prochniewicz, E., Titus, M.A. & Thomas, D.D. Structural dynamics of the actin-myosin interface by site-directed spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **356**, 1107-1117 (2006).
32. Reubold, T.F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F.J. & Manstein, D.J. A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 826-830 (2003).
33. Coureux, P.D. et al. A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature* **425**, 419-423 (2003).
34. Yang, Y. et al. Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor. *Structure* **15**, 553-564 (2007).
35. Yount, R.G., Lawson, D. & Rayment, I. Is myosin a "back door" enzyme? *Biophys. J.* **68**, 44S-47S; discussion 47S-49S (1995).
36. Oiwa, K. & Manstein, D.J. How linear motor proteins work. *Lect. Notes Phys.* **711**, 41-63 (2007).
37. Geeves, M.A. & Holmes, K.C. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728 (1999).
38. Webb, M.R., Grubmeyer, C., Penefsky, H.S. & Trentham, D.R. The stereochemical course of phosphoric residue transfer catalyzed by beef heart mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* **255**, 11637-11639 (1980).
39. Webb, M.R. & Trentham, D.R. The mechanism of ATP hydrolysis catalyzed by myosin and actomyosin, using rapid reaction techniques to study oxygen exchange. *J. Biol. Chem.* **256**, 10910-10916 (1981).
40. Sartorelli, L., Fromm, H.J., Benson, R.W. & Boyer, P.D. Direct and ¹⁸O-exchange measurements relevant to possible activated or phosphorylated states of myosin. *Biochemistry* **5**, 2877-2884 (1966).
41. Fisher, A.J. et al. X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP.BeF_x and MgADP.AIF₄. *Biochemistry* **34**, 8960-8972 (1995).
42. Rayment, I. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15850-15853 (1996).
43. Kagawa, H. & Mori, K. Molecular orbital study of the interaction between MgATP and the myosin motor domain: the highest occupied molecular orbitals indicate the reaction site of ATP hydrolysis. *J. Phys. Chem. B* **103**, 7346-7352 (1999).
44. Minehardt, T.J. et al. A classical and ab initio study of the interaction of the myosin triphosphate binding domain with ATP. *Biophys. J.* **82**, 660-675 (2002).
45. Onishi, H., Mochizuki, N. & Morales, M.F. On the myosin catalysis of ATP hydrolysis. *Biochemistry* **43**, 3757-3763 (2004).

46. Vale, R.D. & Milligan, R.A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**, 88-95 (2000).
47. Bustamante, C., Keller, D. & Oster, G. The physics of molecular motors. *Acc. Chem. Res.* **34**, 412-420 (2001).
48. Schliwa, M. *Molecular Motors*, (Wiley-VCH, Germany, 2003).
49. Fischer, S., Windshugel, B., Horak, D., Holmes, K.C. & Smith, J.C. Structural mechanism of the recovery stroke in the myosin molecular motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 6873-6878 (2005).
50. Koppole, S., Smith, J.C. & Fischer, S. The structural coupling between ATPase activation and recovery stroke in the myosin II motor. *Structure* **15**, 825-837 (2007).
51. Yu, H., Ma, L., Yang, Y. & Cui, Q. Mechanochemical coupling in the myosin motor domain. I. Insights from equilibrium active-site simulations. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e21 (2007).
52. Yu, H., Ma, L., Yang, Y. & Cui, Q. Mechanochemical coupling in the myosin motor domain. II. Analysis of critical residues. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e23 (2007).
53. Goodey, N.M. & Benkovic, S.J. Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 474-482 (2008).
54. Tsai, C.J., del Sol, A. & Nussinov, R. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play. *J. Mol. Biol.* **378**, 1-11 (2008).
55. Cui, Q. & Karplus, M. Allostery and cooperativity revisited. *Protein Sci.* **17**, 1295-1307 (2008).
56. Laskowski, R.A., Gerick, F. & Thornton, J.M. The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Lett.* **583**, 1692-1698 (2009).
57. Higuchi, H. & Takemori, S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* **105**, 638-643 (1989).
58. McKillop, D.F., Fortune, N.S., Ranatunga, K.W. & Geeves, M.A. The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**, 309-318 (1994).
59. Herrmann, C., Wray, J., Travers, F. & Barman, T. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* **31**, 12227-12232 (1992).
60. Wilson, I.B. & Ginsburg, B. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 168-170 (1955).
61. Stapleton, M.T., Fuchsbaue, C.M. & Allshire, A.P. BDM drives protein dephosphorylation and inhibits adenine nucleotide exchange in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* **275**, H1260-1266 (1998).
62. Schlichter, L.C., Pahapill, P.A. & Chung, I. Dual action of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on K⁺ current in human T lymphocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 438-446 (1992).
63. Lopatin, A.N. & Nichols, C.G. Block of delayed rectifier (DRK1) K⁺ channels by internal 2,3-butanedione monoxime in *Xenopus* oocytes. *Receptors Channels* **1**, 279-286 (1993).
64. Ferreira, G., Artigas, P., Pizarro, G. & Brum, G. Butanedione monoxime promotes voltage-dependent inactivation of L-type calcium channels in heart. Effects on gating currents. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 777-787 (1997).
65. Siegman, M.J. et al. Comparison of the effects of 2,3-butanedione monoxime on force production, myosin light chain phosphorylation and chemical energy usage in intact and permeabilized smooth and skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**, 457-472 (1994).
66. Ostap, E.M. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 305-308 (2002).
67. Cheung, A. et al. A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat. Cell Biol.* **4**, 83-88 (2002).
68. Trybus, K.M., Waller, G.S. & Chatman, T.A. Coupling of ATPase activity and motility in smooth muscle myosin is mediated by the regulatory light chain. *J. Cell Biol.* **124**, 963-969 (1994).
69. Yang, Z. & Sweeney, H.L. Restoration of phosphorylation-dependent regulation to the skeletal muscle myosin regulatory light chain. *J. Biol. Chem.* **270**, 24646-24649 (1995).

70. Patel, H., Margossian, S.S. & Chantler, P.D. Locking regulatory myosin in the off-state with trifluoperazine. *J. Biol. Chem.* **275**, 4880-4888 (2000).
71. Sellers, J.R., Wang, F. & Chantler, P.D. Trifluoperazine inhibits the MgATPase activity and in vitro motility of conventional and unconventional myosins. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**, 579-585 (2003).
72. Straight, A.F. et al. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299**, 1743-7 (2003).
73. Limouze, J., Straight, A.F., Mitchison, T. & Sellers, J.R. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **25**, 337-341 (2004).
74. Allingham, J.S., Smith, R. & Rayment, I. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 378-379 (2005).
75. Kovács, M., Toth, J., Hetenyi, C., Málnási-Csizmadia, A. & Sellers, J.R. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* **279**, 35557-35563 (2004).
76. Ramamurthy, B., Yengo, C.M., Straight, A.F., Mitchison, T.J. & Sweeney, H.L. Kinetic mechanism of blebbistatin inhibition of nonmuscle myosin IIb. *Biochemistry* **43**, 14832-14839 (2004).
77. Pain, A. et al. The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* **455**, 799-803 (2008).
78. Cox-Singh, J. et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 165-171 (2008).
79. White, N.J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 172-173 (2008).
80. Ménard, R. Medicine: knockout malaria vaccine? *Nature* **433**, 113-114 (2005).
81. Morrissette, N.S. & Sibley, L.D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 21-38 (2002).
82. Hakansson, S., Morisaki, H., Heuser, J. & Sibley, L.D. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3539-3547 (1999).
83. Keeley, A. & Soldati, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* **14**, 528-532 (2004).
84. Sultan, A.A. et al. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell* **90**, 511-522 (1997).
85. Kappe, S. et al. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J. Cell Biol.* **147**, 937-944 (1999).
86. Dobrowolski, J.M., Niesman, I.R. & Sibley, L.D. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil. Cytoskeleton* **37**, 253-262 (1997).
87. Pinder, J.C. et al. Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: implications for red cell invasion. *J. Cell Sci.* **111**, 1831-1839 (1998).
88. Schmitz, S. et al. Malaria parasite actin filaments are very short. *J. Mol. Biol.* **349**, 113-125 (2005).
89. Schuler, H., Mueller, A.K. & Matuschewski, K. Unusual properties of *Plasmodium falciparum* actin: new insights into microfilament dynamics of apicomplexan parasites. *FEBS Lett.* **579**, 655-660 (2005).
90. Sahoo, N., Beatty, W., Heuser, J., Sept, D. & Sibley, L.D. Unusual kinetic and structural properties control rapid assembly and turnover of actin in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 895-906 (2006).
91. Fréchal, K. & Soldati-Favre, D. Role of the parasite and host cytoskeleton in apicomplexan parasitism. *Cell Host Microbe* **5**, 602-611 (2009).
92. Cowman, A.F. & Crabb, B.S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-766 (2006).

93. Bosch, J. et al. Structure of the MTIP-MyoA complex, a key component of the malaria parasite invasion motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4852-4857 (2006).
94. Wiesner, J., Ortmann, R., Jomaa, H. & Schlitzer, M. New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 5274-5293 (2003).
95. Schlitzer, M. Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline. *Arch. Pharm.* **341**, 149-163 (2008).
96. O'Neill, P.M. et al. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 479-507 (2006).
97. Schlitzer, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem* **2**, 944-986 (2007).
98. Famin, O. & Ginsburg, H. Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 393-398 (2002).
99. Vaidya, A.B. Mitochondrial and plastid functions as antimalarial drug targets. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **4**, 11-23 (2004).
100. Kessl, J.J. et al. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 31312-31318 (2003).
101. Posner, G.H. & O'Neill, P.M. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Acc. Chem. Res.* **37**, 397-404 (2004).
102. Haynes, R.K. & Krishna, S. Artemisinins: activities and actions. *Microbes Infect.* **6**, 1339-1346 (2004).
103. Krishna, S., Uhlemann, A.C. & Haynes, R.K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist. Updat.* **7**, 233-244 (2004).
104. O'Neill, P.M. & Posner, G.H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J. Med. Chem.* **47**, 2945-2964 (2004).
105. Eckstein-Ludwig, U. et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **424**, 957-961 (2003).
106. Dahl, E.L. et al. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3124-3131 (2006).
107. Goodman, C.D., Su, V. & McFadden, G.I. The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152**, 181-191 (2007).
108. Manstein, D.J., Ruppel, K.M. & Spudich, J.A. Expression and characterization of a functional myosin head fragment in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **246**, 656-658 (1989).
109. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
110. Fedorov, R., Witte, G., Urbanke, C., Manstein, D.J. & Curth, U. 3D structure of *Thermus aquaticus* single-stranded DNA-binding protein gives insight into the functioning of SSB proteins. *Nucleic. Acids Res.* **34**, 6708-6717 (2006).
111. Lehrer, S.S. & Kerwar, G. Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry* **11**, 1211-1217 (1972).
112. Chai, C. & Armarego, W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, (Butterworth-Heinemann, 2003).
113. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920 (2000).
114. Harms, J. et al. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679-688 (2001).
115. Schuwirth, B.S. et al. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**, 827-834 (2005).
116. Filman, D.J. et al. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* **8**, 1567-1579 (1989).

117. Kaufmann, B., Simpson, A.A. & Rossmann, M.G. The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11628-11633 (2004).
118. Reddy, V.S., Natchiar, S.K., Stewart, P.L. & Nemerow, G.R. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science* **329**, 1071-1075 (2010).
119. Garman, E.F. & Schneider, T.R. Macromolecular Cryocrystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237 (1997).
120. Rodgers, D.W. Cryocrystallography. *Structure* **2**, 1135-1140 (1994).
121. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800 (1993).
122. Brunger, A.T. et al. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921 (1998).
123. Brunger, A.T. Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nat. Protoc.* **2**, 2728-2733 (2007).
124. Adams, P.D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213-221 (2010).
125. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501 (2010).
126. Berman, H.M. et al. The Protein Data Bank. *Nucleic. Acids Res.* **28**, 235-242 (2000).
127. Navaza, J. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163 (1994).
128. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240-255 (1997).
129. Trentham, D.R., Bardsley, R.G., Eccleston, J.F. & Weeds, A.G. Elementary processes of the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase activity of heavy meromyosin. A transient kinetic approach to the study of kinases and adenosine triphosphatases and a colorimetric inorganic phosphate assay *in situ*. *Biochem J* **126**, 635-644 (1972).
130. Furch, M., Geeves, M.A. & Manstein, D.J. Modulation of actin affinity and actomyosin adenosine triphosphatase by charge changes in the myosin motor domain. *Biochemistry* **37**, 6317-6326 (1998).
131. Kron, S.J. & Spudich, J.A. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6272-6276 (1986).
132. Anson, M., Geeves, M.A., Kurzawa, S.E. & Manstein, D.J. Myosin motors with artificial lever arms. *EMBO J.* **15**, 6069-6074 (1996).
133. Hubbard, T.J. & Blundell, T.L. Comparison of solvent-inaccessible cores of homologous proteins: definitions useful for protein modelling. *Protein Eng.* **1**, 159-171 (1987).
134. Lesk, A.M. & Chothia, C.H. The Response of Protein Structures to Amino-Acid Sequence Changes. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond.* **317**, 345-356 (1986).
135. Šali, A. & Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815 (1993).
136. Cornell, W.D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179-5197 (1995).
137. Morris, G.M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comp. Chem.* **19**, 1639-1662 (1998).
138. Huey, R., Morris, G.M., Olson, A.J. & Goodsell, D.S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comp. Chem.* **28**, 1145-1152 (2007).
139. Born, M. & R., O. Quantum theory of molecules. *Ann. d. Physik* **84**, 427-484 (1927).
140. Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S. & Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225-11236 (1996).
141. Hockney, R.W., Goel, S.P. & Eastwood, J. Quiet highresolution computer models of a plasma. *J. Comp. Phys.* **14**, 148-158 (1974).

142. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435-447 (2008).
143. Dalbey, R.E., Weiel, J. & Yount, R.G. Forster energy transfer measurements of thiol 1 to thiol 2 distances in myosin subfragment 1. *Biochemistry* **22**, 4696-4706 (1983).
144. Titus, M.A., Ashiba, G. & Szent-Gyorgyi, A.G. SH-1 modification of rabbit myosin interferes with calcium regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **10**, 25-33 (1989).
145. DeLozanne, A., Lewis, M., Spudich, J.A. & Leinwand, L.A. Cloning and characterization of a nonmuscle myosin heavy chain cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6807-6810 (1985).
146. Huston, E.E., Grammer, J.C. & Yount, R.G. Flexibility of the myosin heavy chain: direct evidence that the region containing SH1 and SH2 can move 10 Å under the influence of nucleotide binding. *Biochemistry* **27**, 8945-8952 (1988).
147. Batra, R., Geeves, M.A. & Manstein, D.J. Kinetic analysis of *Dictyostelium discoideum* myosin motor domains with glycine-to-alanine mutations in the reactive thiol region. *Biochemistry* **38**, 6126-6134 (1999).
148. Giese, K.C. & Spudich, J.A. Phenotypically selected mutations in myosin's actin binding domain demonstrate intermolecular contacts important for motor function. *Biochemistry* **36**, 8465-8473 (1997).
149. Patterson, B. & Spudich, J.A. A novel positive selection for identifying cold-sensitive myosin II mutants in *Dictyostelium*. *Genetics* **140**, 505-515 (1995).
150. Uyeda, T.Q., Tokuraku, K., Kaseda, K., Webb, M.R. & Patterson, B. Evidence for a novel, strongly bound acto-S1 complex carrying ADP and phosphate stabilized in the G680V mutant of *Dictyostelium* myosin II. *Biochemistry* **41**, 9525-9534 (2002).
151. Kinose, F., Wang, S.X., Kidambi, U.S., Moncman, C.L. & Winkelmann, D.A. Glycine 699 is pivotal for the motor activity of skeletal muscle myosin. *J. Cell Biol.* **134**, 895-909 (1996).
152. Patterson, B., Ruppel, K.M., Wu, Y. & Spudich, J.A. Cold-sensitive mutants G680V and G691C of *Dictyostelium* myosin II confer dramatically different biochemical defects. *J. Biol. Chem.* **272**, 27612-27617 (1997).
153. Patterson, B. & Spudich, J.A. Cold-sensitive mutations of *Dictyostelium* myosin heavy chain highlight functional domains of the myosin motor. *Genetics* **143**, 801-810 (1996).
154. Gulick, A.M., Bauer, C.B., Thoden, J.B. & Rayment, I. X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain. *Biochemistry* **36**, 11619-11628 (1997).
155. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W. & Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935 (1983).
156. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089-10092 (1993).
157. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. & Fraaije, J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* **18**, 1463-1472 (1997).
158. Ohri, R.V. et al. A Re(V)-catalyzed C-N bond-forming route to human lipoxygenase inhibitors. *Org. Lett.* **7**, 2501-2504 (2005).
159. Burkholder, P.R., Pfister, R.M. & Leitz, F.H. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl. Microbiol.* **14**, 649-653 (1966).
160. Laatsch, H. et al. Structure-activity relationships of phenyl- and benzoylpyrroles. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 537-546 (1995).
161. Hanessian, S. & Kaltenbronn, J.S. Synthesis of a Bromine-Rich Marine Antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4509-4510 (1966).
162. Laatsch, H. & Pudleiner, H. Marine Bakterien, I. Synthese von Pentabrompseudilin, einem cytotoxischen Phenylpyrrol aus *Alteromonas luteo-violaceus*. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 863-881 (1989).
163. Xu, Z. & Lu, X. A Novel [3+2] Cycloaddition Approach to Nitrogen Heterocycles via Phosphine-Catalyzed Reactions of 2,3-Butadienoates or 2-Butynoates and Dimethyl

- Acetylenedicarboxylate with Imines: A Convenient Synthesis of Pentabromopseudilin. *J. Org. Chem.* **63**, 5031-5041 (1998).
164. Martin, R. et al. Total synthesis of pentabromo- and pentachloropseudilin, and synthetic analogues--allosteric inhibitors of myosin ATPase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 8042-8046 (2009).
165. Fedorov, R. et al. The mechanism of pentabromopseudilin inhibition of myosin motor activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 80-88 (2009).
166. Petrek, M. et al. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* **7**, 316 (2006).
167. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037-10041 (2001).
168. Chang, C.-E., Chen, W. & Gilson, M.K. Evaluating the Accuracy of the Quasiharmonic Approximation. *J. Chem. Theory Comput.* **1**, 1017-1028 (2005).
169. Carlsson, J. & Aqvist, J. Absolute and Relative Entropies from Computer Simulation with Applications to Ligand Binding. *J. Phys. Chem. B* **109**, 6448-6456 (2005).
170. Baron, R., van Gunsteren, W.F. & Hünenberger, P.H. Estimating the configurational entropy from molecular dynamics simulations: anharmonicity and correlation corrections to the quasi-harmonic approximation. *Trends Chem. Phys.* **11**, 87-122 (2006).
171. Brixius, K., Hoyer, H. & Schwinger, R. Ca²⁺-Sensitisers—A Promising Option to Treat Heart Failure? *Cardiovasc. Drugs Ther.* **19**, 423-428 (2005).
172. Gambassi, G., Capogrossi, M.C., Klockow, M. & Lakatta, E.G. Enantiomeric dissection of the effects of the inotropic agent, EMD 53998, in single cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* **264**, H728-738 (1993).
173. Lues, I., Beier, N., Jonas, R., Klockow, M. & Haeusler, G. The two mechanisms of action of racemic cardiotonic EMD 53998, calcium sensitization and phosphodiesterase inhibition, reside in different enantiomers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**, 883-892 (1993).
174. Lee, J.A. & Allen, D.G. EMD 53998 sensitizes the contractile proteins to calcium in intact ferret ventricular muscle. *Circ. Res.* **69**, 927-936 (1991).
175. Lee, J.A., Shah, N., White, J. & Orchard, C.H. A novel thiadiazinone derivative fully reverses acidosis-induced depression of force in cardiac muscle by a calcium-sensitizing effect. *Clin. Sci.* **84**, 141-144 (1993).
176. Ferroni, C. et al. A novel positive inotropic substance enhances contractility without increasing the Ca²⁺ transient in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **23**, 325-31 (1991).
177. de Tombe, P.P., Burkhoff, D. & Hunter, W.C. Effects of calcium and EMD-53998 on oxygen consumption in isolated canine hearts. *Circulation* **86**, 1945-1954 (1992).
178. Beier, N. et al. The novel cardiotonic agent EMD 53998 is a potent "calcium sensitizer". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **18**, 17-27 (1991).
179. Leijendekker, W.J. & Herzig, J.W. Reduction of myocardial cross-bridge turnover rate in presence of EMD 53998, a novel Ca²⁺-sensitizing agent. *Pflügers Arch.* **421**, 388-390 (1992).
180. Groß, T., Lues, I. & Daut, J. A new cardiotonic drug reduces the energy cost of active tension in cardiac muscle. *J. Mol. Cell Cardiol.* **25**, 239-244 (1993).
181. Simnett, S.J., Lipscomb, S., Ashley, C.C., Potter, J.D. & Mulligan, I.P. The thiadiazinone EMD 57033 speeds the activation of skinned cardiac muscle produced by the photolysis of nitr-5. *Pflügers Arch.* **427**, 550-552 (1994).
182. Huxley, A.F. Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* **7**, 255-318 (1957).
183. Solaro, R.J. et al. Stereoselective actions of thiadiazinones on canine cardiac myocytes and myofilaments. *Circ. Res.* **73**, 981-990 (1993).
184. Kraft, T. & Brenner, B. Force enhancement without changes in cross-bridge turnover kinetics: the effect of EMD 57033. *Biophys. J.* **72**, 272-281 (1997).

185. Marriott, G., Zechel, K. & Jovin, T.M. Spectroscopic and functional characterization of an environmentally sensitive fluorescent actin conjugate. *Biochemistry* **27**, 6214-6220 (1988).
186. Hiratsuka, T. ATP-induced opposite changes in the local environments around Cys⁶⁹⁷ (SH2) and Cys⁷⁰⁷ (SH1) of the myosin motor domain revealed by the prodan fluorescence. *J. Biol. Chem.* **274**, 29156-29163 (1999).
187. Zechel, K. The interaction of 6-propionyl-2-(*NN*-dimethyl)aminonaphthalene (PRODAN)-labelled actin with actin-binding proteins and drugs. *Biochem. J.* **290**, 411-417 (1993).
188. Hiratsuka, T. Prodan fluorescence reflects differences in nucleotide-induced conformational states in the myosin head and allows continuous visualization of the ATPase reactions. *Biochemistry* **37**, 7167-7176 (1998).
189. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410 (1990).
190. Wang, R., Gao, Y. & Lai, L. LigBuilder: A Multi-Purpose Program for Structure-Based Drug Design. *J. Mol. Model.* **6**, 498-516 (2000).
191. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3-26 (2001).
192. Granovsky, A.A. PC GAMESS. 7.1.5 edn.
193. Schmidt, M.W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **14**, 1347-1363 (1993).
194. Jempty, T.C., Miller, L.L. & Mazur, Y. Oxidative coupling reactions using silica-bound ferric chloride. *J. Org. Chem.* **45**, 749-751 (1980).
195. Johnson, J.D. et al. Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1926-1933 (2007).
196. Bennett, T.N. et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1807-1810 (2004).
197. Hegge, S., Kudryashev, M., Smith, A. & Frischknecht, F. Automated classification of *Plasmodium* sporozoite movement patterns reveals a shift towards productive motility during salivary gland infection. *Biotechnol. J.* **4**, 903-913 (2009).
198. Schipke, J.D. & Korbmacher, B. EMD 57033: A Novel Ca²⁺ Sensitizing Agent. *Cardiovasc. Drug Rev.* **14**, 334-350 (1996).

6. Anhang

Tabelle 6.1: Datenstatistik der Kristallstrukturen von *Dd* Myosin-2 mit gebundenem Pseudilin.

	Myosin-2 · ADP·VO ₃ · Pseudilin 33	Myosin-2 · ADP·VO ₄ · Pseudilin 25
Datensammlung		
Raumgruppe	C222 ₁	C222 ₁
Wellenlänge (Å)	0,8055	0,9330
Zellparameter		
a, b, c (Å)	88,34; 146,38; 152,80	88,67; 147,79; 153,80
α, β, γ (°)	90; 90; 90	90; 90; 90
R _{sym} (%)	13,7 (55,2)	13,2 (33,3)
I / σI	11,25 (4,22)	12,64 (4,25)
Vollständigkeit (%)	99,8 (100)	99,1 (100)
Redundanz	8,2 (8,4)	14,7 (14,9)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	19,7 - 2,4	20,0 - 3,0
R _{work} / R _{free} (%)	20,2 / 25,4	24,9 / 29,3
Anzahl der Reflexe		
Arbeits- / Testset	38966 / 1949	19494 / 1026

Tabelle 6.2: Datenstatistik der G680-Mutanten-Kristallstrukturen.

	G680A (apo)	G680A·ADP	G680V (apo)
Datensammlung			
Raumgruppe	P22 ₁ 2 ₁	P22 ₁ 2 ₁	P22 ₁ 2 ₁
Wellenlänge [Å]	0,9175	0,9175	0,9175
Zellparameter			
a, b, c [Å]	54,6; 106,0; 178,9	55,5; 106,5; 184,0	55,0; 105,8; 180,5
α, β, γ [°]	90; 90; 90	90; 90; 90	90; 90; 90
R _{sym} [%]	18,3 (46,5)	16,8 (46,5)	14,0 (52,5)
I / σI	8,53 (2,61)	9,23 (2,37)	7,34 (2,44)
Vollständigkeit [%]	98,31 (85,0)	96,35 (83,4)	99,7 (99,0)
Redundanz	4,5 (4,4)	11,1 (2,3)	8,7 (3,3)
Verfeinerung			
Auflösung [Å]	91,3-2,85	20,2-3,13	20,0-3,40
R _{work} / R _{free} [%]	25,3 / 30,1	24,5 / 33,7	28,2 / 37,2
Anzahl der Reflexe			
Arbeits- / Testset	24550 / 1241	18481 / 942	15050 / 760

Tabelle 6.3: Datenstatistik der Kristallstrukturen von *Dd* Myosin-2 mit gebundenem EMD 57033 und Prodan.

	Myosin-2 · ADP·VO₃ · EMD 57033 (36)	Myosin-2 · ADP·VO₃ · Prodan (35)
Datensammlung		
Raumgruppe	C222 ₁	C222 ₁
Wellenlänge (Å)	1.5412	1,000
Zellparameter		
a, b, c (Å)	88,24; 148,20; 153,31	89,60; 148,80; 153,30
α, β, γ (°)	90; 90; 90	90; 90; 90
R _{sym} (%)	11,7 (38,8)	16,3 (47,9)
I / σI	16,99 (3,55)	13,03 (4,35)
Vollständigkeit (%)	99,9 (100)	99,8 (99,9)
Redundanz	45,4 (36,9)	8,2 (8,3)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	20,0 - 2,7	20,0 - 2,4
R _{work} / R _{free} (%)	25,2 / 29,3	25,9 / 29,3
Anzahl der Reflexe		
Arbeits- / Testset	26097 / 1377	40199 / 2013

Tabelle 6.4: Datenstatistik der Komplexkristallstruktur von *Dd* Myosin-2 mit Inhibitor 3.

	Myosin-2 · ADP·VO₄ · Inhibitor 3
Datensammlung	
Raumgruppe	C222 ₁
Wellenlänge (Å)	0.9184
Zellparameter	
a, b, c (Å)	89,30; 149,04; 153,99
α, β, γ (°)	90; 90; 90
R _{sym} (%)	14,1 (29,0)
I / σI	16,25 (4,40)
Vollständigkeit (%)	99,9 (100)
Redundanz	9,9 (10,3)
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	20,0 - 2,5
R _{work} / R _{free} (%)	22,2 / 27,8
Anzahl der Reflexe	
Arbeits- / Testset	35853 / 1793

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Phylogenetischer Stammbaum der originalen 18 Myosinklassen.	2
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung der gegenwärtigen Myosinklassen und ihrer spezifischen Anordnung der Domänen.	5
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung des doppelköpfigen Myosin-2.	6
Abbildung 1.4:	Kristallstruktur und Topologiekarte des Myosin S1.	7
Abbildung 1.5:	Schwingen des Hebelarms während des Kraftschlages (<i>swinging lever arm hypothesis</i>).	9
Abbildung 1.6:	Der ATPase-Zyklus.	10
Abbildung 1.7:	Die Aktomyosin-Wechselwirkungsfläche.	11
Abbildung 1.8:	Öffnen des 50 kDa Spaltes in Myosin-5.	12
Abbildung 1.9:	Die Nukleotidbindungstasche.	14
Abbildung 1.10:	Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von ATP mit Myosin-2.	14
Abbildung 1.11:	Kraftschlag, bzw. Erholungsschlag von Myosin-2.	16
Abbildung 1.12:	Strukturformel von 2,3-Butandionmonoxim (BDM).	18
Abbildung 1.13:	Chemische Struktur von <i>N</i> -Benzyl- <i>p</i> -toluensulphonamid (BTS).	18
Abbildung 1.14:	Strukturformel von Trifluoperazin (TFP).	18
Abbildung 1.15:	Struktur von (-)-Blebbistatin.	19
Abbildung 1.16:	Der Lebenszyklus des Malariaerregers <i>Plasmodium falciparum</i> .	20
Abbildung 1.17:	Schematische Darstellung eines Plasmodium Sporozoiten.	22
Abbildung 1.18:	Modell des Glideosoms und der Bindung eines <i>Pf</i> Merozoiten an einen Erythrozyten.	23
Abbildung 1.19:	Sequenzvergleich des degenerierten parasitären IQ Motivs in <i>Pf</i> Myosin A.	24
Abbildung 1.20:	Chemische Strukturen gängiger 4-Aminochinoline.	25
Abbildung 1.21:	Arylaminoalkohole.	25
Abbildung 1.22:	Chemische Strukturen verwendeter Antifolate.	26
Abbildung 1.23:	Die oxidative Cyclisierung des <i>Prodrugs</i> Proguanil.	26
Abbildung 1.24:	Strukturen der Antimalariastoffe, die die Atmungskette beeinflussen.	27
Abbildung 1.25:	Die Antimalaria aktiven Derivate des Naturstoffes Artemisinin.	28
Abbildung 2.1:	Beugungsbild eines Kristalles des Komplexes von <i>Dd</i> Myosin-2 mit ADP-VO ₃ und 33.	50
Abbildung 2.2:	Reaktionskaskade während der enzymgekoppelten <i>steady state</i> ATPase-Messungen.	56
Abbildung 2.3:	Schematischer Aufbau der Flusszelle zur Untersuchung der <i>in vitro</i> Motilität.	58
Abbildung 2.4:	Energieterme des OPLS-AA Kraftfeldes.	64
Abbildung 3.1:	Diagramm verschiedenster Typen allosterischer Auslöser.	65
Abbildung 3.2:	Arrhenius Diagramm der Temperaturabhängigkeit der ADP-Abgaberate vom Wildtyp und G680A.	67
Abbildung 3.3:	Temperaturabhängigkeit von K _D für den Wildtyp und G680A.	68
Abbildung 3.4:	Temperaturabhängigkeit von K _{AD} des Wildtyps und der G680A-Mutante.	70
Abbildung 3.5:	Röntgenkristallstrukturen der G680-Mutanten.	71
Abbildung 3.6:	Schematische Darstellung der Wechselwirkungen der reaktiven Thiolregion.	72
Abbildung 3.7:	Analyse der Fluktuationen und internen Mobilität im Wildtyp und den G680-Mutanten.	74
Abbildung 3.8:	Momentaufnahmen der MD-Simulationen bei 300 K.	75
Abbildung 3.9:	Röntgenkristallstruktur der <i>Dd</i> Myosin-2 Motordomäne im Komplex mit 33.	78
Abbildung 3.10:	Die verschiedenen Bindungsorientierungen der Pseudiline.	79
Abbildung 3.11:	Ausschnitte der Elektronendichte der Struktur von <i>Dd</i> Myosin-2 mit ADP-VO ₄ und PBP.	80
Abbildung 3.12:	Bindungsmodus von Pseudilin 25 in der Struktur mit <i>Dd</i> Myosin-2 und ADP-VO ₄ .	80
Abbildung 3.13:	Darstellung der Eigenschaften der Myosinbindungstasche.	81

Abbildung 3.14:	Diagramm der normalisierten kristallographischen B-Faktoren.	82
Abbildung 3.15:	Wechselwirkungen zwischen <i>Dd</i> Myosin-2 und den Pseudilinen 25, 33 und 29.	83
Abbildung 3.16:	Inhibition der Aktin-aktivierten ATPase verschiedener Isoformen durch TBDClP.	84
Abbildung 3.17:	Korrelationskurve zwischen den inhibitorischen Aktivitäten und den Bindungsenergien.	85
Abbildung 3.18:	Verhalten der Pseudiline in der Bindungstasche während der MD-Simulationen.	86
Abbildung 3.19:	Vergleich der mittleren quadratischen Fluktuationen und B-Faktoren.	88
Abbildung 3.20:	Röntgenkristallstruktur von <i>Dd</i> Myosin-2 im Komplex mit EMD 57033.	90
Abbildung 3.21:	Bindungsposition von EMD 57033 in der Kristallstruktur und im Homologiemodell von <i>Hs</i> β -kardialem Myosin.	91
Abbildung 3.22:	Kristallstruktur des Myosin-ADP-VO ₃ -Prodan-Komplexes.	93
Abbildung 3.23:	Interaktionen von Prodan mit <i>Dd</i> Myosin-2.	94
Abbildung 3.24:	B-Faktoren der <i>Dd</i> Myosin-2-ADP-VO ₃ -Strukturen mit gebundenem Prodan.	94
Abbildung 3.25:	Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Pf</i> Myosin A und <i>Dd</i> Myosin-2.	96
Abbildung 3.26:	Bänderdarstellung des fertigen Homologiemodells von <i>Pf</i> Myosin A.	97
Abbildung 3.27:	Darstellung der identifizierten und während des Designprozesses verwendeten Interaktionsmerkmale der Bindungstasche.	98
Abbildung 3.28:	Vorhergesagte Bindungsposition von Verbindung 6 in <i>Pf</i> Myosin A.	100
Abbildung 3.29:	Syntheseroute der Verbindungen mit Ester- und Amidfunktion.	101
Abbildung 3.30:	Syntheseroute der Verbindungen mit Nitril-, Imidoester- und Amidinfunktion.	101
Abbildung 3.31:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 1 in CDCl ₃ .	102
Abbildung 3.32:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 3 in CDCl ₃ .	103
Abbildung 3.33:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 8 in CDCl ₃ .	104
Abbildung 3.34:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 10 in CDCl ₃ .	106
Abbildung 3.35:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 13 in CDCl ₃ .	107
Abbildung 3.36:	Ausschnitt des 2D-COSY Korrelationsspektrums der Verbindung 13 in CDCl ₃ .	108
Abbildung 3.37:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 15 in CDCl ₃ .	109
Abbildung 3.38:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 17 in CD ₃ OD.	110
Abbildung 3.39:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 19 in CD ₃ OD.	111
Abbildung 3.40:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 20 in CDCl ₃ .	112
Abbildung 3.41:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 21 in CD ₃ OD.	113
Abbildung 3.42:	Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums von 22 in CDCl ₃ .	114
Abbildung 3.43:	Darstellung der IC ₅₀ -Werte der Verbindungen auf die <i>Dd</i> Myosin-1b ATPase-Funktion.	115
Abbildung 3.44:	Inhibition der Aktin-aktivierten ATPase-Aktivität von <i>Dd</i> Myosin-1b und <i>Dd</i> Myosin-2 durch die Verbindung 6.	116
Abbildung 3.45:	Darstellung der Hemmung der Gleitgeschwindigkeiten von <i>Dd</i> Myosin-1b.	117
Abbildung 3.46:	Graphische Darstellung der Gleitgeschwindigkeiten aus dem <i>in vitro</i> Motilitätsassay.	117
Abbildung 3.47:	Hemmung durch die Verbindungen 1, 3 und 6 in <i>in vitro</i> Wachstumsassays.	119
Abbildung 3.48:	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Sporozoiten-Motilitätsmessungen.	119
Abbildung 3.49:	Kristallstruktur des <i>Dd</i> Myosin-2 Komplexes mit gebundenem ADP-VO ₄ und 3.	121
Abbildung 3.50:	Wechselwirkungen in der Kristallstruktur zwischen dem Inhibitor 3 und <i>Dd</i> Myosin-2.	122
Abbildung 3.51:	Ausschnitt der Bindungstasche im Modell von <i>Pf</i> Myosin A mit der kristallographisch bestimmten Bindungsposition von Inhibitor 3 und dem im Designprozess verwendeten Pharmakophormodells.	123
Abbildung 4.1:	Schematische Darstellung des direkten Relaispfades.	128
Abbildung 4.2:	Ausschnitte der 2F _o -F _c Elektronendichtekarten des aktiven Zentrums in <i>Dd</i> Myosin-2.	129

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Geschwindigkeitskonstanten der ADP-Dissoziation und Aktivierungsenergien der Wildtyp- und Mutanten-Myosine.	67
Tabelle 3.2:	ADP-Affinitäten und thermodynamische Parameter der Wildtyp- und Mutanten-Myosine.	69
Tabelle 3.3:	Hemmung der Myosin ATPase-Aktivität durch die halogenierten Pseudiline.	77
Tabelle 3.4:	Vergleich der experimentellen Aktivitäten und der berechneten freien Bindungsenergien.	85
Tabelle 3.5:	Konfigurationsentropien berechnet aus den MD-Simulationen.	87
Tabelle 3.6:	Inhibition der Gleitgeschwindigkeit von Aktinfilamenten im <i>in vitro</i> Motilitätsassay.	118
Tabelle 3.7:	Ergebnisse aus den Versuchen zur Antimalariaaktivität der Verbindungen. Zum Vergleich sind die durch Molekulares Docking vorhergesagten freien Bindungsenergien angegeben.	120
Tabelle 6.1:	Datenstatistik der Kristallstrukturen von <i>Dd</i> Myosin-2 mit gebundenem Pseudilin.	143
Tabelle 6.2:	Datenstatistik der G680-Mutanten-Kristallstrukturen.	143
Tabelle 6.3:	Datenstatistik der Kristallstrukturen von <i>Dd</i> Myosin-2 mit gebundenem EMD 57033 und Prodan.	144
Tabelle 6.4:	Datenstatistik der Komplexkristallstruktur von <i>Dd</i> Myosin-2 mit Inhibitor 3.	144

8. Publikationen und Präsentationen

Artikel:

Preller, M.; Chinthalapudi, K.; Martin, R.; Knölker, H.-J., Manstein, D. J., Inhibition of Myosin ATPase Activity by Halogenated Pseudilins: A Structure-Activity Study. *J. Med. Chem.*, **54**, 3675-3685 (2011).

Preller, M.; Bauer, S.; Adamek, N.; Fujita-Becker, S.; Fedorov, R.; Geeves, M. A.; Manstein, D. J., Structural Basis for the Allosteric Interference of Myosin Function by Reactive Thiol Region Mutations G680A and G680V. *J. Biol. Chem.* (2011) (Epub, DOI: 10.1074/jbc.M111.265298).

Chinthalapudi, K.; Taft, M. H.; Martin R.; Heissler, S. M.; Preller, M.; Hartmann, F. K.; Brandstaetter, H.; Kendrick-Jones, J.; Tsiavaliaris, G.; Gutzeit, H. O.; Fedorov, R.; Buss, F.; Knölker, H.-J.; Coluccio, L. M.; Manstein, D. J., Mechanism and Specificity of Pentachloropseudilin-Mediated Inhibition of Myosin Motor Activity. *J Biol. Chem.* (2011), (Epub, DOI: 10.1074/jbc.M111.239210).

Buchkapitel:

Preller, M.; Manstein, D. J., *Comprehensive Biophysics*. Vol. 04. *Myosin Motors: Structural Aspects and Functionality*; Elsevier: 2011.

Patente:

Preller, M.; Furch, M.; Diaz Gomez, N.; Kalesse, M.; Manstein D. J., Rationale Entwicklung von Leitstrukturen zur allosterischen Hemmung von parasitären Myosinen mit potentielltem Einsatz im Indikationsgebiet Malaria. (liegt dem Patentanwalt vor).

Publikationen, die nicht Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit darstellen:

Preller, M.; Grunenberg, J.; Bulychev V. P.; Bulanin M. O., Calculation of the Structure, Potential Energy Surface, Vibrational Dynamics, and Electric Dipole Properties for the Xe:HI van der Waals Complex. *J. Chem. Phys.*, **134**, 174302 (2011).

Posterbeiträge:

Preller, M.; Chinthalapudi, K.; Furch, M.; Fedorov, R.; Manstein, D. J., Binding Modes of Novel Allosteric Myosin Inhibitors. Nordic and European Summer School – VUV and X-ray Research for the Future using FEL's and Ultra Brilliant Sources, 26. Mai - 02. Juni 2008, Odengården und MAX-lab, Schweden.

Preller, M.; Chinthalapudi, K.; Knölker, H.-J.; Manstein, D. J., Structural Basis for the Inhibition of Myosin Motor Activity by Pharmacological Agents. AIO Symposium: Academic Drug Development in Oncology – Translating Basic Science Research into Innovative Treatments, 18. November 2009, Berlin, Deutschland.

Preller, M.; Martin, R.; Knölker, H.-J.; Manstein, D. J., Structure-Activity Relationship of a Series of Marine Alkaloid Derived Myosin Inhibitors. Myosin, Muscle and Many other Motors Conference, 20. März - 26. März 2010, Alpbach, Österreich.

Preller, M.; Chinthalapudi, K.; Martin, R.; Knölker, H.-J.; Manstein, D. J., Myosin as Target in Cancer Therapies: Inhibition of the Myosin ATPase Activity by Halogenated Pseudilins. AIO Symposium: Academic Drug Development in Oncology – Translating Basic Science Research into Innovative Treatments, 17. November 2010, Berlin, Deutschland.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Matthias Preller
Geburtsdatum: 10.03.1980
Geburtsort: Wolfenbüttel
Nationalität: Deutsch

Bildungsgang:

15.06.2000 Abitur, Theodor-Heuss-Gymnasium Wolfenbüttel
10.2001 – 03.2005 Studium der Chemie (Bachelor of Science Programm), Technische Universität Braunschweig
27.01.2005 Bachelor of Science (B.Sc.)
04.2005 – 12.2006 Studium der Chemie (Master of Science Programm), Technische Universität Braunschweig
09.2005 – 12.2005 Socrates-Erasmus Auslandssemester, University College Cork, Irland
06.2006 – 12.2006 Masterarbeit: "Acyclische Rezeptoren mit neutralen und ionischen Bindungsstellen: Synthesen, Komplexierungseigenschaften und Molecular Modeling Studien" im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Mazik, Technische Universität Braunschweig, Institut für Organische Chemie
20.12.2006 Master of Science (M.Sc.)
seit 11.2007 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. D. J. Manstein, Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

Zivildienst:

2000 – 2001 Zivildienst, Paritätischer Wohlfahrtsverband Wolfenbüttel

Berufserfahrung:

01.2007 – 10.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig und am Fraunhofer Institut für Schicht- und Oberflächentechnologie
Seit 11.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Hochschule Hannover im Exzellenzcluster REBIRTH – from Regenerative Biology to Reconstructive Therapy