

Molecular Modelling Untersuchungen an Natriumkanal-aktiven Neurotoxinen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefanie Bendels

aus Andernach

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H.-D. Hörtje

Korreferent: Prof. Dr. P. Proksch

Korreferent: Prof. Dr. G. Folkers

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2001

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1997 bis Juni 2001 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas, für viele hilfreiche Diskussionen und die idealen Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl.

Herrn Prof. Dr. P. Proksch und Herrn Prof. Dr. G. Folkers danke ich herzlich für die Anfertigung der Gutachten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Vorbemerkung	3
1.2	Spannungsabhängige Natriumkanäle	4
1.2.1	Ionenkanäle	4
1.2.2	Aufbau des Natriumkanals	4
1.2.3	Molekulare Mechanismen für Funktion und Regulation der Natriumkanäle	6
1.2.3.1	Pore und Selektivitätsfilter	6
1.2.3.2	Spannungsabhängige Aktivierung	8
1.2.3.3	Der Inaktivierungsprozess: <i>Hinged-Lid</i> -Mechanismus	10
1.2.4	Interaktionen mit Toxinen	13
1.2.4.1	β -Skorpion-Toxine	13
1.2.4.2	Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine	14
1.3	Seeanemonen-Toxine	16
1.3.1	Seeanemonen	16
1.3.2	Toxine	17
1.3.2.1	Langkettige Typ 1-Toxine	19
1.3.2.2	Kurzkettige Typ 1-Toxine	20
1.3.2.3	BDSI und BDSII	21
1.3.3	Strukturen	21
1.4	Skorpion-Toxine	24
1.4.1	Skorpione	24
1.4.2	Toxine	25
1.4.3	Strukturen	28
1.5	Trichternetzspinnen-Toxine	30
1.5.1	Trichternetzspinnen	30
1.5.2	Toxine	32
1.5.3	Strukturen	32
1.6	Protein-Protein-Wechselwirkung	33
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	37
3	METHODEN	41
3.1	Konformationsanalyse von Polypeptiden	43
3.1.1	<i>Root Mean Square</i> -Wert	43
3.1.2	<i>Angular Order</i> -Parameter	44

3.1.3	<i>Cluster</i> -Einteilung.....	45
3.1.3.1	Das Programm NMRCORE	46
3.1.3.2	Das Programm NMRCORE	48
3.2	Untersuchung der elektrostatischen Eigenschaften	49
3.2.1	Poisson-Boltzmann-Gleichung.....	49
3.2.2	Methoden zur Berechnung von pK_a -Werten.....	51
3.3	Strukturüberlagerung mit dem Programm FAME	56
4	DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	59
4.1	Vorgehensweise	61
4.1.1	Auswahl der Polypeptide	61
4.1.2	Entwicklung des Toxiphor-Modells.....	64
4.1.2.1	Molekulares elektrostatisches Potential	66
4.1.2.2	Rigidität der Toxine	67
4.2	Moleküldynamik-Simulationen	68
4.2.1	<i>Cutoff</i> für nichtkovalente Wechselwirkungen bei periodischen Randbedingungen.....	68
4.2.2	Die Dielektrizitätskonstante.....	71
4.2.3	Zusammenfassung	74
4.3	Moleküldynamik-Simulation von ApB.....	77
4.3.1	Auswertung der freien MD-Simulation.....	77
4.3.1.1	Flexibilität.....	77
4.3.1.2	Einteilung in <i>Cluster</i>	79
4.3.1.3	Energieminimierung der repräsentativen <i>Frames</i>	80
4.3.1.4	Auswahl einer MD-Konformation	81
4.3.2	Vergleich der MD-Konformation mit der Startstruktur.....	82
4.3.2.1	Überlagerung der Konformationen.....	82
4.3.2.2	Untersuchung der geometrischen Eigenschaften.....	83
4.3.3	Einfluss der Simulationsdauer auf die Konformation.....	84
4.4	Weitere MD-Simulationen	85
4.5	Funktionelle Seite des Seeanemonen-Toxins ApB.....	87
4.6	Säurestärken der Asparaginsäuren bei Seeanemonen-Toxinen	92
4.6.1	Vergleich der MD-Simulationen	93
4.6.2	Berechnung der pK_a -Werte bei den Toxinen ApA und ApB	96
4.6.2.1	Durchführung	97
4.6.2.2	Ergebnisse.....	97
4.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	99

4.7	Bedeutung der Arginine im Loop I bei Seeanemonen-Toxinen.....	99
4.7.1	MD-Simulationen von ApB, R12SK49Q und ApA	100
4.7.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	104
4.8	Toxiphor-Modell der Seeanemonen-Toxine	105
4.8.1	Vorgehensweise	105
4.8.2	Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials	107
4.8.2.1	Durchführung	107
4.8.2.2	Ergebnisse.....	110
4.8.3	Untersuchung der Polypeptide.....	110
4.8.3.1	Überlagerung von ApB und ApA.....	110
4.8.3.2	Vergleich von ApB mit dem Antagonisten BDSII.....	112
4.8.3.3	Spaltung der Bindung zwischen Arg14 und Gly15 bei ApB.....	114
4.8.3.4	Vergleich von ApB mit ATXIa.....	117
4.8.3.5	Überlagerung von ATXIa mit dem kurzkettigen Toxin ATXIII	119
4.8.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	123
4.9	Lipophiles Potential der drei Toxingruppen.....	126
4.10	Überlagerung der drei Toxingruppen	129
4.10.1	Schwerpunkte und Vorgehensweise	129
4.10.1.1	Schwerpunkte	129
4.10.1.2	Ausgewählte Toxine.....	130
4.10.2	Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials	134
4.10.3	Überlagerung von ApB mit dem α -Insektentoxin Lqh α IT	137
4.10.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	139
4.10.4	Untersuchung der Skorpion-Toxine	140
4.10.4.1	Überlagerung von Lqh α IT mit AaHII	141
4.10.4.2	Untersuchung der klassischen α -Skorpion-Toxine.....	143
4.10.4.3	Überlagerung von LqqV mit Lqh α IT	147
4.10.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	149
4.10.5	Vergleich der klassischen α -Skorpion-Toxine mit ApB.....	152
4.10.5.1	Überlagerung von AaHII mit ApB	152
4.10.5.2	Überlagerung von LqqV mit ApB.....	155
4.10.5.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	156
4.10.6	Untersuchung des β -Skorpion-Toxins Cn2	158
4.10.6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	160
4.10.7	Vergleich der Atracotoxine mit den Skorpion-Toxinen	161
4.10.7.1	Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit AaHII.....	161

4.10.7.2	Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 und Lqh α IT	163
4.10.7.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	164
4.10.8	Strukturüberlagerungen mit dem Programm FAME	166
4.10.8.1	Durchführung	166
4.10.8.2	Überlagerung von AaHII und ApB.....	167
4.10.8.3	Überlagerung von AaHII und δ -ACTX-Ar1	171
4.10.8.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	175
4.10.9	Abschließende Bemerkungen	176
5	DISKUSSION	177
5.1	Toxiphor-Modell für die Interaktion mit dem neuronalen Säugerkanal.....	179
5.2	Modell für die Hemmung der Inaktivierung	183
5.3	Interaktionen zwischen den Toxinen und dem Loop IVS3-S4.....	185
5.4	Vergleich mit publizierten Überlagerungen.....	187
5.5	Ausblick	190
6	ZUSAMMENFASSUNG	191
7	LITERATURVERZEICHNIS	195
8	ANHANG	203

1 EINLEITUNG

1.1 Vorbemerkung

„*Functional Architectures of Animal Toxins: A Clue to Drug Design?*“¹

So überschrieb André Ménez seinen 1998 erschienen Artikel [1]. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen, dass diese Frage durchaus bejaht werden kann [2]. Ein deutsch-amerikanisches Forscherteam konnte mit einem Toxin der Roten Chile-Vogelspinne (*Grammostola spatulata*) aus dem Rhythmus gebrachte Kaninchenherzen wieder in den richtigen Schlagrhythmus bringen. Diese Entdeckung könnte zur Entwicklung neuer Herzmedikamente führen.

Giftige Tiere aus unterschiedlichen Ordnungen des Tierreiches produzieren eine große Vielfalt toxischer Proteine. Diese Toxine können mit unterschiedlichsten biologischen Targets, wie Enzymen und Ionenkanälen, interagieren. Es werden dabei Proteine gefunden, die ungeachtet ihrer strukturellen Unterschiede vergleichbare Wirkungen zeigen. Auf der anderen Seite gibt es Verbindungen, die trotz ähnlicher Struktur unterschiedliche Funktionen besitzen. Es stehen demnach Protein-Grundgerüste zur Verfügung, die durch geringe Veränderungen an die jeweilige Zielstruktur angepasst werden können.

Für das Verständnis der Wirkung eines Toxins sind neben der dreidimensionalen Struktur die Kenntnisse über die Interaktionsbereiche von Toxin und Bindungsstelle wichtig. Hierbei kann die Aufklärung der Struktur eines Toxin-Ziel-Komplexes hilfreich sein. Allerdings sind diesem Bereich immer noch enge Grenzen gesetzt, da membranäre Proteine sehr schwer zu kristallisieren sind. In diesen Fällen werden die Toxine analysiert, um funktionelle Bereiche zu identifizieren. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit verfolgt: Das biologische Zielobjekt der Untersuchung ist der spannungsabhängige neuronale Natriumkanal unterschiedlicher Spezies; die betrachteten Toxine und Polypeptide stammen von Seeanemonen, Skorpionen und Trichternetzspinnen. Aus ihren Eigenschaften wurde versucht, ein Modell für die Interaktion mit dem Ionenkanal zu entwickeln.

Zum besseren Verständnis werden zunächst der Aufbau und die Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals detailliert beschrieben. Anschließend werden die einzelnen Toxingruppen (Seeanemonen-, Skorpion-, Trichternetzspinnen-Toxine) vorgestellt.

¹ Funktionelle Architektur der tierischen Toxine: Ein Schlüssel zum Wirkstoff-Design?

1.2 Spannungsabhängige Natriumkanäle

1.2.1 Ionenkanäle

Spannungsabhängige Ionenkanäle wie Natrium-, Calcium- und Kaliumkanäle sind verantwortlich für die Bildung und Weiterleitung von elektrischen Signalen in Neuronen und anderen elektrisch erregbaren Zellen. Hierbei sind die Natriumkanäle speziell für die Aufstrichphase des Aktionspotentials verantwortlich.

Ionenkanäle stellen membranintegrierte Proteinkomplexe dar, die durch Bildung einer Pore den passiven Ionentransport durch die Phospholipid-Doppelschicht der Membran ermöglichen. Die Transportrichtung wird dabei durch den jeweiligen elektrochemischen Gradienten des Ions bestimmt.

Die Öffnung der Pore erfolgt durch Aktivierung der Kanäle infolge einer Depolarisation der Zellmembran. Dabei ist die Leitfähigkeit der aktivierten Kanäle für Ionen sehr selektiv und bemerkenswert hoch, denn die Leitungsgeschwindigkeit durch die Membran entspricht annähernd der Diffusionsgeschwindigkeit der Ionen in Lösung [3]. Werden die Kanäle anschließend inaktiviert, zeigen sie keine Leitfähigkeit für Ionen. Zudem besitzen sie eine Refraktärzeit, so dass sie erst wieder erregbar sind, wenn die Membran repolarisiert und das Protein in den geschlossenen Zustand übergegangen ist.

Spannungsabhängige Ionenkanäle können so grundsätzlich in drei unterschiedlichen Formen vorliegen: geschlossen, aktiviert und inaktiviert.

1.2.2 Aufbau des Natriumkanals

Natriumkanäle sind Glykoproteine und können aus bis zu drei verschiedenen Einheiten aufgebaut sein, der größeren α - und den kleineren β -Untereinheiten, β_1 und β_2 (s. Bild 1.1). Gewebespezifisch findet man Natriumkanäle, die aus allen drei Untereinheiten bestehen, im Gehirn der Säuger, während der Kanal des Skelettmuskels und des Herzens lediglich aus der α - und β_1 -Einheit gebildet wird.

Die aus etwa 2000 Aminosäuren aufgebaute α -Untereinheit wird in vier homologe Domänen (I-IV) unterteilt, die jeweils durch sechs α -helikale, transmembranäre Segmente (S1-S6) und einen Porenloop gebildet werden. Die

Bereiche des Porenloops, die wieder in die Membran eintauchen, werden auch als Segmente SS1 und SS2 (*short segment*) bezeichnet.

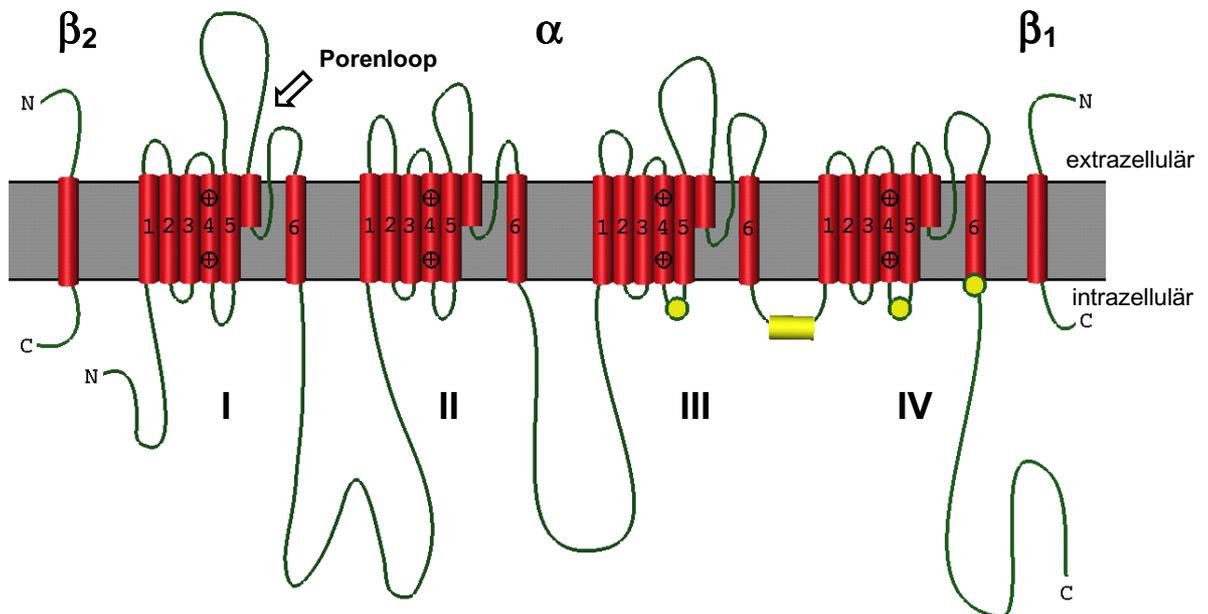


Bild 1.1: Schematische Darstellung der Untereinheiten (α , β_1 , β_2) des Natriumkanals (nach Catterall [4]). Zylinder repräsentieren vermutlich α -helikale Segmente. Durch Kreise markiert sind Bereiche, die zum Rezeptorkomplex für den Inaktivierungs-Loop gehören.

Bei der alleinigen Expressierung der α -Untereinheit in einer Zelle erhält man aktivierbare und leitfähige Kanäle [5]. Allerdings sind die β -Untereinheiten in der Regel unverzichtbar für den normalen Ablauf des Öffnungsprozesses hinsichtlich der Kinetik und der Spannungsabhängigkeit [6][7].

Die beiden, etwa 200 Aminosäuren umfassenden β -Untereinheiten, besitzen im Wesentlichen eine ähnliche Struktur. Sie bestehen aus einer größeren, glykosylierten extrazellulären Domäne, einem transmembranären Segment und einer kleinen, intrazellulären Domäne. Aufgrund von Sequenzvergleichen postulieren Isom et al. für die extrazelluläre Domäne beider β -Untereinheiten eine Immunglobulin-artige Faltung [7], die durch eine *sandwich*-Anordnung von zwei Betafaltblättern charakterisiert ist. Den β -Untereinheiten wird eine duale Funktion zugeschrieben, denn sie sind nicht nur Modulatoren des Öffnungsprozesses, sondern besitzen auch eine Bedeutung für Zell-Zell-Interaktionen. Dadurch können beispielsweise Akkumulationen von Kanälen in bestimmten Geweben ermöglicht werden [4].

Extrazellulär findet man beim Natriumkanal mehrere Glykosylierungsstellen, und Phosphorylierungen durch die Proteinkinasen A und C sind intrazellulär möglich. Das Ausmaß der Glykosylierung und Phosphorylierung hat einen zusätzlichen regulierenden Einfluss auf die Kanalfunktion.

1.2.3 Molekulare Mechanismen für Funktion und Regulation der Natriumkanäle

Hodgkin und Huxley charakterisierten 1952 die grundlegenden Eigenschaften der spannungsabhängigen Natriumkanäle: (1) eine spannungsabhängige Aktivierung, (2) eine schnelle Inaktivierung und (3) eine selektive Leitfähigkeit für Ionen [8]. Sie legten dadurch den Grundstein für intensive Forschungen zu möglichen molekularen Mechanismen.

1.2.3.1 Pore und Selektivitätsfilter

Die äußere Pore und der Selektivitätsfilter werden in erster Linie durch die Porenloops, der innere Bereich der Pore durch die S6-Segmente der Domänen I-IV gebildet. Rückschlüsse auf die Struktur dieser Segmente ermöglichen Arbeiten über Kaliumkanäle, da Doyle et al. [9] die Kristallstruktur eines bakteriellen, pH-Wert gesteuerten Kaliumkanals von *Streptomyces lividans* (KcsA Kaliumkanal) aufklären konnten (PDB: 1bl8) (s. Bild 1.2).

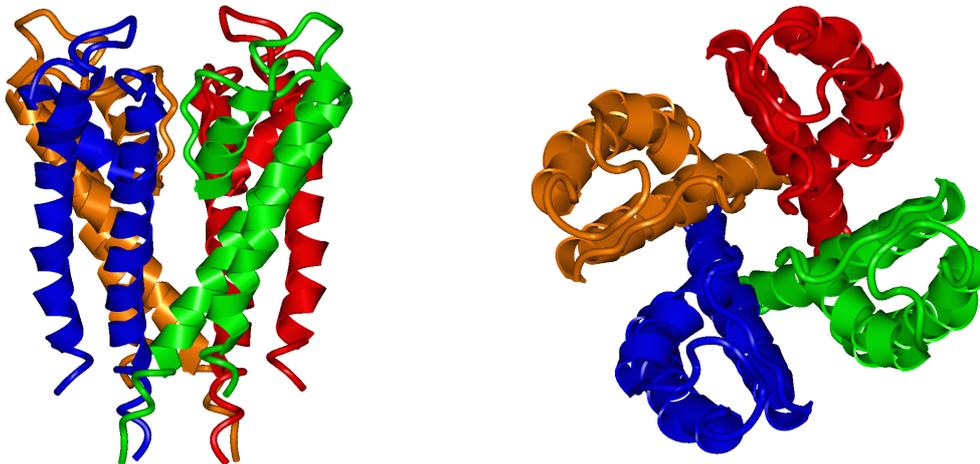


Bild 1.2: Kristallstruktur des KcsA Kaliumkanals von *Streptomyces lividans* als Bändermodelle in der Seitenansicht (*links*) und in der Aufsicht (*rechts*) (PDB: 1bl8) [9]. Es sind alle vier Untereinheiten dargestellt.

Dieser Ionenkanal besteht aus vier identischen α -Untereinheiten, die jeweils aus zwei transmembranären Segmenten gebildet werden. Obwohl die spannungsabhängigen Kanäle aus Untereinheiten mit sechs transmembranären

Segmenten bestehen, konnte gezeigt werden, dass die Segmente S5 und S6 sowie der Porenloop des spannungsabhängigen *Shaker*¹ Kaliumkanals Homologien zum KcsA Kaliumkanal aufweisen [9]. Dadurch konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Poren der spannungsabhängigen Ionenkanäle einen ähnlichen Aufbau wie der KcsA Kanal zeigen [10]. Dies gilt in diesem Zusammenhang nicht nur für die Kaliumkanäle, sondern aufgrund der Homologien zwischen den Ionenkanälen auch für Natriumkanäle.

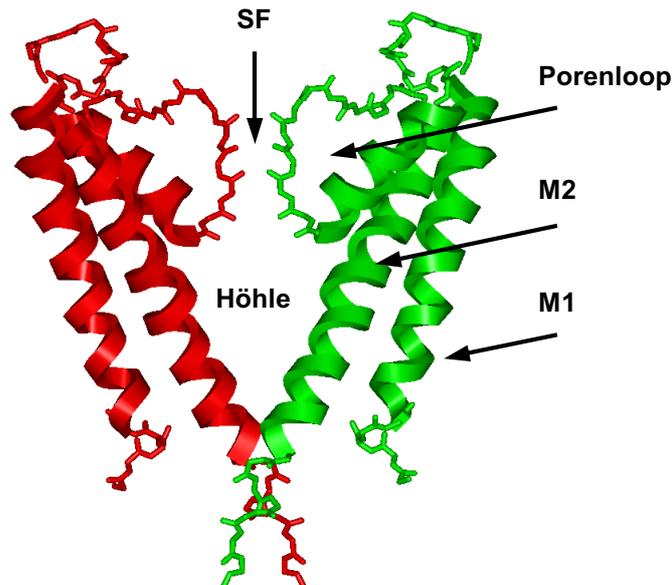


Bild 1.3: Kristallstruktur des KcsA Kaliumkanals von *Streptomyces lividans* als Bändermodell (PDB: 1bl8) [9]. Zur Übersicht sind nur zwei der vier Untereinheiten dargestellt. SF kennzeichnet den Bereich des Selektivitätsfilters. Hier sind die Proteinrückgrat-Atome dargestellt. Die äußere Helix (M1) ist analog zum S5-Segment des spannungsabhängigen Natriumkanals. Dem S6-Segment des Natriumkanals entspricht die innere Helix (M2), die zusammen mit dem Porenloop die Pore bildet.

In der Kristallstruktur des KcsA Kanals wird deutlich, dass ein grundlegender Teil der äußeren Pore durch die α -helikalen SS1-Bereiche der Porenloops gebildet wird (s. Bild 1.3). Zudem werden Rückschlüsse auf den Aufbau des Selektivitätsfilters ermöglicht. Bisher konnten beim Natriumkanal zwei Ringe von Aminosäuren identifiziert werden, die eine besondere Bedeutung für die Funktion des Selektivitätsfilters und die Bindung der Kanalblocker Saxitoxin und Tetrodotoxin besitzen. Der äußere Ring besteht aus den Aminosäuren EEDD,

¹ Mutante der Obstfliege *Drosophila melanogaster*, die auch unter Ethernarkose die Beine schüttelt.

der innere aus DEKA¹ (Review s. [4]). Wegen des auffallend häufigen Vorkommens von sauren Aminosäuren wurde vermutet, dass die Carboxylat-Seitenketten der Glutamate und Aspartate direkt mit den Ionen interagieren.

Im Gegensatz dazu zeigt die Struktur des KcsA Kaliumkanals eine andere Möglichkeit, denn hier wird der enge Bereich des Selektivitätsfilters, den die dehydratisierten Ionen auf dem Weg durch die Pore passieren müssen, wahrscheinlich aus drei aufeinanderfolgenden Carbonylsauerstoff-Atomen des Proteinerückgrats gebildet [9]. Denkbar wäre demnach, dass beim Natriumkanal durch die Aminosäuren EEDD und DEKA der Abstand dieser Carbonylsauerstoff-Atome bestimmt wird, durch den sich die Selektivität für Natriumionen ergibt. Allerdings fehlen hier experimentelle Bestätigungen.

1.2.3.2 Spannungsabhängige Aktivierung

Bei spannungsabhängigen Ionenkanälen ist die Öffnung der Pore von dem Potential der Membran abhängig. Bedingt durch die Depolarisation ändert sich das elektrische Feld der Phospholipid-Doppelschicht. Als Antwort auf die Veränderung erfolgt die Aktivierung des Kanals durch Bewegung der Spannungssensoren in Richtung des Extrazellulärraums [4][8]. Studien ergaben, dass sich bei diesen Veränderungen circa 12 Ladungen im Kanalprotein bewegen [11]. Dabei gilt als gesichert, dass zu diesen Veränderungen vor allem die S4-Segmente beitragen, die ein sich wiederholendes Motiv von positiv geladenen Aminosäuren besitzen, welche jeweils durch zwei hydrophobe Aminosäuren getrennt sind. Zwar scheinen die Ladungen aller vier Domänen Einfluss auf den Aktivierungsprozess zu haben, jedoch zeigten Mutationen am Natriumkanal deutlich unterschiedliche Funktionen der verschiedenen S4-Segmente. So könnten vor allem die S4-Segmente der Domänen I und II eine besondere Bedeutung für die Aktivierung besitzen [12].

Für die Auswärtsbewegung der Spannungssensoren werden mehrere Modelle diskutiert, wobei die grundsätzlichen Vorstellungen nahe beieinander liegen. Catterall et al. beschreiben die Bewegung der S4 Segmente als *sliding helix* [13], Guy et al. als *helical screw* [14]. In beiden Modellen wird bei der geschlossenen Konformation des Kanals eine Stabilisierung der positiven Ladungen der S4-Segmente durch negative Ladungen der umliegenden Seg-

¹ Der Einbuchstabencode (s. Anhang D) gibt folgende Aminosäuren wieder: E: Glu, D: Asp, K: Lys, A: Ala.

mente S1, S2 und S3 postuliert. Diese Segmente bilden durch die Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren amphipatische Helices, so dass sie nicht nur mit den S4-Segmenten interagieren, sondern zugleich in Kontakt mit den Phospholipiden der Membran treten können. Infolge der Depolarisation der Membran bewegen sich die S4-Segmente entlang eines spiralförmigen Pfades nach außen und gehen dabei wechselnde Interaktionen mit den negativen, fixierten Ladungen ihrer Umgebung ein. Sie initialisieren durch diese rotierende Bewegung eine konformatorische Veränderung des Kanalproteins, die zur Öffnung der Pore führt.

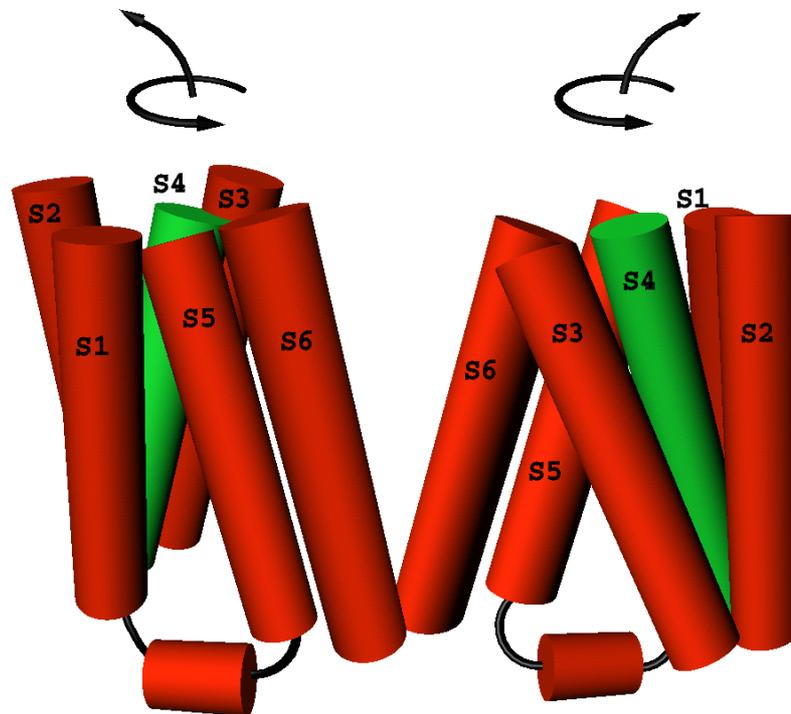


Bild 1.4: Modell des Kaliumkanals der *Shaker*-Mutante nach Bezanilla et al. [10][15]. Zwei gegenüberliegende Untereinheiten sind dargestellt. Die Anordnung der S5- und S6-Segmente basiert auf der Kristallstruktur des KcsA Kaliumkanals [9].

Diese Grundüberlegungen erweiterten Bezanilla et al. [10][15], indem sie ein detaillierteres Modell für den Aktivierungsprozess des tetrameren *Shaker* Kaliumkanals aufstellten (s. Bild 1.4). Angesichts des homologen Aufbaus der Ionenkanäle dürfte dieses Modell in den Grundzügen auch auf den Natriumkanal übertragbar sein. Bezanilla et al. verwendeten als Ausgangspunkt für ihr Modell die Kristallstruktur des KcsA Kaliumkanals. Analog zu den M1- und M2-Segmenten erfolgte der Aufbau der S5- und S6-Segmente. Die Segmente S1 und S5 sowie S2 und S3 wurden jeweils V-förmig angeordnet. Diese Stellung wird durch die Zugänglichkeit bestimmter Aminosäuren durch das intra- bzw.

extrazelluläre Medium begründet. Weiterhin wurden die S4-Segmente mit einer deutlichen Neigung in der Mitte der jeweiligen Domänen platziert. Sie gehen dabei ionische Wechselwirkungen mit den benachbarten S2- und S3-Segmenten ein.

Durch die Veränderung des elektrischen Feldes infolge der Depolarisation der Membran werden nunmehr die S4-Segmente in Richtung des Extrazellulär-raums bewegt. Dabei erfolgt eine Drehung (um circa 180°) und zudem eine leichte Aufrichtung der Helix. Durch diese Bewegung können ohne größere Konformationsänderungen der S4-Segmente etwa 13 Ladungen verlagert werden.

Im weiteren Verlauf des Aktivierungsprozesses könnte die Drehung und Aufrichtung der S4-Segmente, durch Einfluss auf den intrazellulären Loop zwischen den Segmenten S4 und S5, die Konformation der S5-Segmente ändern. Durch diese Modifikationen würden dann die intrazellulären Bereiche der S6-Segmente auseinandergezogen, so dass letztendlich die Pore geöffnet wäre. Konsistent mit diesem Modell postulierten Perozo et al. aufgrund ihrer Untersuchungen am KcsA Kaliumkanal eine mögliche Bewegung der S5- und S6-Segmente durch Translation und Rotation [16].

1.2.3.3 Der Inaktivierungsprozess: *Hinged-Lid-Mechanismus*

Nach der Öffnung des Natriumkanals erfolgt sehr rasch der Übergang in den inaktivierten Zustand, in dem der Kanal keine Leitfähigkeit für Ionen besitzt. Aus den Experimenten ergab sich das in Bild 1.5 dargestellte Modell des *hinged-lid*-Mechanismus (Scharnierdeckel), der den möglichen Ablauf des Inaktivierungsprozesses beschreibt (Review s. [4]). Hierbei dient der kurze Loop zwischen den Domänen III und IV als Poreblocker. Er bindet nach einer raschen Konformationsänderung infolge der Depolarisation der Membran wie ein Riegel an einen Rezeptor am intrazellulären Eingang der Pore. Hierdurch wird die Öffnung verschlossen.

Experimentell konnte in dem bei Natriumkanälen hoch konservierten Inaktivierungs-Loop eine für die Wirkung wichtige hydrophobe Triade identifiziert werden. Sie besteht aus Ile1488 (I), Phe1489 (F) und Met1490 (M), und man spricht demzufolge vom IFM-Motiv [17][18]. Ebenfalls von Bedeutung für die Inaktivierung ist das benachbarte Thr1491 [19].

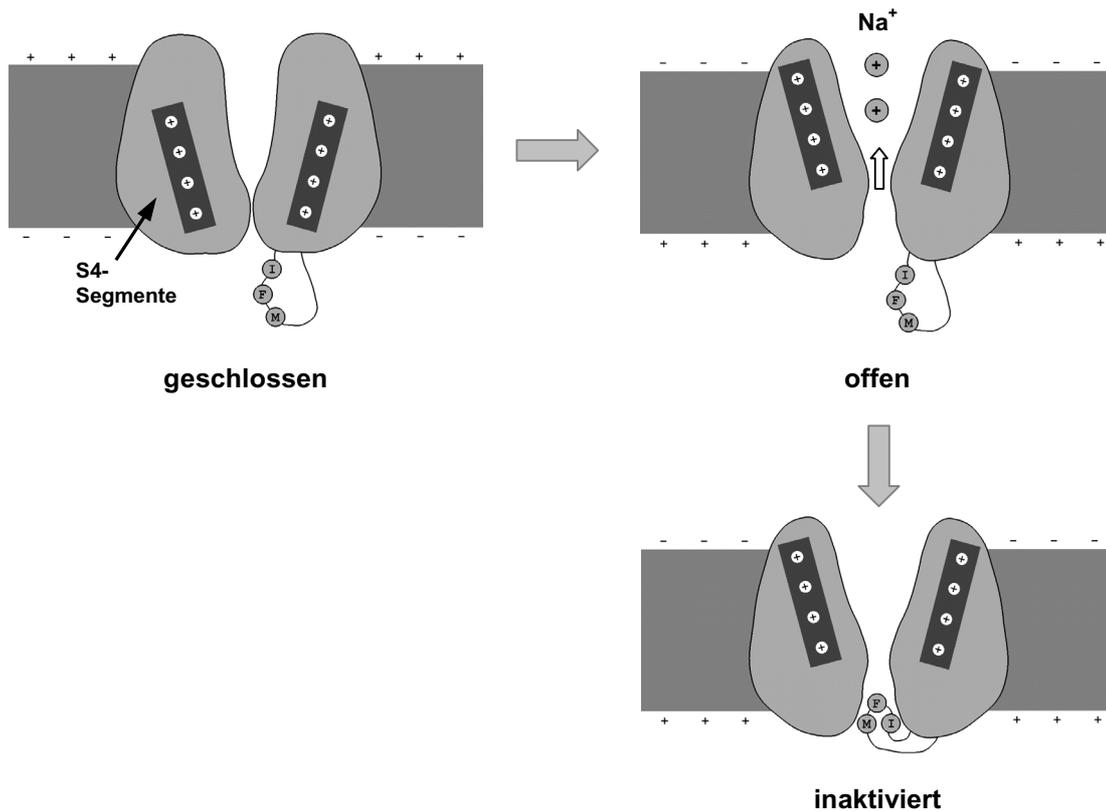


Bild 1.5: Schematische Darstellung des *hinged-lid*-Mechanismus. Abgebildet sind die drei grundsätzlichen Formen des Natriumkanals: geschlossen, offen und inaktiviert. Bei der Aktivierung bewegen sich die Spannungssensoren (S4-Segmente der Domänen I-IV) in Richtung des Extrazellulärraums. Der die Domänen III und IV verbindende Inaktivierungs-Loop (mit IFM-Motiv) verschließt die Öffnung der inneren Pore. Die Spannungssensoren IIIS4 und IVS4 bleiben im inaktivierten Zustand des Kanals in der auswärtigen Position.

Bei der genaueren Betrachtung des zentralen Bereichs des Inaktivierungs-Loops mit Hilfe der NMR-Spektroskopie (s. Bild 1.6), fand man eine stabile Kernregion bestehend aus einer α -Helix, an die sich N-terminal ein Turn und das IFM-Motiv anschließen [18]. Phe1489, dem eine Schlüsselrolle bei der Interaktion mit dem Rezeptor beigemessen wird [19], und Ile1488 nehmen durch diese Faltung eine Lösungsmittel exponierte Position ein, was für hydrophobe Aminosäuren in kleinen Peptiden mit benachbartem hydrophoben Cluster (Met1490, Tyr1497, Tyr1498) recht ungewöhnlich ist. Ebenfalls ins Lösungsmittel ragt Thr1491. Die exponierte Stellung der Aminosäuren Ile1488, Phe1489 und Thr1491, durch die wahrscheinlich die Wechselwirkungen mit dem Rezeptor erfolgen, wird vor allem durch die Interaktionen zwischen Met1490 und zwei Tyrosinen (Tyr1497, Tyr1498) in der Helix stabilisiert. Demnach liegt die Bedeutung des Methionins offensichtlich primär in der Stabilisierung der Struktur des Inaktivierungs-Loops.

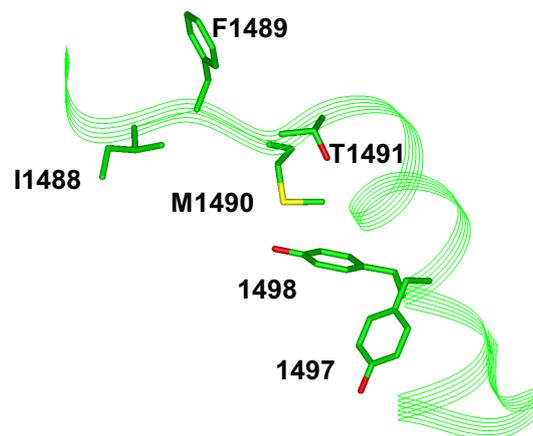


Bild 1.6: NMR-Konformation des zentralen Bereichs des Inaktivierungs-Loops (Darstellung eines Bändermodells) (PDB: 1byy [18]). Ile1488, Phe1489 und Met1490 bilden das IFM-Motiv. Die Aminosäuren sind nach Atomtypen gefärbt: Kohlenstoffe grün, Sauerstoffe rot, Schwefel gelb.

Der Rezeptor für den Inaktivierungs-Loop liegt im Bereich der inneren Pore und besteht aus mehreren Peptidsegmenten. Bestandteile dieses Rezeptorkomplexes sind vermutlich die Loops IIS4-S5 und IVS4-S5 sowie das intrazelluläre Ende des Segments IVS6 [4].

Neben der Aktivierung ist auch der Inaktivierungsprozess spannungsabhängig. Dabei ist dies in erster Linie auf die Kopplung der zwei Prozesse zurückzuführen, denn für beide ist die transmembranäre Bewegung der Spannungssensoren, durch die das Kanalprotein einschließlich des Inaktivierungs-Loops seine Konformation verändert, von entscheidender Bedeutung [20]. Infolge der Veränderungen kommt es zur Öffnung der Pore und wahrscheinlich auch zur Bildung einer günstigeren Rezeptorkonformation [21].

In Hinblick auf die Bedeutung im Inaktivierungsprozess konnten für die S4-Segmente der homologen Domänen I-IV deutliche Unterschiede festgestellt werden. So konnte für das S4-Segment der Domäne II nur eine untergeordnete Rolle im Inaktivierungsprozess festgestellt werden [22]. Im Gegensatz dazu scheint das Segment IVS4 eine besonders wichtige Funktion bei der Inaktivierung zu besitzen, denn Mutationen von positiv geladenen Aminosäuren führten hier zu einem verlangsamten Ablauf [23]. Chahine et al. vermuten, dass diesem Segment eine Rolle als Auslöser der Inaktivierung durch Kopplung an den Aktivierungsprozess zukommt. Hierfür spricht auch die Interaktion mit α -Skorpion-, Seeanemonen- und Trichternetzspinnen-Toxinen, die durch Bindung im Loopbereich IVS3-S4 die Inaktivierung hemmen.

Darüber hinaus bleiben im inaktivierten Zustand des Kanals, durch die Bindung des Inaktivierungs-Loops an seinen Rezeptor, die S4-Segmente der Domänen III und IV in der auswärtigen Position immobilisiert. Deshalb wird vermutet, dass speziell ihre Auswärtsbewegung notwendig sein könnte, damit die Inaktivierung ermöglicht wird. Ihre Ausgangsposition erlangen die Segmente IIS4 und IVS4 erst im weiteren Verlauf der Repolarisationsphase nach der Ablösung des Inaktivierungs-Loops von seinem Rezeptor wieder [10][24].

1.2.4 Interaktionen mit Toxinen

Toxine können durch Interaktion mit unterschiedlichen Bindungsstellen die Funktion des Natriumkanals beeinflussen, wobei bisher mindestens sechs verschiedene Bindungsstellen identifiziert wurden [25]. Im Folgenden sollen die Bindungsstellen 3 und 4 vorgestellt werden.

1.2.4.1 β -Skorpion-Toxine

β -Skorpion-Toxine interagieren mit der Bindungsstelle 4 des Natriumkanals. Sie verschieben den Schwellenwert der Aktivierung hin zu einem niedrigeren Membranpotential, wodurch sich eine leichtere Aktivierbarkeit des Kanals ergibt. Dabei zeigen sie keinen Einfluss auf die Inaktivierung [3].

Cestèle et al. [26] konnten durch Mutationsstudien an rIIA¹-Natriumkanälen mehrere extrazelluläre Loops identifizieren, die zum Rezeptorkomplex der β -Skorpion-Toxine beitragen. Hierbei besitzt die Domäne II eine besondere Bedeutung, denn Mutationen in den Loops IIS1-S2 und IIS3-S4 verringerten die Bindungsaffinität der Polypeptide. Einen besonders ausgeprägten Effekt zeigten dabei Veränderungen im Loop IIS3-S4. Von diesen Beobachtungen ausgehend, beschreiben Cestèle et al. den Einfluss auf den Schwellenwert der Aktivierung durch das *voltage-sensor-trapping*-Modell (Spannungssensor-Falle). Hierbei wird der Spannungssensor IIS4 in seiner aktivierten, auswärtigen Position durch Wechselwirkung mit dem rezeptorgebundenen Toxin gehalten, wodurch der normale kinetische Ablauf des Öffnungsprozesses gestört wird. Die Bindung des β -Skorpion-Toxins alleine zeigt dabei keinen Einfluss auf die Aktivierung. Der Effekt tritt erst nach einer Aktivierung durch Depolarisation der Membran ein.

¹ Typ IIA-Natriumkanäle aus Rattenhirn

1.2.4.2 Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine

Das Prinzip des *voltage-sensor-trappings* findet man auch bei Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxinen, die mit der Bindungsstelle 3 eine gemeinsame oder eventuell nur überlappende Bindungsstelle besitzen. Durch die Interaktion mit dem Natriumkanal können diese Polypeptide den Inaktivierungsprozess hemmen, dabei beeinflussen sie die Aktivierung nur gering [27].

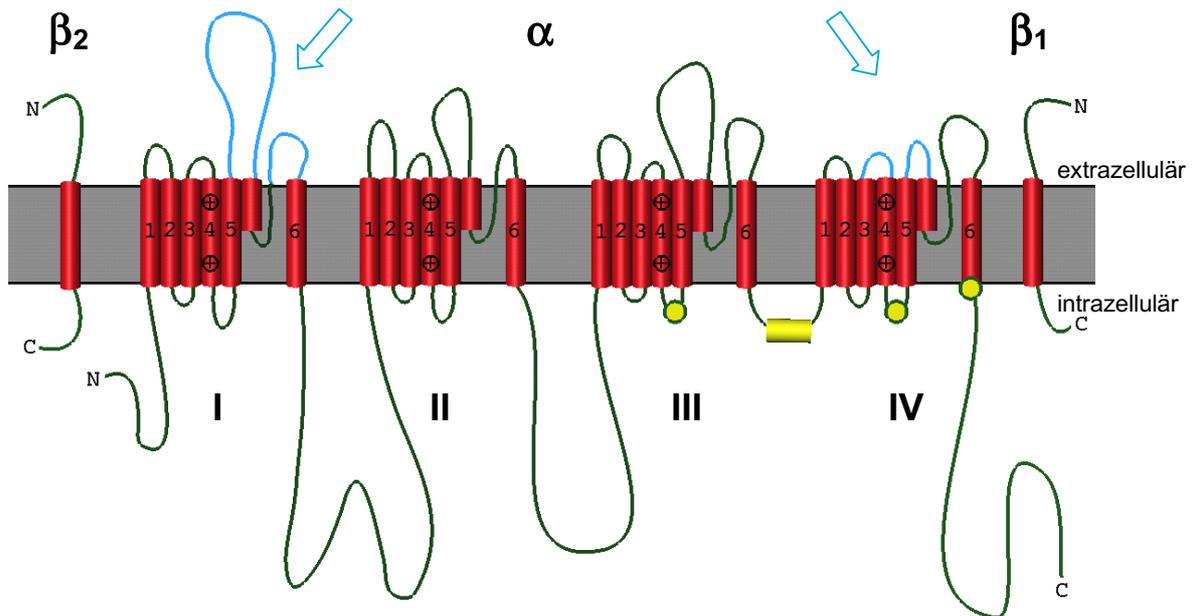


Bild 1.7: Schematische Darstellung der Untereinheiten (α , β_1 , β_2) des Natriumkanals. Durch Pfeile markiert sind die Bereiche, die einen Teil des Rezeptorkomplexes der Bindungsstelle 3 bilden (Loops IS5-SS1, ISS2-S6, IVS3-S4, IVS5-SS1).

Die genaue Topologie der Bindungsstelle 3 ist nicht bekannt. Zudem gibt es derzeit keine Erklärung, warum Seeanemonen-Toxine α -Skorpion-Toxine kompetitiv verdrängen können, dies umgekehrt aber nicht möglich ist. Als Bereiche des Rezeptorkomplexes, dargestellt in Bild 1.7, wurden durch Untersuchungen mit α -Skorpion-Toxinen die Loops IS5-SS1 und ISS2-S6 der Domäne I sowie der Loop IVS5-SS1 der Domäne IV identifiziert [29][30].

Rogers et al. [31] konnten durch Mutationsstudien am Natriumkanal einen weiteren Loop finden, der für die Bindung sowohl der α -Skorpion- als auch der Seeanemonen-Toxine eine Rolle spielt. Dieser Loop IVS3-S4, der die Segmente S3 und S4 der Domäne IV verbindet, ist in Bezug auf die Bindung der Toxine aus zwei Gründen von besonderem Interesse. Zum einen fanden

Rogers et al. in diesem Bereich¹ negativ geladene Aminosäuren (Glu1613, Glu1616), die die Bindung der Polypeptide beeinflussen. Dies könnte auf mögliche Interaktionen mit speziellen Aminosäuren der Toxine hinweisen, denn bei diesen konnten wichtige Funktionen für basische Aminosäuren gezeigt werden. Zum anderen ergab die Bindung im Bereich des Spannungssensors IVS4 einen möglichen Hinweis auf den Wirkmechanismus der Toxine. Chahine et al. hatten bereits eine besondere Bedeutung des IVS4-Segments hinsichtlich der Kopplung des Aktivierungs- und Inaktivierungsprozesses feststellen können [23]. Weiterhin ergaben Untersuchungen von Nonner [32] und Neumcke et al. [33], dass α -Skorpion- und Seeanemonen-Toxine die Bewegung von Ladungen bei der Aktivierung des Kanals teilweise blockieren. Sheets et al. [34] konnten später noch detaillierter zeigen, dass durch die Polypeptide vor allem die Ladungsveränderung blockiert wird, die sich aus der Bewegung des IVS4-Segments ergibt. Yang et al. zeigten ferner, dass sich das Segment IVS4 während der Depolarisationsphase der Membran in Richtung Extrazellulärraum bewegt [35]. Ausgehend von diesen Beobachtungen liegt die Vermutung nahe, dass die Toxine die konformatorischen Veränderungen des Kanals inhibieren, die für die Inaktivierung notwendig sind [31][34]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Bindungsaffinität der Seeanemonen- und α -Skorpion-Toxine mit zunehmender Depolarisation der Membran abnimmt [31][36]-[39]. Dieses spannungsabhängige Bindungsverhalten und die Inhibierung des Inaktivierungsprozesses durch die Toxine lassen auf eine Veränderung der Rezeptorstelle 3 in Abhängigkeit vom Membranpotential schließen.

Zusammenfassend postulierten Rogers et al. auch für die Seeanemonen- und α -Skorpion-Toxine das *voltage-sensor-trapping*-Modell als Wirkmechanismus. Allerdings wird hier durch die Toxine das Segment IVS4 in seiner Auswärtsbewegung gehindert und so in einer Position stabilisiert, die zwar die Aktivierung des Kanals erlaubt, dabei aber die Inaktivierung nicht ermöglicht.

Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine, die sogenannten *site 3-Toxine*², sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden soll eine Übersicht für die drei Verbindungsklassen gegeben werden.

¹ Der untersuchte Loop besteht aus den Aminosäuren 1613-1626 des Typ IIA-Natriumkanals aus Rattenhirn.

² *site* = engl. für Bindungsstelle

1.3 Seeanemonen-Toxine

1.3.1 Seeanemonen

Seeanemonen sind weit verbreitet. Man findet sie im Atlantischen, Pazifischen und Indischen Ozean sowie im Mittelmeer und im Schwarzen Meer. Wie andere Mitglieder des Stammes der Cnidaria (Nesseltiere) besitzen Seeanemonen zahlreiche Tentakel, an denen spezialisierte Zellen lokalisiert sind, die Cnido-blasten. In diesen sogenannten Bildungszellen findet man die Nesselkapseln (Nematocysten), aus denen bei mechanischer oder chemischer Reizung der Nesselschlauch herausgeschleudert wird, der sich dann wie eine Harpune in die Haut des Opfers bohrt. Dabei wird ein Gift ausgeschüttet, das potente Toxine enthält und zur sofortigen Paralyse des Opfers führt. Seeanemonen nutzen das Gift zum Beutefang (kleine Fische, Crustaceen wie Krebse und Garnelen) und als Verteidigung gegen eventuelle Räuber. Solitär vorkommende Formen der Anemonen setzen ihr Gift auch zur intraspezifischen Abwehr ein (Review s. [40]).



Bild 1.8: Abbildung der Seeanemone *Anthopleura xanthogrammica* (www.ncrcn.org). Die Anemone wird auch als *Giant Green Anemone* (grüne Riesenanemone) bezeichnet.

Beim Menschen können nach Kontakt mit den Tentakeln neben lokalen Schmerzen und Rötungen in seltenen Fällen auch systemische Symptome wie Muskelspasmen, Lähmungen und Atemnot auftreten. Besonders gefährlich sind je nach Disposition des Betroffenen allergische Reaktionen, die zum anaphylaktischen Schock führen können.

Gifte sind Vielstoff-Gemische, in denen sehr unterschiedliche, biologisch aktive Verbindungen gefunden werden. Die Produktion von bioaktiven Polypeptiden, die an verschiedenen Rezeptoren angreifen und zudem für unterschiedliche Spezies (Crustaceen, Säuger) toxisch sind, bringt dem Produzenten einen deutlichen evolutionären Selektionsvorteil. Das Prinzip der toxischen Vielfalt ist aus diesem Grund weit verbreitet. So konnten bei *Anemonia sulcata* neben den fünf Toxinen ATXI bis ATXV und vier Isotoxinen¹, Protease-Inhibitoren sowie die beiden blutdrucksenkenden Polypeptide BDSI und BDSII isoliert werden (Referenzen s. [41]).

Die Toxine ATXI bis ATXV sind im Gift von *A. sulcata* für die positiv inotrope Wirkung [42] und die neurotoxischen Effekte verantwortlich. Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass die Verbindungen positiv inotrop wirksam sind, ohne dabei einen signifikanten Effekt auf die Herzfrequenz und den Blutdruck zu besitzen [43][44]. Die Polypeptide binden an den spannungsabhängigen Natriumkanal und hemmen in erster Linie seine Inaktivierung.

Die positiv inotrope Wirkung kann vermutlich auf die höhere intrazelluläre Natriumionen-Konzentration infolge des verlängerten Aktionspotentials zurückgeführt werden. Hierdurch könnte der Natrium/Calcium-Austauscher aktiviert werden, durch den verstärkt Calciumionen in die Zelle transportiert würden [45]. Eine höhere intrazelluläre Calciumionen-Konzentration könnte den positiv inotropen Effekt auslösen. Andere Autoren vermuten allerdings, dass die höhere Natriumionen-Konzentration eine Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum induziert [40].

1.3.2 Toxine

Man unterscheidet bei den Seeanemonen-Toxinen grundsätzlich drei Gruppen (s. Bild 1.9, A und B). Die langkettigen Polypeptide (46-49 Aminosäuren) sind in zwei Gruppen aufgeteilt: Typ 1- und Typ 2-Toxine. Die dritte Gruppe beinhaltet die kurzkettigen (27-31 Aminosäuren) Verbindungen [40]. Eine Einteilung der langkettigen Toxine nach Typ 1 bzw. Typ 2 erfolgt aufgrund der Sequenzhomologien und der immunologischen Kreuzreaktion.

¹ Isotoxine sind Polypeptide, die sich in einer Aminosäure unterscheiden.

A) Langkettige Seeanemonen-Toxine

Typ 1-Toxine

ApA	:	(1)	GVSCLCDS DGPSV RGNTLSGTLWL YPSGCP SGWHNC KA HGPTIGWCC KQ	(49)
ApB	:	(1)	GVPCLCDS DGPR PRGNTLSGILWFYPSGCP SGWHNC KA HGPNIGWCC KQ	(49)
ApC	:	(1)	GVPCLCDS DGPSV RGNTLSGILWL--AGCPSGWHNC KA HGPTIGWCC KQ	(47)
AftI	:	(1)	GVAACL CDS DGPNV RGNTLSGTIWL--AGCPSGWHNC KA HGPTIGWCC KQ	(47)
AftII	:	(1)	GGVPCLCDS DGPSV RGNTLSGIIWL--AGCPSGWHNC KA HGPTIGWCC KQ	(48)
ATXIa	:	(1)	GAACLCKSDGPNTRGNSMSGTIWV--FGCPSGWNNCEGRA-IIGYCC KQ	(46)
ATXII	:	(1)	GVPCLCDS DGPSV RGNTLSGIIWL--AGCPSGWHNC KKHGPTIGWCC KQ	(47)
ATXV	:	(1)	GVPCLCDS DGPSV RGNTLSGILWL--AGCPSGWHNC KKHKPTIGWCC K	(46)

Typ 2-Toxine

ShI	:	(1)	AACKCDDEGPD IRTAPLTGTVD--LGSCNAGWEK CASYYTIIADCC RKKK	(48)
RTXI	:	(1)	ASCCKDDDGPDVRSATFTGTVD--FAYCNAGWEK CLAVYTPVASCC RKKK	(48)
RTXII	:	(1)	GTCKCDDDGPDVRTATFTGSTE--FANCNE SWEK CLAVYTPVASCC RKKK	(48)
RTXIII	:	(1)	GNCKCDDDEGPYVRTAPLTGYVD--LGYCNEGW EK CASYYSPIAECC RKKK	(48)
RTXIV	:	(1)	GNCKCDDDEGPNVRTAPLTGYVD--LGYCNEGW DK CASYYSPIAECC RKKK	(48)
RTXV	:	(1)	GNCKCDDDEGPNVRTAPLTGYVD--LGYCNEGW EK CASYYSPIAECC RKK	(47)
RPII	:	(1)	ASCCKDDDGPDVRSATFTGTVD--FWNCNEGW EKCTAVYTPVASCC RKKK	(48)
RPIII	:	(1)	GNCKCDDDEGPNVRTAPLTGYVD--LGYCNEGW EK CASYYSPIAECC RKKK	(48)

B) Kurzkettige Seeanemonen-Toxine

ATXIII	:	(1)	RS-CCPC----YWG GCPW GQNCYP E-GCSGPKV	(27)
PaTx	:	(1)	AGGKSTCCPCAMCKYTAGCPW GQ-CAHHC GCS	(31)

C) Sonstige Polypeptide

BDSI	:	(1)	AAPCFCSGKPGR GDLWILRGTC PGGYGYTSNCYKWPNICCYPH	(43)
BDSII	:	(1)	AAPCFCPGKPD R GDLWILRGTC PGGYGYTSNCYKWPNICCYPH	(43)

Bild 1.9: Sequenzen der aus Seeanemonen isolierten Polypeptide. **(A)** Alignment der langkettigen Toxine, unterteilt in Typ 1 und Typ 2. ATXI kommt in zwei Isotoxinen vor: ATXIa/b (3A/3P); **(B)** Alignment der beiden kurzkettigen Toxine; **(C)** aus *Anemonia sulcata* isolierte, antihypertensiv wirkende Polypeptide.

Die Namensgebung entspricht der SWISS-PROT-Datenbank [46]. Aufgrund einer neueren Einteilung der Seeanemonen werden auch Synonyme der Toxine gefunden, die hier aber nicht berücksichtigt werden. ApA, ApB aus *Anthopleura xanthogrammica* (SWISS-PROT: TXAA_ANTXA, TXAB_ANTXA); ApC aus *Anthopleura elegantissima* (TXAC_ANTEL); AftI, AftII aus *Anthopleura fuscoviridis* (TXA1_ANTFU, TXA2_ANTFU); ATXIa, ATXII, ATXIII, ATXV aus *Anemonia sulcata* (TXA1_ANESU, TXA2_ANESU, TXA3_ANESU, TXA5_ANESU); ShI aus *Stoichactis helianthus* (TXA1_STOHE); RTXI, RTXII, RTXIII, RTXIV, RTXV aus *Radianthus macrodactylus* (TXA1_RADMA, TXA2_RADMA, TXA3_RADMA, TXA4_RADMA, TXA5_RADMA); RPII, RPIII aus *Radianthus paumotensis* (TXA2_RADPA, TXA3_RADPA), PaTx aus *Parasicyonis actinostoloides* (TXA3_PARAC); BDSI (BDS1_ANESU), BDSII [47] aus *Anemonia sulcata*

Innerhalb der einzelnen Gruppen besteht dabei eine hohe Sequenzhomologie von über 60%, zwischen beiden Gruppen liegt sie nur bei etwa 30%. Diese relativ geringen Übereinstimmungen erklären die fehlende immunologische Kreuzreaktivität. Man geht zudem davon aus, dass die Bindungsstellen der beiden Gruppen nicht identisch, sondern allenfalls überlappend sind [40][48]. Dafür sprechen neben der geringen Sequenzhomologie auch Untersuchungen des kompetitiven Bindungsverhaltens. Schweitz et al. konnten zeigen, dass die beiden Typ 2-Toxine RPI und RPIII die Typ 1-Toxine ATXII und ATXV nicht an Synaptosomen aus Rattenhirn verdrängen konnten [49].

Bei den Toxinen findet man beachtliche Gewebe- und Spezies-Selektivitäten. Einige Verbindungen zeigen potente neuro- und kardiotoxische Eigenschaften bei Säugern, andere sind weitgehend Crustaceen-spezifisch.

Im Vergleich zu den α -Skorpion-Toxinen besitzen die Seeanemonen-Toxine eine höhere Affinität zum kardialen Natriumkanal von Säugern, und grundsätzlich kann man festhalten, dass Typ 1-Toxine potentere positiv inotrope Wirkstoffe als Typ 2-Toxine sind, wobei ApB die aktivste Verbindung darstellt [42][50].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem ApB und ApA¹ von *Anthopleura xanthogrammica* sowie ATXIa, ATXIII, BDSI und BDSII von *Anemonia sulcata* genauer untersucht. BDSI und BSDII sind Polypeptide, die einen blutdrucksenkenden Effekt besitzen.

1.3.2.1 Langkettige Typ 1-Toxine

ApA und ApB sind ebenso wie ATXII und ATXV sowohl für Säuger als auch für Crustaceen toxisch, wobei vor allem ApB gegenüber Säugern das wirkstärkste Toxin ist (s. Tabelle 1.1) [51]. Bindungsstudien von Schweitz et al. haben ergeben, dass ApA, ApB und ATXV die Bindung von ATXII an Synaptosomen aus Rattenhirn kompetitiv inhibieren [51]. Zudem konnte dieselbe Arbeitsgruppe ein kompetitives Bindungsverhalten für ATXII und ATXV gegenüber AaHII, einem für Säuger toxischen α -Skorpion-Toxin von *Androctonus australis* Hector, feststellen. Ebenfalls an Synaptosomen aus Rattenhirn verhindert ATXII die Bindung von LqqV, einem α -Skorpion-Toxin von *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* [37]. Durch diese Experimente gilt als gesichert, dass die

¹ Synonyme von ApB und ApA sind Anthopleurin B und A

Seeanemonen-Toxine vom Typ 1 und die α -Skorpion-Toxine an derselben oder zumindest überlappenden Bindungsstelle des spannungsabhängigen Natriumkanals angreifen. Bisher gibt es allerdings keine Erklärung für die Beobachtung, dass umgekehrt Skorpion-Toxine wie AaHII gebundenes ATXV nicht vom Rezeptor verdrängen können [52][53].

Tabelle 1.1: Pharmakologische Eigenschaften der Seeanemonen-Toxine [51]: Toxizität (LD) und Affinität (K_d)

Toxin	LD ₅₀ (Mäuse) [μ g/kg]	LD ₁₀₀ (Krabben) [μ g/kg]	K_d (Rattenhirn) ^a [nM]
ATXI	> 4 000	4,4	7 000
ATXII	100	3,7	150
ATXIII	> 18 000	6,7	> 10 000
ATXV	19	10,4	50
ApA	66	22	120
ApB	8	78	35

^a K_d gegen ¹²⁵I-ATXII

ATXI¹ und das kurzkettige Toxin ATXIII haben sich als praktisch untoxisch für Mäuse erwiesen, und auch die Bindung an Synaptosomen aus Rattenhirn erfolgt erst bei sehr hohen Konzentrationen (s. Tabelle 1.1). Eine kompetitive Bindung von ATXIII gegenüber ATXII sowie von ATXI und ATXIII gegenüber dem α -Skorpion-Toxin AaHII konnten Schweitz et al. nicht feststellen [51]. ATXI und ATXIII sind zwar für Säuger untoxisch, besitzen dafür aber eine hohe Toxizität gegenüber Crustaceen.

1.3.2.2 Kurzkettige Typ 1-Toxine

Aus der Klasse der kurzkettigen Toxine wurde neben ATXIII bisher lediglich PaTx von *Parasicyonis actinostoloides* isoliert. Zwischen ATXIII und PaTx findet man eine relativ hohe Sequenzidentität von 18 Aminosäuren, und es konnte gezeigt werden, dass beide Toxine an *Grayfish-giant*² Axonen kompetitiv binden (Review s. [40]). Die Ähnlichkeit zu den langkettigen Toxinen ist sehr begrenzt. Trotzdem kann PaTx kompetitiv sowohl zu ApA als auch zu LqqV an *Grayfish-giant* Axonen binden [38]. Wie bei den Seeanemonen-Toxinen des Typs 1 und

¹ Von ATXI sind zwei Isotoxine bekannt. Bei ATXIa, das in der Regel zu 80% vorliegt, findet man Ala3, bei ATXIb Pro3 (SWISS-PROT-Datenbank: TXA1_ANESU).

² Haiart

den α -Skorpion-Toxinen wird auch bei diesen beiden Toxinen die Bindungsaffinität mit zunehmender Depolarisation der Membran verringert [38].

1.3.2.3 BDSI und BDSII

Die bisher beschriebenen Seeanemonen-Toxine hemmen die Inaktivierung des spannungsabhängigen Natriumkanals und zeigen dadurch positiv inotrope sowie neurotoxische Effekte. Im Gegensatz dazu wirken die beiden Polypeptide BDSI und BDSII antihypertensiv und antiviral. Zudem kann BDSII an isolierten Herzpräparaten vom Schwein einen leichten negativ inotropen Effekt verursachen [47].

```
BDSII (1) AAPCFCPGK-P-DR-----GDLWILR--GTCPPGGYGYTSNCKYK--PNI--CCYPH(43)
ApA (1) GVSCLCSDGSPVRGBNTLSGTLW-LYPSG-CPSGW---HNC-KAHGPTIGWCCKQ (49)
```

Bild 1.10: Alignment von BDSII mit ApA. Man findet 19 identische Aminosäuren.

BDSII zeigt deutlich sequentielle Ähnlichkeiten zu den langkettigen Typ 1-Toxinen (s. Bild 1.10). Zudem kann es kompetitiv ApA an Synaptosomen aus Rattenhirn verdrängen [47]. Deshalb vermuten Llewellyn et al., dass BDSII als Antagonist an der Bindungsstelle 3 des spannungsabhängigen Natriumkanals betrachtet werden kann. Dies könnte auch bedeuten, dass durch den Angriff am Natriumkanal die negativ inotrope und antihypertensive Wirkung von BDSI und BDSII vermittelt wird. Diese These stützt Llewellyn auf die Eigenschaften der Antiarrhythmika der Klasse I, den Natriumkanal-Blockern, die durch Senkung des Natriumionen-Einstroms in die Zellen ihren negativ inotropen Effekt auslösen [47].

1.3.3 Strukturen

Bisher wurden durch NMR-Spektroskopie bestimmte Konformationen von drei langkettigen Typ 1-Toxinen in der Protein Data Bank (PDB) [54] veröffentlicht, ApA (1ahl [55]) und ApB (1apf [56]) (Toxine aus *Anthopleura xanthogrammica*) sowie ATX1a (1atx [57]) (aus *Anemonia sulcata*). Bei ApB (s. Bild 1.11) findet man zur Stabilisierung der Struktur drei Disulfidbrücken (Cys4-Cys46, Cys6-Cys36, Cys29-Cys47) sowie ein antiparalleles Betafaltblatt bestehend aus vier Strands (2-4, 20-23, 34-37, 45-48). Neben diesen gemeinsamen Merkmalen ist für die langkettigen Seeanemonen-Toxine der flexible Loop I (s. Bild 1.12), bestehend aus den Aminosäuren 8-17, sehr charakteristisch. Er verbindet die

Strands 1 und 2 und ist wahrscheinlich an der Interaktion mit dem spannungsabhängigen Natriumkanal beteiligt (vgl. Kapitel 4.5).

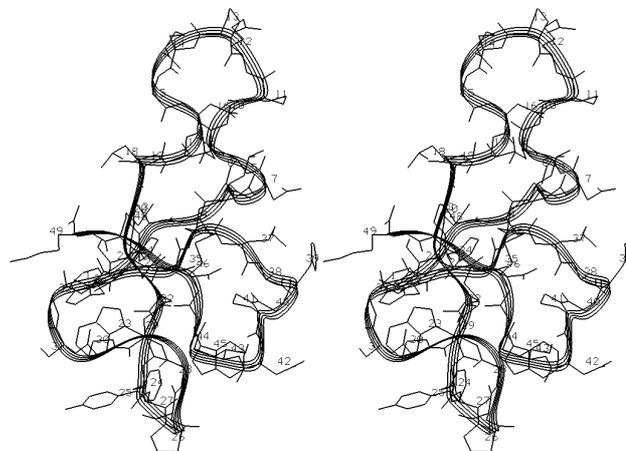


Bild 1.11: Eine NMR-Konformation (7) von ApB in Stereoansicht (PDB: 1apf) [56]. Mit Ausnahme der Wasserstoffatome sind alle Atome dargestellt.

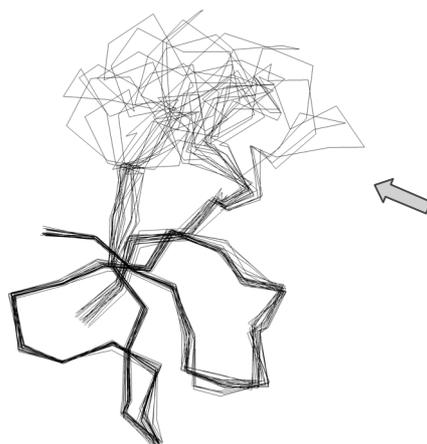


Bild 1.12: Die 20 NMR-Konformationen von ApB (1apf), überlagert auf $C\alpha$ -Atome, die sich in der Position nur gering unterscheiden (Aminosäuren 2-6, 20-26, 28-49). Der flexible Loop I ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Darüber hinaus wurden auch von ATXIII (PDB: 1ans [58]), dem kurzkettigen Polypeptid aus *Anemonia sulcata*, NMR-Konformationen veröffentlicht. Stabilisiert wird dieses Toxin (s. Bild 1.13) durch drei Disulfidbrücken (Cys3-Cys17, Cys4-Cys11, Cys6-Cys22). Man findet hier weder Faltblatt- noch Helixstrukturen. Bei den NMR-spektroskopischen Untersuchungen fiel die starke Neigung zur Bildung von Dimeren und Trimeren auf. Allerdings liegt ATXIII bei Konzentrationen bis zu 0,1 mM vornehmlich als Monomer vor. Daraus folgerten Manoleras et al., dass die biologisch aktive Form wahrscheinlich das Monomer ist [58].

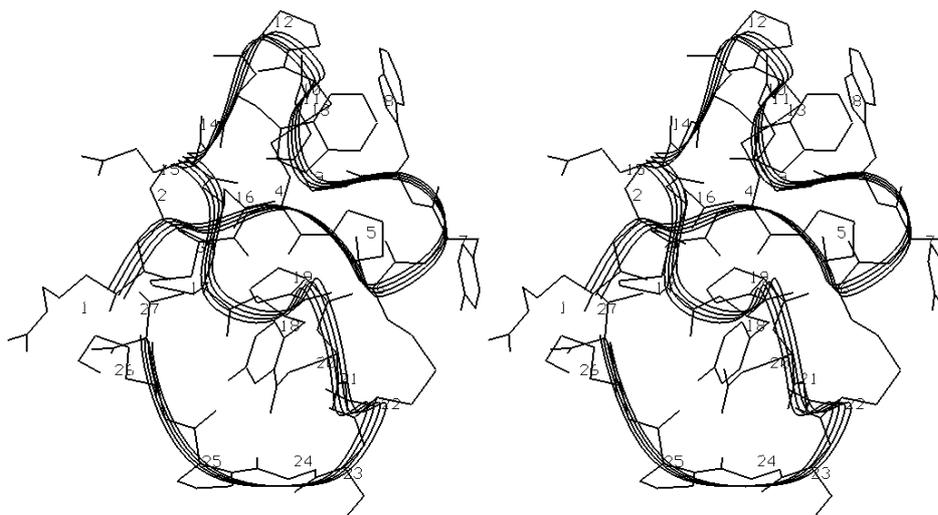


Bild 1.13: Eine NMR-Konformation von ATXIII (28) in Stereoansicht (1ans [58]). Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Driscoll et al. veröffentlichten die mittels NMR-Spektroskopie bestimmte Struktur des *Anemonia sulcata*-Polypeptids BDSI (PDB: 1bds, 2bds [59]). Die Verbindung (s. Bild 1.14) wird durch ein antiparalleles Betafaltblatt mit drei Strands (14-17, 37-41, 30-34) sowie drei Disulfidbrücken stabilisiert (Cys4-Cys39, Cys6-Cys32, Cys22-Cys40). Auffallend ist bei BDSI im Vergleich zu den langkettigen Seeanemonen-Toxinen das Fehlen des unstrukturierten Loops I, dem eine besondere Bedeutung bei der Interaktion der Toxine mit dem Natriumkanal beigemessen wird.

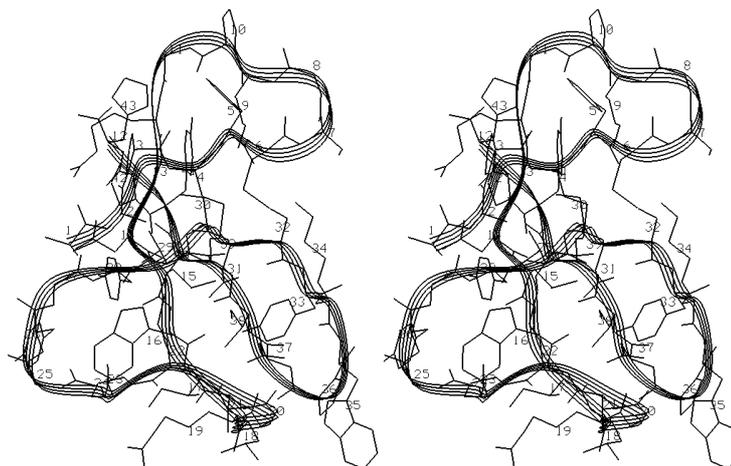


Bild 1.14: Die mittlere minimierte NMR-Konformationen von BDSI (1bds [59]) in Stereoansicht. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

1.4 Skorpion-Toxine

1.4.1 Skorpione

Die Skorpione gehören zur Klasse der Arachnida (Spinnentiere) und stellen eine evolutionär sehr alte, artenreiche Ordnung (Scorpiones) im Tierreich dar. Man unterscheidet circa 1500 Arten [60]. Die für den Menschen aufgrund ihrer neurotoxischen Sekrete gefährlichen Skorpione gehören zur Familie Buthidae. Hierzu zählen die Gattungen *Androctonus*, *Leiurus* und *Buthus*, die man vorwiegend in Nordafrika, im Mittleren Osten und in Indien antrifft. Aufgrund des Vorkommens bezeichnet man diese auch als Alte Welt-Skorpione. Besonders der Skorpion *Androctonus australis* Hector (Dickschwanz-Skorpion), der circa 10 cm Körperlänge erreicht und eine hohe Giftmenge produziert, ist für zahlreiche Todesfälle verantwortlich (s. Bild 1.15). Weitere Arten sind *Centruroides* sp., die man vor allem im Süden Nordamerikas und Zentralamerika findet, und *Tityus* sp., die vorwiegend in Südamerika vorkommen. Man spricht hier von den Neue Welt-Skorpionen (Review s. [61]).



Bild 1.15: Der Skorpion *Androctonus australis* Hector (<http://village.infoweb.ne.jp>)

Beim Menschen führt der Skorpionstich neben lokalen Schmerzen zu Störungen des vegetativen und zentralen Nervensystems. Dies äußert sich durch Ruhelosigkeit, Speichel- und Tränenfluss. Es treten Muskelkrämpfe, gastrointestinale Beschwerden, Lungenödeme und nach anfänglicher Bradykardie Tachykardie und Hypertonie auf. Der Tod tritt durch Atemlähmung oder Herzversagen ein. Schätzungen haben ergeben, dass weltweit etwa 1200 Menschen pro Jahr an einer Vergiftung durch Skorpione sterben [62]. Für diese Todesfälle sind im Skorpiongift vor allem langkettige Polypeptide verantwortlich, die durch Interaktion mit dem Natriumkanal neurotoxisch wirken [25].

1.4.2 Toxine

Skorpiongifte enthalten sehr unterschiedliche, biologisch aktive Verbindungen: Enzyme, Peptide, Lipide, Mucopolysaccharide und biogene Amine. Besonders gut untersucht sind die Polypeptide, die spezifisch mit Ionenkanälen interagieren. Hier konnten vier verschiedene Toxinfamilien gefunden werden, die jeweils an Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridkanälen angreifen (Referenzen s. [61]).

Alle bisher bekannten Natriumkanal-spezifischen Skorpion-Toxine bestehen aus 60-76 Aminosäuren. Nach ihrer Bindungsstelle und ihrem Wirkprofil werden diese langkettigen Verbindungen in α - und β -Skorpion-Toxine unterteilt. α -Toxine greifen an der Bindungsstelle 3 des Kanals an und verlängern die Dauer eines Aktionspotentials durch Verlangsamung oder Blockade des Inaktivierungsprozesses. Die Bindung erfolgt in Abhängigkeit vom Potential der Membran, wobei die Affinität bei zunehmender Depolarisation sinkt. Im Gegensatz dazu interagieren die β -Toxine unabhängig vom Membranpotential mit der Bindungsstelle 4 und bewirken eine Verschiebung des Schwellenwertes der Aktivierung zu negativerem Membranpotential [61].

Sowohl bei den α - als auch bei den β -Skorpion-Toxinen hat man Variabilitäten hinsichtlich der pharmakologischen Aktivität gegenüber bestimmten Organismen und Unterschiede in den kompetitiven Bindungseigenschaften feststellen können, so dass weitere Klassifizierungen vorgenommen wurden (Reviews s. [61][63]). Im Folgenden werden die drei wichtigsten Kategorien der α -Toxine beschrieben.

(1) Die klassischen α -Skorpion-Toxine (s. Bild 1.16) sind hochtoxisch für Säuger. Zu dieser Gruppe gehören AaHI¹, AaHII und AaHIII von *Androctonus australis* Hector sowie LqqV von *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. Dabei ist AaHII das am Säugerkanal aktivste Toxin. Klassische α -Toxine können außerdem in höheren Konzentrationen Aktivität gegen Insekten zeigen. Als charakteristische Merkmale dieser Gruppe gelten die kompetitive Verdrängung von AaHII an Synaptosomen aus Rattenhirn und die hohe Toxizität für Säuger. (2) Lqh α IT von *Leiurus quinquestriatus hebraeus* und LqqIII von *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* werden als α -Insektentoxine bezeichnet. Sie sind im

¹ Die Bezeichnung der Skorpion-Toxine ergibt sich in der Regel aus den Initialen des Skorpions sowie einer entsprechenden Nummerierung.

Gegensatz zu den klassischen Toxinen hochtoxisch für Insekten, aber nur schwach toxisch für Säuger. In dieser Gruppe ist Lqh α IT die aktivste Verbindung und wird zur Bestimmung des kompetitiven Bindungsverhaltens der Polypeptide eingesetzt.

(3) Zur Gruppe der α -ähnlichen (α -like) Toxine gehören Polypeptide, die zwar für Säuger toxisch sind, dabei aber AaHII nicht am neuronalen Natriumkanal verdrängen können. Es gibt grundsätzlich eine Vielzahl von Toxinen, die unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich der Toxizität gegenüber Säugern und Insekten und des kompetitiven Bindungsverhaltens gegenüber AaHII und Lqh α IT besitzen. Dadurch wird eine Einteilung sehr kompliziert. Zudem ist bei vielen Verbindungen das vollständige pharmakologische Profil noch nicht bekannt. Insofern sollen hier nur kurz einige α -ähnliche Toxine vorgestellt werden. BomIII und BomIV von *Buthus occitanus mardochei* sowie LqhIII von *Leiurus quinquestriatus hebraeus* sind toxisch für Säuger und Insekten. Am Insektenkanal binden sie außerdem kompetitiv zu Lqh α IT, hingegen können sie AaHII am Säugerkanal nicht verdrängen. Gilles et al. konnten für LqhIII zeigen, dass dieses Toxin an einem anderen Natriumkanal-Subtyp des Gehirns angreift als die klassischen α -Skorpion-Toxine [67]. Zudem fand diese Arbeitsgruppe durch weitere Untersuchungen mit LqhIII und dem klassischen α -Skorpion-Toxin LqhII Hinweise auf eine Subtyp-Spezifität der *site 3*-Toxine auch hinsichtlich zentraler und peripherer neuronaler Natriumkanäle [68].

In der Gruppe der klassischen β -Skorpion-Toxine findet man für Säuger hochtoxische Verbindungen wie CsslI, isoliert aus *Centruroides suffusus suffusus*, und Cn2 von *Centruroides noxius* Hoffmann. Zu den β -Skorpion-Toxinen werden zudem Insektentoxine gezählt, die einen Einfluss auf die Aktivierung besitzen. Hierzu gehören das exzitatorisch wirksame Polypeptid AaHIT und LqhIT2, das zur Untergruppe der inhibitorischen (*depressant*) Toxine gehört [63].

AaHTL1 und AaHTL3 sind untoxische Polypeptide von *Androctonus australis* Hector, die in eine immunologische Gruppe mit AaHI und AaHIII gehören, denn Antikörper gegen AaHI und AaHIII erkennen auch die antigenen Strukturen von AaHTL1 und AaHTL3 [69].

Klassische α -Skorpion-Toxine

AaHI	(1)	- K R D G Y I V P N N- C V Y H C V P P- --- C D G L C K K N- G - G S S G S C S F L V P S G L A C W C K D L P D N V P I K- D T S R K C T (63)
AaHII	(1)	- V K D G Y I V D D V N- C T Y F C G R N A - --- Y C N E E C T K L - K - G E S G Y C Q W A S P Y G N A C Y K L P D H V R T K- G P G - R C H * (64)
AaHIII	(1)	- V R D G Y I V N S K N - C V Y H C V P P- --- C D G L C K K N- G - A K S G S C G F L I P S G L A C W C V A L P D N V P I K- D P S Y K C H S (64)
Lq α V	(1)	- L K D G Y I V D D K N- C T F F C G R N A - --- Y C N D E C K K K - G - G E S G Y C Q W A S P Y G N A C W C Y K L P D R V S I K- E K G - R C N * (64)
Lq β II	(1)	- I K D G Y I V D D V N- C T Y F C G R N A - --- Y C N E E C T K L - K - G E S G Y C Q W A S P Y G N A C Y K L P D H V R T K- G P G - R C H * (64)
BotIII	(1)	- V K D G Y I V D D R N- C T Y F C G R N A - --- Y C N E E C T K L - K - G E S G Y C Q W A S P Y G N A C Y K V P D H V R T K- G P G - R C N * (64)

α -Insektentoxine

Lq α IT	(1)	- V R D A Y I A K N Y N - C V Y E C F R D A - --- Y C N E L C T K N - G - A S S G Y C Q W A G K Y G N A C W C Y A L P D N V P I R- V P G - K C R (64)
Lq β III	(1)	- V R D A Y I A K N Y N - C V Y E C F R D S - --- Y C N D L C T K N - G - A S S G Y C Q W A G K Y G N A C W C Y A L P D N V P I R- V P G - K C H (64)

α -ähnliche Toxine

BomII	(1)	- G R D G Y I A O P E N - C V Y H C F P G S S- --- G C D T L C K E K - G - A T S G H C G F L P G S G V A C W C D N L P N K V P I V- V G G E K C H (66)
BomIV	(1)	- G R D A Y I A O P E N - C V Y E C A K N S - --- Y C N D L C T K N - G - A K S G Y C Q W L G K Y G N A C W C E D L P D N V P I R- I P G - K C H F* (65)
Lq β III	(1)	- V R D G Y I A O P E N - C V Y H C F P G S S- --- G C D T L C K E K - G - G T S G H C G F K V G H G L A C W C N A L P D N V G I I- V E G E K C H S* (67)

Klassische β -Skorpion-Toxine

CssII	(1)	- K E G Y L V S K S T G C K Y E C L K L G D N D Y C L R E C K Q Q Y G K S S G G Y C - --- Y A F A C W C T H L Y E Q A V V W P L P N K T C N (66)
Cn2	(1)	- K E G Y L V D K N T G C K Y E C L K L G D N D Y C L R E C K Q Q Y G K G A G G Y C - --- Y A F A C W C T H L Y E Q A I V W P L P N K R C S * (66)

Sonstige Polypeptide

AaHTL1	(1)	- V R D G Y F V E P D N - C V I Y C M P S S E- --- V C D R G C K H N - G - A T S G T C K E F S K G G N V C W C K G L P D N A P I Y- D E S K Q C T (66)
AaHTL3	(1)	- V R D G Y F V E P D N - C V V H C M P S S E- --- M C D R G C K H N - G - A T S G S C K A F S K G G N V C W C K G L P D N S P I Y- A E S K Q C T (66)

Bild 1.16: Alignment (CLUSTALW [64]) der aus Skorpionen isolierten Polypeptide. Durch einen Stern (*) gekennzeichnet sind die Toxine mit amidierter C-terminaler Carboxylatgruppe. AaHI (SWISS-PROT-Datenbank: SCX1_ANDAU), AaHII (SCX2_ANDAU), AaHIII (SCX3_ANDAU), AaHTL1/3 [69] aus *Androctonus australis Hector*; Lq α III (SCX3_LEIQU), Lq α V (SCX5_LEIQU) aus *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*; Lq β III (SCL3_LEIQH), Lq β HT (SCXA_LEIQH), Lq β HT [65] aus *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; BotIII aus *Buthus occitanus tunetanus* (SCX3_BUTOC); BomIII [66], BomIV (SCX3_BUTOM) aus *Buthus occitanus mardochei*; CsslI aus *Centruroides suffusus suffusus* (SCX2_CENSU); Cn2 aus *Centruroides noxius Hoffmann* (SCX2_CENNO)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in erster Linie die α -Skorpion-Toxine untersucht. Neben dem gegenüber Säugern aktivsten klassischen α -Toxin AaHII wurde LqqV einbezogen. AaHII kann zudem in höherer Konzentration Lqh α IT am neuronalen Kanal der Kakerlaken kompetitiv verdrängen [25]. Lqh α IT hingegen ist das wirkstärkste α -Insektentoxin und zeigt in sehr hoher Konzentration eine gewisse Toxizität gegenüber Säugern. Obwohl AaHII und Lqh α IT offensichtlich am Insektenkanal an der gleichen oder zumindest überlappenden Bindungsstelle angreifen, kann Lqh α IT AaHII an Kanälen aus Rattenhirn nicht verdrängen [25]. Zum Vergleich der α - und β -Skorpion-Toxine wurde zudem das β -Toxin Cn2 untersucht, das trotz der hohen Sequenzhomologie signifikante Unterschiede zu AaHII zeigen müsste, da Cn2 an einer anderen Bindungsstelle angreift und einen anderen pharmakologischen Effekt besitzt.

1.4.3 Strukturen

Bisher sind 13 dreidimensionale Strukturen von Natriumkanal-aktiven Skorpion-Toxinen in der Protein Data Bank (PDB) veröffentlicht worden (1aho/1ptx (AaHII), 1snb (BmK M8), 1sn1/1djt (BmK M1), 1chz (BmK M2), 1sn4 (BmK M4), 1lqh/1lqi (Lqh α IT), 1lqq (LqqIII), 1nra/1nrb (Cse-V), 1vna/1vnb (Cse-V1), 2sn3 (Cse-V3), 1bcg (Bjxtr-IT), 1cn2 (Cn2), 1b3c/2b3c (Cse-I)).

Auffallend ist dabei, dass alle Toxine ein konserviertes Grundgerüst besitzen, das aus einer α -Helix, einem antiparallelen Betafaltblatt mit drei Strands ($\beta\alpha\beta\beta$ -Motiv) sowie vier Disulfidbrücken besteht. Dabei wird die Position der Helix relativ zum Strand 3 durch zwei Disulfidbrücken bestimmt. Ebenfalls stabilisierend wirken die aromatischen Aminosäuren der konservierten hydrophoben Oberfläche¹ (CHS). Tyr5, Tyr35 und Tyr47 sind bei AaHII jeweils Bestandteile der Strands 1, 2 und 3. Sie stehen orthogonal zueinander und bilden dadurch eine sogenannte Herringbone-Anordnung, die für Lösungsmittel exponierte, aromatische Aminosäuren eine energetisch günstige Konformation darstellt [70]. Bei Bj-xtrIT von *Buthus judaicus*, einem exzitatorisch wirksamen Insektentoxin, fand man zusätzlich eine zweite Helix.

¹ Die *conserved hydrophobic surface* (CHS) besteht bei AaHII aus den Aminosäuren Tyr5, Tyr35, Tyr42, Tyr47 und Tyr49.

Die langkettigen Skorpion-Toxine besitzen so ein konserviertes Grundgerüst ($\beta\alpha\beta$ -Motiv), mit dem durch Variationen in Loopbereichen die phylogenetische Selektivität und die verschiedenen biologischen Aktivitäten erreicht werden. Dadurch kann ohne größere Veränderungen in den Molekülen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Organismen und Rezeptoren angegriffen werden.

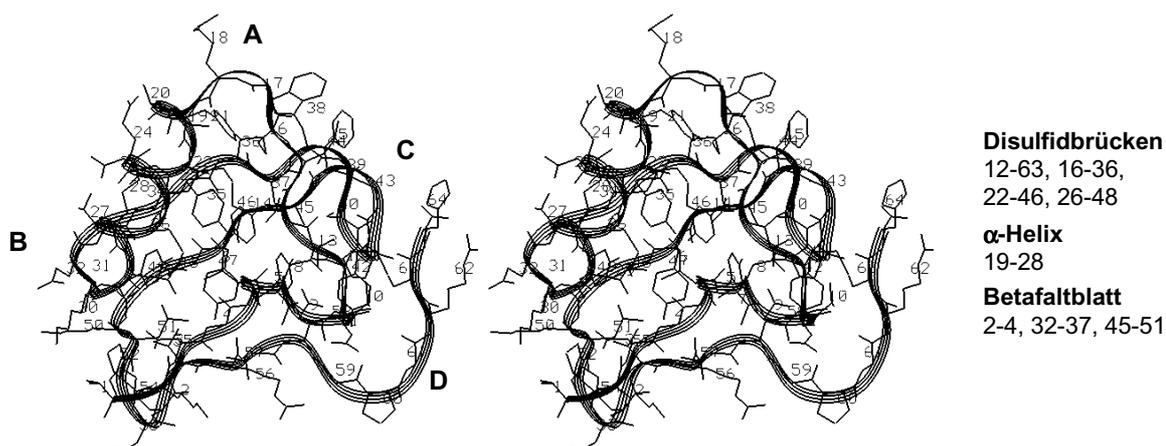


Bild 1.17: Kristallstruktur (Stereoansicht) des α -Skorpion-Toxins AaIII, die mit einer Auflösung von 0,96 Å aufgeklärt wurde (1aho [71]). Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

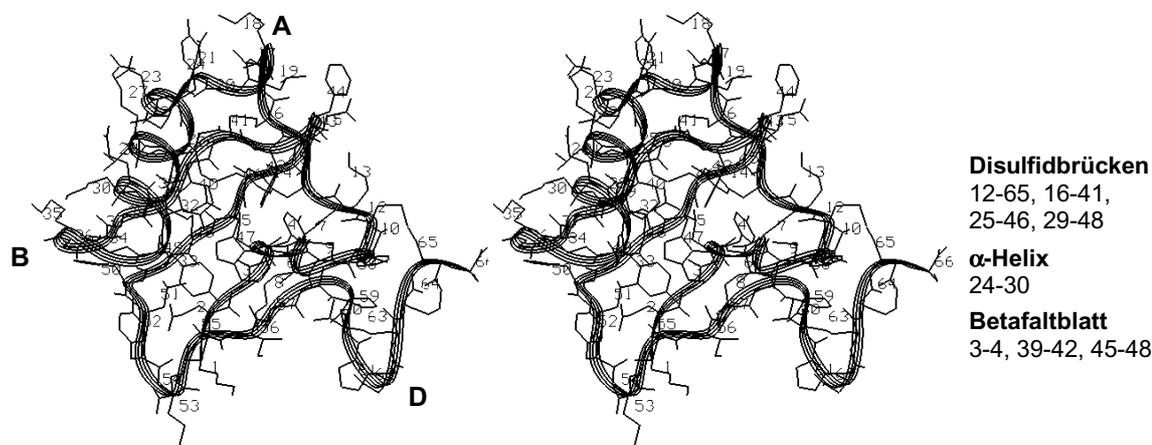


Bild 1.18: Eine NMR-Konformation (1) des β -Skorpion-Toxins Cn2 (1cn2 [72]) in Stereoansicht. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Die Kristallstruktur von AaIII, einem klassischen α -Toxin von *Androctonus australis* Hector, konnte mit einer Auflösung von 0,96 Å bestimmt werden (1aho) [71]. Charakteristisch ist der durch die Aminosäuren 38-44 gebildete β -hairpin (s. Bild 1.17, C), der nicht in den Strukturen der β -Skorpion-Toxine wie Cn2 (s. Bild 1.18) gefunden wird [72]. Es wird vermutet, dass dieser Loop hinsichtlich der α -Typ-Aktivität von Bedeutung ist [61].

Weitere Unterschiede zwischen den α - und β -Skorpion-Toxinen (s. Bild 1.17 und Bild 1.18) ergeben sich in den Bereichen unmittelbar vor (A) und nach (B) der Helix. Auffallend sind außerdem die ungleichen Konformationen der C-Termini (D) bei AaHII und Cn2. In der durch NMR-Spektroskopie aufgeklärten Struktur von Cn2 konnte eine mögliche Ursache für diese Abweichung gefunden werden, denn hier ergab sich für die Peptidbindung zwischen Trp58 und Pro59 eine cis-Konformation (1cn2). Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Skorpion-Toxine ist die relativ stark Lösungsmittel exponiert liegende Disulfidbrücke Cys12-Cys63. Hierdurch wird mehr Variabilität im C-terminalen Bereich möglich. Ein Strukturvergleich von Cn2 mit AaHII wurde von Pintar et al. veröffentlicht [72].

1.5 Trichternetzspinnen-Toxine

1.5.1 Trichternetzspinnen

Australische Trichternetzspinnen gehören ebenso wie die Skorpione zur Klasse der Arachnida (Spinnentiere). Die meisten Arten bauen mit Seide gesponnene Röhren in den Boden oder in und an Baumstümpfen, von deren Öffnung Stolperfäden ausgehen. Man findet Trichternetzspinnen vorwiegend an der südöstlichen Küste Australiens. Die Art *Atrax robustus* (*Sydney funnel web spider*), deren Verbreitung sich im Wesentlichen auf ein Gebiet mit einem Radius von 160 km um Sydney beschränkt (Referenzen s. [73]), wird für mindestens 14 tödlich verlaufene Vergiftungen von Menschen seit 1927 verantwortlich gemacht [74]. Im Gegensatz zu anderen Giftspinnen, bei denen normalerweise die Weibchen gefährlicher sind als die Männchen, war hier in allen 14 Fällen der Biss einer männlichen Spinne die Ursache.



Bild 1.19: Die Trichternetzspinne *Atrax robustus* (www.calacademy.org)

Der Giftapparat der inklusive der Beine bis zu 8 cm groß werdenden Tiere besteht aus einem Paar Giftdrüsen mit Ausführgängen sowie zwei bis zu 5 mm langen Giftklauen (Chelizeren), mit deren Hilfe das Gift in das Opfer injiziert wird. Wichtige Symptome einer Vergiftung sind neben lokal auftretenden Schmerzen, die ausgelöst werden durch die Größe der Wunde und den niedrigen pH-Wert des Giftes [62], Muskelspasmen, Herzarrhythmien sowie Tachykardien und Sehstörungen durch Miosis. Weiterhin kommt es nach initialer Hypotonie zu einer längeranhaltenden Hypertonie, und es treten Übelkeit und Erbrechen auf. Der Tod tritt meist durch Ersticken infolge eines nicht kardiogenen Lungenödems ein [73].

Die Neurotoxine, die in den Giften der Trichternetzspinnen gefunden werden, zeigen grundsätzlich Aktivität gegenüber Insekten und Säugern. Allerdings treten in der Gruppe der Säuger nur bei Primaten und neugeborenen Mäusen Vergiftungssymptome auf. Alle anderen Wirbeltiere zeigen bei biologischer Dosis sehr geringe beziehungsweise keine Symptome. Als Ursache hierfür konnten bei diesen Spezies im Plasma Immunglobuline nachgewiesen werden (Referenzen s. [73]).

Eine ebenfalls gut untersuchte Art neben *Atrax robustus* ist *Hadronyche versuta* (*Blue Mountains funnel web spider*). Aus den Giften beider Trichternetzspinnen konnten verschiedene als Atracotoxine (ACTXs) bekannte Polypeptide isoliert werden. Auch hier gilt das Prinzip der toxischen Vielfalt. So findet man beispielsweise ω -ACTXs, die selektiv spannungsabhängige Calciumkanäle der Insekten inhibieren [75], und J-ACTXs, die ebenfalls toxisch für Insekten sind, deren Angriffspunkte allerdings bisher nicht bekannt sind. Als Ursache für die wichtigsten Primaten spezifischen Symptome einer Vergiftung wurde bei *Atrax robustus* δ -Atracotoxin-Ar1 (δ -ACTX-Ar1, syn. Robustoxin) [76] und bei *Hadronyche versuta* δ -Atracotoxin-Hv1a (δ -ACTX-Hv1a, syn. Versutoxin) [77] als potentiell tödliches Toxin identifiziert. δ -Atracotoxine interagieren mit dem spannungsabhängigen Natriumkanal.

1.5.2 Toxine

Die Toxine δ -ACTX-Ar1 und δ -ACTX-Hv1a bestehen aus 42 Aminosäuren mit einer Sequenzhomologie von 83%. Beide Polypeptide zeigen neurotoxische Effekte bei Säugern und Insekten. Das ebenfalls aus *Hadronyche versuta* isolierte Toxin δ -ACTX-Hv1b zeigt einen etwa 15-30fach schwächeren Effekt auf die Modulation des Säugerkanals und besitzt zudem keine Aktivität am Insektenkanal [78].

```

 $\delta$ -ACTX-Ar1 : (1) CAKKRNWCGK NEDCCCPMKC IYAWYNQQGS CQTTITGLFK KC (42)
 $\delta$ -ACTX-Hv1a: (1) CAKKRNWCGK TEDCCCPMKC VYAWYNEQGS CQSTISALWK KC (42)
 $\delta$ -ACTX-Hv1b: (1) CSRS DGWCGK TEDCCCPMKC IKAWYKQNGN CQNTISAIWK NC (42)

```

Bild 1.20: Sequenzen der Trichternetzspinnen-Toxine. δ -ACTX-Ar1 aus *Atrax robustus* (SWISS-PROT-Datenbank: TXRQ_ATRRO); δ -ACTX-Hv1a (TXVS_HADVE), δ -ACTX-Hv1b (TXVB_HADVE) aus *Hadronyche versuta*

Die neurotoxische Wirkung der δ -ACTXs ist, wie bei α -Skorpion- und Seeanemonen-Toxinen, vor allem auf die Verlangsamung des Inaktivierungsprozesses von spannungsabhängigen Natriumkanälen zurückzuführen [79]-[81][39]. Es konnte gezeigt werden, dass δ -ACTX-Ar1 und δ -ACTX-Hv1a kompetitiv zu dem klassischen α -Skorpion-Toxin AaIII von *Androctonus australis* Hector an Synaptosomen aus Rattenhirn binden. Beide Atracotoxine können außerdem an neuronalen Kanälen der Kakerlaken das α -Insektentoxin Lqh α IT, isoliert aus *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, kompetitiv verdrängen [27][28]. Hieraus ergibt sich, dass δ -Atracotoxine sowohl bei Säugern als auch bei Insekten an derselben oder zumindest an einer partiell überlappenden Bindungsstelle wie α -Skorpion-Toxine binden.

1.5.3 Strukturen

Die Strukturen von δ -ACTX-Ar1 (PDB: 1qdp [82]) und δ -ACTX-Hv1a (1vtx [83]) wurden mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. Man findet bei den Polypeptiden als Sekundärstrukturelemente ein antiparalleles Betafaltblatt bestehend aus drei Strands (δ -ACTX-Ar1: Aminosäuren 6-8, 19-21, 29-32) sowie eine 3_{10} -Helix im C-terminalen Bereich von δ -ACTX-Hv1a. Diese Helix tritt bei δ -ACTX-Ar1 nicht auf [84]. Stabilisiert werden die Toxine zusätzlich durch vier Disulfidbrücken (Cys1-Cys15, Cys8-Cys20, Cys14-Cys31 sowie Cys16-Cys42).

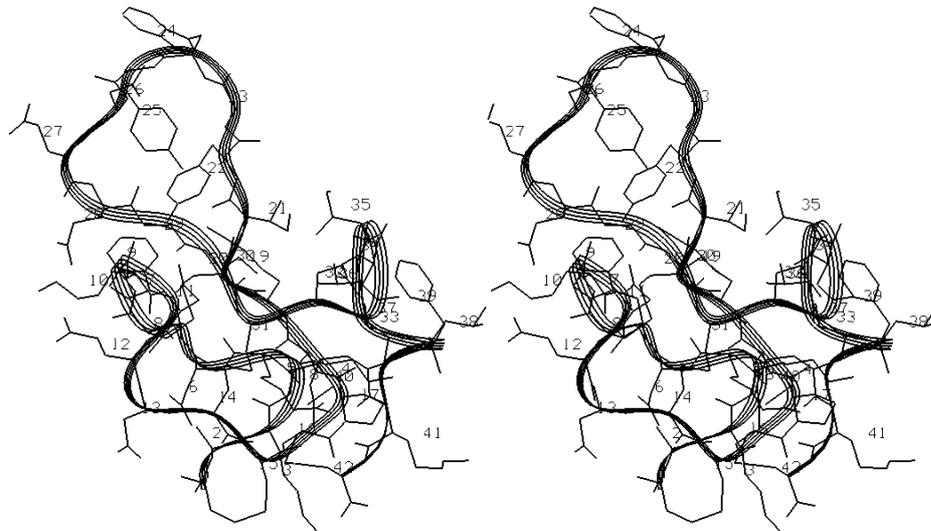


Bild 1.21: Eine NMR-Konformation (1) von δ -ACTX-Ar1 in Stereoansicht. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

1.6 Protein-Protein-Wechselwirkung

Untersuchungen von Protein-Protein-Komplexen, deren Strukturen mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt wurden, ergaben relativ große Kontaktflächen von 600-1300 Å² pro Proteinmonomer. Dabei waren jeweils die Seitenketten von 10-30 Aminosäuren beteiligt [85]-[87].

Allerdings konnte durch Alanin-Substitutionen gezeigt werden, dass nicht jede in Kontakt stehende Aminosäure einen wichtigen Beitrag zur Bindungsaffinität leistet. Clackson und Wells fanden bei Untersuchungen des humanen Wachstumshormons Somatropin¹ und der extrazellulären Domäne seines Rezeptors, dass von den 33 interagierenden Aminosäuren des Rezeptors lediglich elf einen deutlichen Einfluss auf die Affinität besitzen [88]. Den größten Beitrag zur freien Bindungsenergie ergaben dabei zwei hydrophobe Tryptophane. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch bei Untersuchungen des Hormons selbst gefunden, denn bei 31 interagierenden Seitenketten konnten bei acht ein Beitrag von annähernd 85% der freien Bindungsenergie festgestellt werden [89]. Insofern konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungsenergie bei den Protein-Protein-Komplexen nicht aus mehreren schwachen Interaktionen kumulativ ergibt, sondern dass einige wenige starke Wechselwirkungen entscheidend sind.

¹ Somatropin: *human growth hormone* (hGH)

Außerdem stellten Clackson und Wells fest, dass die energetisch wichtigen Aminosäuren, die bei diesen Untersuchungen hydrophobe Eigenschaften aufwiesen, in einer Kernregion liegen und von den weniger wichtigen umgeben sind. Bogan et al. fanden bei der Untersuchung von Alanin-Substitutionen in Protein-Protein-Komplexen ebenfalls die Kernregion der freien Bindungsenergie, die sogenannten *hot spots*, in den Zentren der Kontaktbereiche [90]. Bei den peripheren, in geringerem Maße zur Bindungsaffinität beitragenden Aminosäuren könnten hierfür hohe Energiewerte für Desolvatation und Konformationsveränderungen infolge der Bindung als mögliche Ursachen in Frage kommen. Die Tatsache, dass nur wenige Aminosäuren den größten Teil der Bindungsenergie ausmachen, könnte für die Entwicklung kleinerer Inhibitoren von Interesse sein [88].

Bogan et al. zeigten, dass als wichtige Aminosäuren neben Tryptophanen und Tyrosinen auch Arginine vermehrt gefunden werden [90]. Das häufigere Auftreten dieser Aminosäuren könnte durch die vielseitigen Interaktionen begründet sein. Trp und Tyr können hydrophobe sowie π -Wechselwirkungen eingehen und zudem als Wasserstoffbrücken-Donoren auftreten. Tyr kann außerdem Wasserstoffbrücken akzeptieren. Die Aminosäure Arg kann neben Kation- π -Interaktionen Salzbrücken sowie ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken-Bindungen ausbilden und außerdem über die drei Methylengruppen hydrophobe Wechselwirkungen eingehen [90].

Bogan et al. vermuten, dass die Aminosäuren in der Umgebung dieser hauptsächlich zur Bindungsenergie beitragenden Aminosäuren vor allem für einen partiellen Desolvatationseffekt wichtig sind, der die Interaktion von zwei Proteinen begünstigt. Durch den Ausschluss von Wassermolekülen wird die Dielektrizitätskonstante der direkten Umgebung einzelner Aminosäuren gesenkt, wodurch elektrostatische Interaktionen in Form von Salzbrücken und Wasserstoffbrücken begünstigt werden. Zudem wird der Energieaufwand für die vollständige Desolvatation verringert. Darüber hinaus werden durch den Desolvatationseffekt vermutlich auch die Angriffsmöglichkeiten von Wassermolekülen nach Ausbildung des Protein-Protein-Komplexes verringert, wodurch die Dissoziation des Komplexes reduziert wird [90].

Die elektrostatischen Interaktionen durch polare und geladene Aminosäuren tragen in der Regel nur zu einem geringeren Anteil zur Bindungsaffinität bei. Dennoch können sie die diffusionskontrollierte Assoziationsrate der Komplexbildung erhöhen, obwohl die Desolvatation der geladenen und polaren Gruppen

der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist [91]. Wichtige Funktionen der elektrostatischen Interaktionen sind zudem der Beitrag zur Spezifität der Bindung [92] sowie die Erhöhung der Komplexstabilität [91]. Darüber hinaus sind polare und geladene Gruppen für die Löslichkeit der Proteine von Bedeutung.

Die Assoziation von zwei Proteinen verläuft in zwei Schritten. Zunächst erfolgt die Ausrichtung der Moleküle, deren kinetischer Ablauf durch weitreichende, elektrostatische Interaktionen beschleunigt wird. Im nächsten Schritt ergibt sich die eigentliche Assoziation, in deren Folge sich zumeist die Konformation der beteiligten Proteinbereiche verändert. Hierbei spielen die hydrophoben Wechselwirkungen eine wichtige Rolle.

Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden bei den möglichen Kontaktbereichen der Polypeptide zum Kanalprotein hydrophobe und elektrostatische Interaktionen sowie sterische Effekte berücksichtigt. Zudem sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass eine Aminosäure, deren Alanin-Mutation nicht zu einer signifikanten Veränderung der Bindungsaffinität führt, dennoch in der Bindungsregion liegen und intermolekulare Wechselwirkungen mit einem anderen Proteinmonomer eingehen kann.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Spannungsabhängige Natriumkanäle sind an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. Ihre Eigenschaften und Funktionen können durch verschiedene Faktoren moduliert werden. Der Inaktivierungsprozess, durch den der aktivierte, offene Kanal in den geschlossenen, aber noch nicht wieder aktivierbaren Zustand überführt wird, kann durch Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine inhibiert werden. Dabei binden die Vertreter der drei Toxingruppen an derselben oder zumindest an partiell überlappenden Bindungsstellen des Natriumkanals.

Seeanemonen, Skorpione und Trichternetzspinnen nutzen ihre Toxine gleichermaßen zur raschen Paralyse von möglichen Beutetieren oder Angreifern. Dennoch sind die gleichartigen Eigenschaften der Toxine überraschend, denn die Polypeptide stammen aus sehr unterschiedlichen Organismen und zeigen weder sequentielle noch strukturelle Ähnlichkeiten. Umgekehrt können auch in den Giften einer Gruppe Toxine mit hoher Sequenz- und Strukturhomologie vorkommen, die dennoch an unterschiedlichen Bindungsstellen des Natriumkanals angreifen und dadurch andere neurotoxische Effekte verursachen (z. B. α -/ β -Skorpion-Toxine).

Auffallend ist bei den Toxinen die zum Teil hohe phylogenetische Selektivität und die spezifische Interaktion mit den unterschiedlichen Isoformen des Natriumkanals. Insofern ist die Forschung im Gebiet der Seeanemonen-Toxine von therapeutischem Interesse, denn hier wurde ein positiv inotroper Effekt in nanomolaren Konzentrationsbereichen ohne signifikanten Einfluss auf die Herzfrequenz und den Blutdruck gefunden. Seeanemonen-Toxine besitzen eine höhere Affinität für den kardialen Natriumkanal als Skorpion-Toxine. Allerdings sind die Toxine aufgrund ihrer Antigenität als Arzneistoffe selbst kaum geeignet, könnten aber als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dienen. Die phylogenetische Selektivität der Skorpion-Toxine gegenüber Säugern und Insekten könnte darüber hinaus bei der Entwicklung von neuen Insektiziden nützlich sein.

Obwohl auf dem Gebiet der Ionenkanäle seit Jahren intensiv geforscht wird, sind die genauen biologischen Abläufe auf molekularer Ebene noch nicht vollständig geklärt. Dies betrifft auch den Mechanismus der Inaktivierung. Hierbei ist die Identifikation der Toxin-Kanal-Bindungsregion von besonderem Interesse, denn die meisten Bereiche des Natriumkanals, die zur Inaktivierung beitragen, liegen intrazellulär oder innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht der

Membran. Hingegen binden die Toxine im extrazellulären Bereich. Da derzeit keine Kristallstruktur eines spannungsabhängigen Ionenkanals zur Verfügung steht, bieten indirekte Ansätze mit Hilfe der Toxine als Liganden die einzige Möglichkeit, die Bindungsstelle zu beschreiben und mögliche Mechanismen zu erklären.

In der vorliegenden Arbeit sollten die peptidischen Toxine der Seeanemonen, Skorpione und Trichternetzspinnen in Bezug auf ihre strukturellen, hydrophoben und elektrostatischen Eigenschaften untersucht werden. Die Bereiche der Toxine, die für die Interaktion mit der gleichen oder überlappenden Bindungsstelle wichtig sind, sollten sich aus diesen Eigenschaften ableiten lassen. Dabei sollte die Betrachtung von strukturell ähnlichen Polypeptiden, die trotzdem an einer anderen Bindungsstelle angreifen oder eine andere Wirkung besitzen, hilfreich sein.

Für die Toxine, die mit der Bindungsstelle 3 des neuronalen Natriumkanals interagieren, sollte aus diesen Untersuchungen ein Toxiphor-Modell erstellt werden. Dieses Modell sollte die gemeinsamen Strukturelemente, die für die Toxin-Natriumkanal-Interaktion von Bedeutung sind, in entsprechender räumlicher Anordnung wiedergeben. Es sollte weiterhin versucht werden, aufgrund der gemeinsamen Eigenschaften und Wechselwirkungs-Möglichkeiten der Toxine mit dem Natriumkanal einen möglichen Ansatz zum Verständnis der Inhibierung des Inaktivierungsprozesses zu geben.

3 METHODEN

3.1 Konformationsanalyse von Polypeptiden

Moleküldynamik (MD)-Simulationen (s. [93][94]) ermöglichen die Betrachtung der Konformationsänderung eines Moleküls in Abhängigkeit von der Zeit. Dies kann zur Untersuchung des Konformationsraums, der Flexibilität und der Stabilität eines Moleküls genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden MD-Simulationen für die untersuchten Polypeptide durchgeführt, um unter vergleichbaren Bedingungen stabile und energetisch günstige Konformere zu erhalten. Zur Charakterisierung der Polypeptide wurden außerdem die Flexibilität und die konformatorischen Veränderungen betrachtet. Für diese Untersuchungen wurden der *root mean square*-Wert (RMSD) und der *angular order*-Parameter (AOP) verwendet.

3.1.1 Root Mean Square-Wert

Der *root mean square*-Wert (RMSD) ist definiert als die Wurzel der Summe aller Abstandsquadrate zwischen den Koordinaten (x, y, z) der zu untersuchenden Konformation und den Koordinaten (x_0, y_0, z_0) der Referenzkonformation geteilt durch die Anzahl der überlagerten Atome N .

$$RMSD = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + (z - z_0)^2}{N}} \quad (3.1)$$

$RMSD$	<i>root mean square</i> -Wert
x, y, z	Koordinaten der untersuchten Konformation
x_0, y_0, z_0	Koordinaten der Referenzkonformation
N	Anzahl der überlagerten Atome

Der RMS-Wert kann zum direkten Vergleich von zwei verschiedenen Konformationen eines Moleküls verwendet werden. Dies ist beispielsweise bei der Untersuchung einer Struktur vor und nach einer Minimierung sinnvoll. Bei MD-Simulationen ist weiterhin die Verwendung einer Durchschnittsstruktur als Referenzkonformation möglich, wodurch die Veränderungen in der Simulation erfasst werden können.

Beachtet werden sollte hierbei, dass der RMS-Wert einen Mittelwert über alle betrachteten Atome darstellt. Für eine detaillierte Untersuchung eignet sich das Programm PROCHECK-NMR [95], das für die einzelne Aminosäuren eines

Moleküls die entsprechenden RMS-Werte berechnet. Das Programm ermöglicht die Untersuchung von lediglich zwei Konformationen oder den Vergleich mehrerer Konformationen mit der Durchschnittsstruktur. Hierdurch können variable Bereiche der Polypeptide im Gegensatz zu rigideren identifiziert werden. Dabei geben RMS-Werte die Änderungen der Atomkoordinaten in ihren absoluten Werten wieder.

3.1.2 Angular Order-Parameter

Die Variabilität eines Torsionswinkels (Bild 3.1) über alle Konformationen eines Ensembles kann durch den *angular order*-Parameter (AOP) beschrieben werden. Dieser Wert wird in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an die *circular variance* $Var(\theta)$ [96] für einen Torsionswinkel θ nach folgender Gleichung definiert:

$$AOP(\theta) = \frac{1}{n} \sqrt{\left(\sum_{i=1}^n \cos \theta_i \right)^2 + \left(\sum_{i=1}^n \sin \theta_i \right)^2} \quad (3.2)$$

$AOP(\theta)$	<i>angular order</i> -Parameter für einen Torsionswinkel θ
n	Anzahl der Konformationen des Ensembles
θ	Torsionswinkel

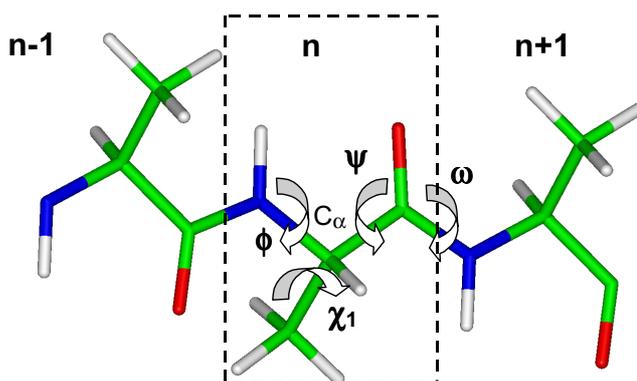


Bild 3.1: Darstellung der Torsionswinkel (ω , ϕ , ψ , χ) einer Aminosäure n bzw. $n+1$. Das Molekül ist nach Atomtypen gefärbt (Kohlenstoffe grün, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot, Wasserstoffe weiß).

Die Verwendung des aus Vektoren berechneten *angular order*-Parameters (AOP) ist besser geeignet für die Beschreibung von Variationen der Winkel als die lineare statistische Beschreibung in Form der Standardabweichung. Dies liegt darin begründet, dass die Gradzahlen der Torsionswinkel zwischen 0 und

360 liegen können, wodurch im Bereich um 0° kein aussagekräftiger Mittelwert berechnet werden kann. Die AOPs der Torsionswinkel können Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Je näher der Wert an 1 liegt, desto geringer ist die Flexibilität des betreffenden Winkels. Ein AOP-Wert von $> 0,8$ entspricht einer Standardabweichung von $< 40^\circ$. Dieser Wert wurde in der vorliegenden Arbeit zur Unterscheidung von variablen und gering flexiblen Winkeln verwendet.

Die Berechnungen der AOP wurden mit dem Programm PROCHECK-NMR [95] durchgeführt, das den Wert der *circular variance* $Var(\theta)$ für alle Torsionswinkel θ der Konformationen eines Ensembles berechnet. Hieraus ergibt sich entsprechend

$$AOP(\theta) = 1 - Var(\theta) \quad (3.3)$$

$AOP(\theta)$ *angular order*-Parameter für einen Torsionswinkel θ
 $Var(\theta)$ *circular variance* für einen Torsionswinkel θ

Die *angular order*-Parameter geben die relativen Positionsänderungen von Atomen wieder. Dadurch ist es im Gegensatz zur Betrachtung von Konformationen über RMS-Werte möglich, in sich stabile Bereiche zu erkennen. Für einen Loop, bei dem lediglich im Anfangs- und Endbereich variable Torsionswinkel gefunden werden, können sich dennoch aufgrund der absoluten Positionsänderungen der Atome im Loop hohe RMS-Werte für die eigentlich stabilen Aminosäuren ergeben. Hierdurch besteht die Gefahr, dass die tatsächliche Stabilität des Bereiches unterschätzt werden könnte.

3.1.3 Cluster-Einteilung

Die Trajektorie einer MD-Simulation enthält ein Ensemble möglicher Konformationen (*frames*) eines Moleküls in Abhängigkeit von der Zeit. Zur Untersuchung der Unterschiede in den Konformationen müssen diese entsprechend ihrer strukturellen Ähnlichkeit in Gruppen (*cluster*) zusammengefasst werden. Dabei sollten stabile Konformationen im Vergleich zu instabileren häufiger gefunden werden.

Das Programm NMRCLUST [97] teilt ein Ensemble in mehrere konformatorisch ähnliche Unterfamilien und wählt daraus jeweils einen repräsentativen Vertreter

aus. Hierbei überlagert das Programm die einzelnen Konformationen mit einem vorgegebenen Satz von Atomen. Für die Überlagerung ist es sinnvoll, diejenigen Atome des untersuchten Moleküls zu verwenden, die in der MD-Simulation nur geringfügig ihre Position verändern und sich zudem gut überlagern lassen. Die Bereiche, die diese speziellen Atome (*core*-Atome) beinhalten, werden als *local structural domains* (LSD) bezeichnet. Zur Bestimmung der LSDs wurde in der vorliegenden Arbeit das Programm NMRCORE [98] verwendet.

3.1.3.1 Das Programm NMRCORE

Das Programm NMRCORE bestimmt für ein Ensemble von Konformationen zunächst *core*-Atome, die durch relativ geringe Veränderungen der räumlichen Position in allen betrachteten Konformeren gekennzeichnet sind. Im nächsten Schritt werden Domänen erfasst, in denen diese *core*-Atome liegen. Dabei können eine oder mehrere solcher *local structural domains* für das untersuchte Molekül gefunden werden. Durch die Vorgehensweise des Programms können zum einen gut definierte Regionen der Konformationen bestimmt werden, zum anderen können in sich rigide Bereiche identifiziert werden, die durch flexible Zwischenregionen verknüpft sind. Im Folgenden wird die Vorgehensweise des Programms detaillierter beschrieben.

Im ersten Schritt der Berechnung bestimmt das Programm für jede Konformation des Ensembles die einzelnen Torsionswinkel (ϕ , φ , χ_1 , χ_2 , ..., χ_n) mit Ausnahme der ω -Winkel. Hieraus werden die Ordnungsparameter (*OP*) entsprechend der Definition nach Hyberts [99] berechnet und in einer sortierten Liste (OP_{list}) aufgeführt. Dabei können diese Parameter Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Ein Wert nahe 1 entspricht einem sehr ähnlichen Winkel in allen Konformationen. Entsprechend weisen die beteiligten Atome ein hohes Maß an Ordnung auf.

Für die sortierten *OP*-Werte wird im zweiten Schritt mit Hilfe einer Straffunktion ein *cutoff* (Grenzwert) bestimmt. Dieser speziell für das untersuchte Ensemble festgelegte *cutoff* gibt an, ab welchem *OP*-Wert Atome als *core*-Atome eingestuft werden. Die Straffunktion maximiert die Anzahl der *core*-Atome bei gleichzeitiger Maximierung der *OP*-Werte, wodurch die Unordnung der Torsionswinkel minimiert wird. Der Wert der Straffunktion P_k für eine bestimmte Position k in der sortierten *OP*-Liste (OP_{list}) wird wie folgt berechnet:

$$P_k = \frac{(T-1)(OP_k - OP_{\min})}{OP_{\max} - OP_{\min}} + k \quad (3.4)$$

P_k	Wert der Straffunktion für Position k
T	Anzahl der OP in der OP_{list}
k	$1, \dots, T$
OP_k	OP in Position k der OP_{list}
OP_{\min}	kleinster OP in der OP_{list}
OP_{\max}	größter OP in der OP_{list}

Entsprechend der Gleichung (3.4) wird für jeden OP -Wert in der Liste ein Wert P_k berechnet. Anschließend wird als *cutoff* der höchste P_k -Wert verwendet. Alle Atome, die zu den OP -Werten oberhalb des *cutoffs* gehören, werden als *core*-Atome definiert. Aminosäuren, in denen keine *core*-Atome identifiziert werden konnten, werden entsprechend als variabel in den Konformationen betrachtet. Sie werden in den nachfolgenden Schritten nicht weiter berücksichtigt.

Im folgenden dritten Schritt werden für die *core*-Atome die zugehörigen LSDs bestimmt, wobei als Standardwert die $C\alpha$ -Atome aller *core*-Atome berücksichtigt werden. Für jeweils zwei $C\alpha$ -Atome werden die Abstände in allen Konformationen des Ensembles sowie die zugehörige Streuung (*variance*) berechnet. Hieraus ergibt sich die *inter-atom variance*-Matrix, die $Z \times Z$ Werte enthält (Z = Anzahl der untersuchten $C\alpha$ -Atome).

Zur Bildung der *cluster* aus den *core*-Atomen, die durch diesen Schritt die LSDs ergeben, wird schließlich der *average linkage*-Algorithmus (Verknüpfung mit dem Mittelwert) verwendet, der beim Programm NMRCLUST (s. Kapitel 3.1.3.2) ausführlicher beschrieben wird. Der Algorithmus arbeitet ebenfalls mit einer Straffunktion, wodurch gleichzeitig die Anzahl der LSDs sowie die Variabilität der *variances* innerhalb der LSDs minimiert wird. Der *cutoff* gibt hier einen Zustand wieder, in der die Populationen der betreffenden LSDs bei gleichzeitig möglichst niedriger Streuung eine maximale Größe erreicht.

3.1.3.2 Das Programm NMRCLUST

Das Programm NMRCLUST [97] teilt die Konformationen eines Ensembles in konformatorisch ähnliche Gruppen (*cluster*) und wählt eine repräsentative Struktur jedes *clusters* aus. Im Folgenden wird die Vorgehensweise des Programms beschrieben.

Nach der Überlagerung der Konformationen (Anzahl N) auf die größte *local structural domain* LSD (s. Kapitel 3.1.3.1) wird über Atome, die frei wählbar sind, für alle paarweise durchgeführten Überlagerungen der *root mean square* (RMS)-Wert berechnet. Hieraus wird eine Matrix aus $N \times N$ RMS-Werten aufgebaut (RMSD-Matrix). Im nächsten Schritt erfolgt das eigentliche *clustern* nach dem *average linkage*-Algorithmus. Hierbei wird zunächst von N *clustern* ausgegangen. Auf der Basis der RMSD-Matrix wird zwischen den einzelnen Mitgliedern von jeweils zwei *clustern* ein Wert berechnet, der mit einem Mittelwert der RMS-Differenzen vergleichbar ist. Im Anschluss daran werden die beiden ähnlichsten *cluster* zusammengefasst. Diese Prozedur wird $(N-1)$ mal durchgeführt. Auf jeder Stufe (1 bis $N-1$) wird außerdem die Streuung der RMS-Differenzen innerhalb der einzelnen Cluster berechnet. Aus diesen Werten ergibt sich dann der Mittelwert der Streuung über alle *cluster*, der zusammen mit der zugehörigen Anzahl an *clustern* für jede einzelne Stufe gespeichert wird. Diese beiden Werte werden im nächsten Schritt benötigt.

Bei der Anwendung der Straffunktion sollen sowohl die Anzahl der *cluster* als auch der Mittelwert der Streuung über alle *cluster* gleichwertig berücksichtigt werden. Deshalb wird im folgenden Schritt zunächst der Betrag der Streuung auf einen Wert zwischen 1 und $(N-1)$ normalisiert. Anschließend wird für jede Stufe des durchgeführten *clusterns* dieser modifizierte Parameter zur Anzahl der *cluster* addiert. Der erhaltene Wert (y -Wert) kann nachfolgend graphisch über die zugehörige Anzahl (x -Wert) der *cluster* der betreffenden Stufen 1 bis $(N-1)$ aufgetragen werden. Das globale Minimum dieser Funktion ergibt den *cutoff*, an dem die Anzahl von *clustern* zu finden ist, die die höchst mögliche Populationsdichte bei gleichzeitig geringster Streuung besitzt. Je höher die Populationsdichte eines *clusters* liegt, umso unwahrscheinlicher ist der Ausschluss eines ähnlichen Konformers. Weiterhin zeigt eine niedrige Streuung, dass sich die Konformationen innerhalb eines *clusters* sehr wenig unterscheiden. Im letzten Schritt wird dann für jeden *cluster* als repräsentative Konformation diejenige ausgewählt, die am nächsten zum Schwerpunkt des *clusters* liegt.

3.2 Untersuchung der elektrostatischen Eigenschaften

Elektrostatische Interaktionen spielen eine wichtige Rolle für die Struktur und die Funktion von Biomolekülen. Sie beeinflussen unter anderem die Assoziation, die Spezifität und die Stabilität von Protein-Protein-Komplexen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Programme DELPHI [100] zur Berechnung der molekularen elektrostatischen Potentiale sowie UHBD [101] und HYBRID [102] zur Bestimmung der pK_a -Werte der titrierbaren Aminosäuren benutzt. Beide Programme verwenden die *finite difference*-Methode zur numerischen Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung (FDPB-Methode), mit der elektrostatische Potentiale außerhalb eines Proteins bedingt durch Ladungen innerhalb des Proteins bestimmt werden können [103]. Auf der Grundlage dieser Potentialberechnungen können andere Eigenschaften wie der pK_a -Wert und der elektrostatische Beitrag zur Solvatations- und Bindungsenergie bestimmt werden.

3.2.1 Poisson-Boltzmann-Gleichung

Die Poisson-Boltzmann-Gleichung (3.5) ermöglicht es, für Makromoleküle in Lösung das Potential $\phi(x)$ an einer beliebigen Position x zu berechnen. Hierbei kann die Gegenwart von Ionen berücksichtigt werden (Reviews s. [104][105]), was für die Untersuchung von Makromolekülen in physiologischer Umgebung (Ionenstärke 0,145 mol/L) von besonderem Interesse ist.

$$\nabla \cdot [\epsilon(x)\nabla\phi(x)] - \kappa^2(x)\sinh(\phi(x)) = -4\pi\rho(x) \quad (3.5)$$

- $\phi(x)$ elektrostatisches Potential an Position x
 $\epsilon(x)$ Dielektrizitätskonstante als Funktion des Ortes
 $\kappa(x)$ modifizierter Debye-Hückel-Parameter (unabhängig von ϵ)
- $$\kappa = \left(8\pi e^2 N_A I / 1000 kT\right)^{1/2}$$
- [I : Ionenstärke, N_A : Avogadro-Konstante,
 k : Boltzmann-Konstante, T : absolute Temperatur,
 e : Elementarladung]
- $\rho(x)$ Verteilung der Ladungsdichte

Die Dielektrizitätskonstante ε wird als Näherung verwendet. Sie beschreibt die Fähigkeit des betreffenden Mediums, die elektrostatischen Effekte einer Ladung abzuschirmen. Dabei ist ε eine makroskopische Größe, obwohl auf mikroskopischer (atomarer) Ebene die Abschirmung aufgrund der Polarisierbarkeit des Mediums erfolgt. Allerdings ist es derzeit technisch nicht möglich, dies in die Berechnungen einzubeziehen. Die Verwendung einer positionsabhängigen Dielektrizitätskonstante $\varepsilon(x)$ in der Poisson-Boltzmann-Gleichung ermöglicht die Beschreibung der Unterschiede in der Polarisierbarkeit zwischen Makromolekül und umgebenden Lösungsmittel. Beide Bereiche an sich werden als homogene Dielektrika betrachtet. Bei Proteinen findet man aufgrund der geringeren Polarisierbarkeit infolge einer eingeschränkten Beweglichkeit der geladenen und polaren Gruppen (Wasserstoffbrücken, Salzbrücken) eine relativ niedrige Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon = 2-4$). Wasser hingegen kann sehr leicht polarisiert werden und besitzt dementsprechend eine hohe Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon = 80$). Zwischen dem Makromolekül und seiner Umgebung tritt dadurch eine dielektrische Grenzfläche zwischen zwei deutlich unterschiedlichen Medien auf. Bei einer geringen Ionenstärke und einer niedrigen Ladungsdichte kann zur Vereinfachung die linearisierte Poisson-Boltzmann-Gleichung verwendet werden (3.6).

$$\nabla \cdot [\varepsilon(x) \nabla \phi(x)] - \kappa^2(x) \phi(x) = -4\pi\rho(x) \quad (3.6)$$

Legende s. Gleichung (3.5)

Die Poisson-Boltzmann-Gleichung kann nur für sehr einfache Grenzflächenformen (z.B. Kugeln oder Zylinder) zwischen Makromolekül und Umgebung gelöst werden. Für komplexere Zustände wird die *finite difference*-Methode zur Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung (FDPB) verwendet. Hierbei wird der Raum um das Molekül in ein regelmäßiges, dreidimensionales Punktgitter zerlegt. Physikalische Eigenschaften wie das elektrische Potential, die Ladungsdichte und die Ionenzugänglichkeit werden für diese Punkte definiert. Demnach ergibt sich aus der linearen Poisson-Boltzmann-Gleichung (3.6) für das Potential ϕ_0 an einem speziellen Gitterpunkt nach Klapper et al. [106] folgende Gleichung:

$$\phi_0 = \left[\left(\sum_{i=1}^6 \varepsilon_i \phi_i \right) + 4\pi q_0 / h \right] \left[\left(\sum_{i=1}^6 \varepsilon_i \right) + (\kappa_0 h)^2 \right]^{-1} \quad (3.7)$$

ϕ_0	Potential am Gitterpunkt 0
ϕ_i	Potential der sechs benachbarten Gitterpunkte des Punktes 0
ε_i	Dielektrizitätskonstante am Mittelpunkt zwischen ϕ_0 und ϕ_i
q_0, κ_0	Ladung, Debye-Hückel-Parameter des Gitterpunkt 0
h	Abstand der Gitterpunkte

Das Potential an einem Gitterpunkt ist abhängig von der eigenen Ladung q_0 und dem Debye-Hückel-Parameter κ_0 sowie dem Abstand h der Gitterpunkte. Es wird darüber hinaus auch von den Potentialen ϕ_i und den Dielektrizitätskonstanten ε_i der umgebenden Gitterpunkte beeinflusst. Deshalb erfolgt die Berechnung der Potentiale an den einzelnen Gitterpunkten iterativ, damit der gegenseitige Einfluss erfasst werden kann.

Im Folgenden wird die Vorgehensweise zur Bestimmung von pK_a -Werten erläutert. Für weitere Details bezüglich der Berechnung des molekularen elektrostatischen Potentials mit DELPHI siehe [107].

3.2.2 Methoden zur Berechnung von pK_a -Werten

Die Säurekonstante K_a einer ionisierbaren Gruppe ist definiert als die Gleichgewichtskonstante für die Assoziation eines Protons und seiner Bindungsstelle. Der pK_a -Wert ergibt sich durch $pK_a = -\lg K_a$. Die Vorhersage, inwieweit der pK_a -Wert einer Aminosäure in einem Protein durch die Proteinumgebung im Vergleich zur isolierten Aminosäure verändert wird, ist von besonderem Interesse, denn der Protonierungszustand von titrierbaren Gruppen beeinflusst die Stabilität und die biologische Funktion von Proteinen. Weiterhin ist durch korrekt gesetzte elektrische Ladungen die Verbesserung von theoretischen Berechnungen möglich. So kann bei einer Moleküldynamik-Simulation eine falsch protonierte Aminosäure zu deutlichen Strukturveränderungen führen, die die Aussagekraft eines entwickelten Modells reduzieren können.

Zwar hat sich bisher für die Berechnungen der pK_a -Werte noch keine Methode durchgesetzt, doch sind die Grundlagen vergleichbar. Bei der folgenden Be-

schreibung der Vorgehensweise wird vor allem Bezug auf Untersuchungen von Bashford und Karplus genommen [108].

Die Modellverbindung A^1 mit einer titrierbaren Gruppe wird zum einen als isolierte Aminosäure in Lösung betrachtet, deren C- bzw. N-Terminus neutralisiert wurde (N-Methylamid- bzw. N-Formyl-Derivat). Zum anderen wird diese Verbindung A in der Protein-Umgebung beschrieben. Die Konformation der isolierten Aminosäure wird entsprechend den Koordinaten im Protein gesetzt.

Die Ionisierung der Modellverbindung A kann nach dem in Bild 3.2 dargestellten Schema beschrieben werden [108]. Dabei gibt der Übergang $A_S H$ zu A_S die Deprotonierung der isoliert betrachteten Modellverbindung A im Lösungsmittel wieder. Die freie Energie $\Delta G_S(AH, A)$ entspricht der zur Ionisierung der Gruppe notwendigen Energie. Entsprechend beschreibt der Übergang $A_P H$ zu A_P die Deprotonierung im Protein mit der freien Energie $\Delta G_P(AH, A)$. Die Übergänge $A_S H$ zu $A_P H$ und A_S zu A_P geben die freie Energie bei der Überführung einer Modellverbindung aus dem Lösungsmittel in die Proteinumgebung wieder.

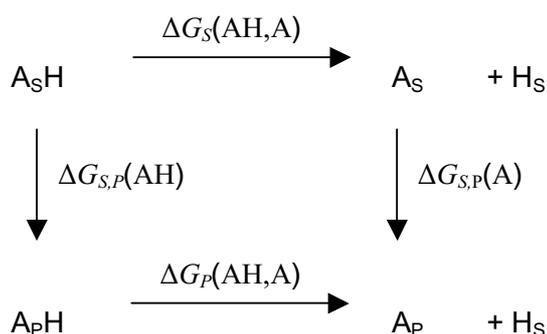


Bild 3.2: Schema zur Deprotonierung einer Modellverbindung A . ΔG beschreibt die freie Energie, die aufgebracht werden müsste, um die Modellverbindung A von einem Zustand in den anderen zu überführen.

Aus diesem Schema (Bild 3.2) abgeleitet, kann der pK_a -Wert einer Modellverbindung im Protein $pK_a(prot)$ durch die Gleichungen (3.8) beschrieben werden. Bei den weiteren Berechnungen wird die zweite Gleichung verwendet, denn die Quantifizierung von Unterschieden zwischen sehr ähnlichen Verbindungen ($A_P/A_P H$ bzw. $A_S/A_S H$) kann leichter erfolgen [108].

¹ Die Modellverbindung A könnte isoliert betrachtet eine Lysin-Seitenkette in einer Aminosäure mit neutralisierten C- bzw. N-Termini oder eine Lysin-Seitenkette in einem Protein darstellen.

$$\begin{aligned}
 pK_a(\text{prot}) &= pK_a(\text{mod}) + \frac{1}{2,303k_B T} [\Delta G_{S,P}(A) - \Delta G_{S,P}(AH)] \\
 &= pK_a(\text{mod}) + \frac{1}{2,303k_B T} [\Delta G_P(AH, A) - \Delta G_S(AH, A)]
 \end{aligned}
 \tag{3.8}$$

$pK_a(\text{prot})$	pK_a -Wert der Aminosäure im Protein
$pK_a(\text{mod})$	pK_a -Wert der isolierten Aminosäure
k_B	Boltzmann-Konstante
T	absolute Temperatur

Zur Lösung der Gleichung kann der pK_a -Wert einer isolierten Modell-Aminosäure $pK_a(\text{mod})$ experimentell bestimmt werden. Bei der Berechnung der freien Energien muss zunächst für die Modellverbindung die Ionisierung der Gruppe beschrieben werden. Im *single site*-Modell erfolgt dies durch die Übertragung einer Ladung auf ein einziges Atom dieser Gruppe. Bei Asp, Glu und der C-terminalen Carboxylatgruppe wäre dies das C-Atom der jeweiligen Carboxylatgruppe, bei Lys und der N-terminalen α -Aminogruppe das N-Atom [108]. Eine Weiterentwicklung stellt das *full charge*-Modell von Antosiewicz et al. dar, bei dem die hinzugefügte Ladung auf die Punktladungen der beteiligten Atome der titrierbaren Gruppe einer Modellverbindung verteilt wird [109].

Eine weitere Näherung bei den Berechnungen ist die Annahme, dass signifikante Unterschiede zwischen den freien Energien $\Delta G_P(AH, A)$ und $\Delta G_S(AH, A)$ nur durch elektrostatische Interaktionen bedingt sind. Hierbei wird angenommen, dass bei der Übertragung der Modell-Aminosäure aus dem Lösungsmittel in die Proteinumgebung die Bindung zwischen dieser Aminosäure und dem Protein selbst weit genug von der titrierbaren Gruppe entfernt liegt. Durch diese Näherung kann die Gleichung für den pK_a -Wert einer titrierbaren Gruppe i in einem Protein folgendermaßen geschrieben werden:

$$pK_a(\text{prot}) = pK_a(\text{mod}) + \frac{1}{2,303k_B T} [\Delta G_{\text{Born}}(\text{prot}) - \Delta G_{\text{Born}}(\text{mod}) + \Delta G_{\text{back}}(\text{prot}) - \Delta G_{\text{back}}(\text{mod}) + \Delta G_{\text{interact}}(\text{prot})] \quad (3.9)$$

ΔG_{Born}	Desolvatations-Energie, die sich bei der Ionisierung der titrierbaren Gruppe i der Modellverbindung im Protein bzw. Lösungsmittel ergibt
ΔG_{back}	freie Energie, die sich bei der Ionisierung aus den Wechselwirkungen der Modellverbindung (Seitenkette) mit den Partialladungen der anderen Atome des Proteins bzw. der isolierten Aminosäure ergibt (nicht berücksichtigt werden Interaktionen mit titrierbaren Gruppen)
$\Delta G_{\text{interact}}$	freie Energie, die sich bei der Ionisierung aus den Wechselwirkungen der titrierbaren Gruppe i der Modellverbindung mit den anderen titrierbaren Gruppen des Proteins ergibt

Hierbei beschreibt ΔG_{Born} die Born- oder Desolvatations-Energie, die sich bei der Ionisierung der Gruppe i im Protein $\Delta G_{\text{Born}}(\text{prot})$ bzw. in der isolierten Aminosäure $\Delta G_{\text{Born}}(\text{mod})$ ergibt. ΔG_{back} (*background*) beschreibt die Wechselwirkung der Modellverbindung mit den Partialladungen der Atome des Proteins $\Delta G_{\text{back}}(\text{prot})$ bzw. der Modell-Aminosäure $\Delta G_{\text{back}}(\text{mod})$. $\Delta G_{\text{interact}}(\text{prot})$ ist der Term, der die Interaktion zwischen der titrierbaren Gruppe i und den anderen titrierbaren Gruppen des Proteins wiedergibt.

Zusammenfassend hat man zur Berechnung den intrinsischen pK_a -Wert (pK_{intr}) definiert, der dem pK_a -Wert einer ionisierbaren Gruppe im Protein entspricht, wenn alle anderen titrierbaren Gruppen nicht ionisiert vorliegen. Der Unterschied zwischen den beiden Werten wird verursacht durch die Interaktionen der titrierbaren Gruppen untereinander. Demzufolge gilt zwischen dem pK_a -Wert einer Gruppe und ihrem pK_{intr} folgender Zusammenhang:

$$pK_a(\text{prot}) = pK_{\text{intr}} + \Delta G_{\text{interact}}(\text{prot}) \quad (3.10)$$

pK_{intr}	pK_a -Wert der Aminosäure im Protein, wenn alle anderen titrierbaren Gruppen neutral vorliegen
--------------------	--

Zur Anwendung der Gleichung (3.10) muss allerdings der Protonierungszustand der anderen titrierbaren Gruppen im Protein geklärt sein, da der Term $\Delta G_{interact}$, der die Interaktionen wiedergibt, die die betreffende Gruppe i mit den übrigen ionisierbaren Gruppen eingeht, von den Ladungen abhängig ist. Insofern wird zunächst die Berechnung des intrinsischen pK_a -Wertes (pK_{intr}) mit Hilfe der *finite difference*-Methode zur Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung durchgeführt. Dabei werden für jede titrierbare Gruppe zwei Rechnungen in dem Protein und zwei Rechnungen für die Gruppe in der isolierten Aminosäure durchgeführt, wobei die Gruppe jeweils ionisiert bzw. neutral vorliegt. Anschließend kann über die Berechnung der Titrationskurve¹ der apparente pK_a -Wert (pK_{app}) bestimmt werden, der definiert ist als der Punkt der Titrationskurve, an dem eine titrierbare Gruppe zu 50% protoniert vorliegt. Dabei gibt es zur Berechnung der Titrationskurve mehrere Ansätze, die meist in Kombinationen eingesetzt werden. Geht man von einem Protein aus, das N titrierbare Gruppen besitzt, so kann die Titrationskurve aus einer statistischen Auswertung der 2^N möglichen Ionisierungszustände berechnet werden. Allerdings müssen hier Näherungen erfolgen, sobald die Anzahl der Gruppen zu groß wird. Bashford und Karplus reduzierten die Anzahl der zu betrachtenden Gruppen, die in ionisierter bzw. neutraler Form vorlagen, durch Ausschluss derer, die bei dem untersuchten pH-Wert fast ausschließlich in einer Form vorkommen [110]. Eine andere Möglichkeit stellt die Tanford-Roxby-Näherung dar [111]. Hierbei wird für jede titrierbare Gruppe eine Ladung bestimmt, die einen Mittelwert der Protonierungszustände repräsentiert. Weiterhin kann ein Monte Carlo-Algorithmus verwendet werden, bei dem in jedem Schritt der Ionisierungszustand einer zufällig ausgewählten Aminosäure verändert wird [112].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Programm UHBD (*University of Houston Brownian Dynamics Program*) zur Bestimmung der intrinsischen pK_a -Werte gearbeitet [101]. Die apparenten pK_a -Werte wurden durch Verwendung des Programms HYBRID [102] berechnet, das eine Clusteranalyse auf der Basis der Tanford-Roxby-Methode durchführt [111].

¹ Die Titrationskurve gibt den Protonierungszustand aller ionisierbaren Gruppen des Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert wieder.

3.3 Strukturüberlagerung mit dem Programm FAME

Das Programm FAME (*FLEXIBLE ALIGNMENT OF MOLECULE ENSEMBLES*) ermöglicht die Optimierung von Überlagerungen strukturell unterschiedlicher Moleküle auf der Basis des elektrostatischen Potentials und des Überlappungsvolumens [113]. Charakterisiert werden die Optimierungen durch den über alle Eigenschaften und Moleküle gemittelten Hodgkin Ähnlichkeitsindex [114]. An dieser Stelle soll das Programm nur kurz vorgestellt werden. Für eine detaillierte Beschreibung siehe [113].

Der Ähnlichkeitsindex H_{ab} wird für die Elektronendichte von zwei Molekülen a und b nach Gleichung (3.11) definiert. Die Integrale werden dabei über den gesamten Raum ausgewertet [114].

$$H_{ab} = \frac{2 \int \rho_a \rho_b dv}{\int \rho_a^2 dv + \int \rho_b^2 dv} \quad (3.11)$$

H_{ab}	Ähnlichkeitsindex
ρ_a, ρ_b	Elektronendichte der Moleküle a und b

Die Anwendung dieser Gleichung für die Berechnung der molekularen Ähnlichkeit ist nicht auf die Elektronendichte allein beschränkt. Der Hodgkin Index kann prinzipiell auf eine beliebige andere molekulare Eigenschaft angewendet werden [114]. So berechnet das Programm FAME beim Vergleich von zwei Molekülen a und b entsprechend der Gleichung (3.11) die Indices für das elektrostatische Potential H^{elec} und das Überlappungsvolumen H^{steric} [113]. Dabei werden die Eigenschaften durch Gaußfunktionen beschrieben. Die Werte für H^{elec} können zwischen -1 und +1 liegen. Dabei bedeutet +1, dass die elektrostatischen Potentiale der untersuchten Moleküle identisch sind. Ein Wert von -1 weist auf ein komplementäres Potential hin. H^{steric} kann Werte zwischen 0 und +1 annehmen. Hierbei bedeutet 0, dass keine Überlappung der Volumina vorliegt, ein Wert von +1 zeigt an, dass die überlagerten Moleküle ein identisches Volumen besitzen.

Aus der Summe der beiden einzelnen Indices H^{elec} und H^{steric} ergibt sich der Hodgkin Index H nach Gleichung (3.12). Hierbei ist die Verwendung eines Wichtungsfaktors w möglich. Durch diesen Faktor kann die Wertung der beiden

Indices H^{elec} und H^{steric} zugunsten des elektrostatischen Anteils verlagert werden. Dies ist sinnvoll, sofern eine funktionelle Bedeutung für elektrostatische Interaktionen bei den Molekülen bekannt ist.

$$H = (1 - w)H^{elec} + wH^{steric} \quad (3.12)$$

H	Hodgkin Index für zwei Moleküle
H^{elec}	Hodgkin Index für die elektrostatischen Eigenschaften
H^{steric}	Hodgkin Index für das Überlappungsvolumen
w	Wichtungsfaktor

Das Programm FAME führt eine vorgegebene Anzahl Strukturüberlagerungen aus. Dabei werden als Startpositionen zufällige Anordnungen der beiden Moleküle eingestellt, die dann optimiert und durch den betreffenden Hodgkin Index gekennzeichnet werden. Dabei verwendet FAME einen RF-Optimierer (*rational function*), der mit der ersten und zweiten Ableitung der Ähnlichkeitsfunktion arbeitet [115]. In Abhängigkeit von der Größe des Konformationsraums können sich die gefundenen lokalen Maxima wiederholen. Wird die Anzahl der Überlagerungsoptimierungen auf eine genügend hohe Zahl gesetzt, so wird die molekulare Identität, im Rahmen der numerischen Rechengenauigkeit, immer gefunden [115]. Für die Bewertung der Hodgkin Ähnlichkeitsindices von molekularen Überlagerungen wird hierdurch die obere Grenze der zu erreichenden Ähnlichkeit angegeben. Ein Schwellenwert für die Signifikanz der paarweise berechneten Hodgkin Indices kann demnach nicht generell bestimmt werden. Der gefundene Wert des Indexes ist abhängig von den Parametern, die für die Berechnung eingesetzt werden, und wird zudem von den Moleküleigenschaften beeinflusst. Eine Rolle spielt dabei die Anzahl der Gaußfunktionen, die für die Beschreibung des Coulomb-Potentials verwendet werden. Ebenfalls beachtet werden müssen die freigegebenen Optimierungsvariablen und auch die relative Positionierung der Moleküle vor der Optimierung. Auf Seiten der betrachteten Moleküle ist der Protonierungszustand und auch die Größe von Bedeutung [115].

Die unterschiedlichen, optimierten Überlagerungen der Moleküle müssen auf Übereinstimmungen mit bekannten Eigenschaften sorgfältig analysiert werden. Hierbei wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem das lipophile Potential sowie funktionell wichtige Aminosäuren betrachtet.

4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

4.1 Vorgehensweise

4.1.1 Auswahl der Polypeptide

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften von Polypeptiden untersucht, die aus Seeanemonen, Skorpionen und Trichternetzspinnen isoliert wurden. Sie interagieren mit dem neuronalen Natriumkanal von Säugern, Crustaceen bzw. Insekten.

Zunächst wurden die Polypeptide der Seeanemonen betrachtet. Für das Toxin ApB standen in der Literatur detaillierte Mutationsstudien zur Verfügung, dadurch lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den für Säuger und Crustaceen toxischen Verbindungen ApB und ApA, die die Inaktivierung des Natriumkanals hemmen. Dabei ist ApB das wirkstärkste Toxin bei Säugern. Des Weiteren wurden ATXIa und ATXIII einbezogen, die lediglich für Crustaceen toxisch sind. ATXIII ist zudem ein Vertreter der kurzkettigen Seeanemonen-Toxine. Als mögliche Antagonisten für die Bindungsstelle 3 wurden BDSI und BDSII betrachtet. Für die Untersuchungen standen NMR-Strukturen von ApA (PDB: 1ahl [55]), ApB (1apf [56]), ATXIa (1atx [57]), ATXIII (1ans [58]) und BDSI (1bds, 2bds [59]) zur Verfügung.

Aus der Gruppe der klassischen α -Skorpion-Toxine wurden AaHII und LqqV ausgewählt. AaHII besitzt die höchste Toxizität für Säuger. Es kann zudem in höherer Konzentration Lqh α IT vom neuronalen Kanal der Kakerlaken kompetitiv verdrängen [25]. Ebenfalls in die Untersuchung einbezogen wurde Lqh α IT, das als wirkstärkstes α -Insektentoxin in sehr hoher Konzentration auch für Säuger toxisch sein kann. Obwohl AaHII und Lqh α IT offensichtlich am Insektenkanal an derselben oder an zumindest partiell überlappenden Bindungsstellen angreifen, kann Lqh α IT AaHII an Kanälen aus Rattenhirn nicht verdrängen [25]. Für die Untersuchung konnten eine Kristallstruktur von AaHII (1aho [71]) und eine NMR-Struktur von Lqh α IT (1lqh, 1lqi [116]) verwendet werden. Weiterhin wurde auf der Basis der Kristallstruktur von AaHII ein Homologie-Modell für LqqV aufgebaut.

Das Seeanemonen-Toxin ATXII kann kompetitiv AaHII am Rattenkanal und ebenso Lqh α IT am Kakerlakenkanal verdrängen [25]. Dies weist auf eine identische oder überlappende Bindungsstelle der α -Skorpion- und der Seeane-

monen-Toxine hin. Gleichzeitig geben diese Untersuchungen einen Hinweis auf Gemeinsamkeiten innerhalb der beiden Skorpion-Toxingruppen.

Die Eigenschaften von AaHII und Lqh α IT müssten in Bezug auf die Bindung am Insektenkanal zumindest partiell ähnlich sein. Daher sollte es möglich sein, aus den Mutationsstudien von Lqh α IT Rückschlüsse auf wichtige Aminosäuren bei AaHII zu ziehen. Die funktionelle Seite¹ der an Säuger- beziehungsweise Insektenkanälen angreifenden Skorpion-Toxine dürfte, wenn auch nicht identisch, so dennoch ähnlich sein.

Obwohl die Bindungsstellen am Insekten- und Säugerkanal homolog sind [25], sollten auf der anderen Seite Unterschiede in den Eigenschaften von AaHII und Lqh α IT zu finden sein, denn Lqh α IT kann AaHII am neuronalen Säugerkanal nicht verdrängen. Aus diesem Vergleich müssten wichtige Bereiche für die Interaktion mit dem Säugerkanal abgeleitet werden können.

Zum Vergleich wurde außerdem das β -Skorpion-Toxin Cn2 untersucht, das trotz struktureller und sequenzieller (> 50%) Homologie zu den α -Skorpion-Toxinen signifikante Unterschiede zu AaHII zeigen sollte. Cn2 interagiert mit einer anderen Bindungsstelle und beeinflusst die Aktivierung. Auch von diesem Toxin wurde eine NMR-Struktur veröffentlicht (1cn2 [72]).

Aus der Gruppe der Trichternetzspinnen-Toxine wurde die NMR-Struktur von δ -ACTX-Ar1 für die Untersuchungen herangezogen (1qdp [82]). Dieses Toxin kann kompetitiv sowohl AaHII am neuronalen Säugerkanal als auch Lqh α IT am Kakerlakenkanal verdrängen.

Als Leitfaden für die Eigenschaften der wichtigsten untersuchten Toxine soll die nachfolgende Tabelle 4.1 dienen.

¹ Als funktionelle Seite wird der Bereich der Toxine bezeichnet, in dem wichtige funktionelle Aminosäuren liegen und der mit dem Natriumkanal interagieren könnte.

Tabelle 4.1: Übersicht der Polypeptide

Polypeptid	Aminosäure- zahl	Produzent	Klassifizierung	toxische Effekte auf ^a	Wirkung, Bindungsstelle (BS)
Seeanemonen					
ApB, ApA	49	<i>Anthopleura xanthogrammica</i>	Typ 1-Toxine	Säuger, Crustaceen	Inaktivierung verlangsamt, BS 3
ATX1a	47	<i>Anemonia sulcata</i>	Typ 1-Toxin	Crustaceen	Inaktivierung verlangsamt, BS 3
ATXIII	27	<i>Anemonia sulcata</i>	kurzkettiges Toxin	Crustaceen	Inaktivierung verlangsamt, BS 3
BDSI, BDSII	43	<i>Anemonia sulcata</i>			antiviral und antihypertensiv, BS 3
Skorpione					
AaHII	64	<i>Androctonus australis</i> Hector	klassisches α -Skorpion-Toxin	Säuger	Inaktivierung verlangsamt, BS 3
LqqV	64	<i>Leiurus quinquestriatus</i> <i>quinquestriatus</i>	klassisches α -Skorpion-Toxin	Säuger	Inaktivierung verlangsamt, BS 3
Lqh α IT	64	<i>Leiurus quinquestriatus</i> <i>hebraeus</i>	α -Insektentoxin	Insekten	Inaktivierung verlangsamt, BS 3
Cn2	67	<i>Centruroides noxius</i> Hoffmann	β -Skorpion-Toxin	Säuger	Schwellenwert der Aktivierung erniedrigt, BS 4
Trichternetzspinnen					
δ -ACTX-Ar1	42	<i>Atrax robustus</i>		Säuger, Insekten	Inaktivierung verlangsamt, BS 3

^a Berücksichtigt wurden für die Tabelle die Spezies, für die das Polypeptid die charakteristische Toxizität besitzt. Der Effekt ist zum Teil dosisabhängig. Für AaHII bzw. Lqh α IT wurden in sehr hoher Dosis auch toxische Effekte auf Insekten bzw. Säuger festgestellt (Erläuterungen vgl. Kapitel 4.1.1).

4.1.2 Entwicklung des Toxiphor-Modells

Zur Entwicklung eines gemeinsamen Toxiphor-Modells für die Seeanemonen-, Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine wurden Strukturen untersucht, die durch Kernresonanzspektroskopie (NMR) oder Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurden. Betrachtungen von identischen oder homologen Proteinen haben ergeben, dass die Strukturen aus diesen beiden Aufklärungsmethoden grundsätzlich eine große Ähnlichkeit aufweisen [117][118]. Unterschiede findet man üblicherweise in flexiblen Loopregionen sowie bei Aminosäuren an der Oberfläche der Moleküle. Dies hängt damit zusammen, dass bei NMR-Untersuchungen für diese Bereiche nur wenige experimentelle Restraints bestimmt werden können. Bei der Röntgenstrukturanalyse können hier Kontakte im Kristall auftreten. Dies zeigt auch wichtige Unterschiede in den Struktureigenschaften, denn eine Kristallstruktur gibt ein Molekül wieder, das in einem geordneten Kristallgitter liegt. Insofern muss diese Konformation nicht unbedingt in Lösung vorkommen. Im Gegensatz dazu werden NMR-Strukturen in Lösung und insofern in eher physiologisch relevanter Umgebung aufgenommen [119]. Dennoch ist die Präzision einer hochaufgelösten¹ Kristallstruktur einer gut definierten NMR-Struktur überlegen [119].

Moleküldynamik (MD)-Simulationen haben sich als sinnvolle Hilfsmittel für die Charakterisierung von Proteinstrukturen und ihrer Beweglichkeit erwiesen. Allerdings sind Simulationen in ihrer Genauigkeit limitiert, da sie auf empirische Kraftfelder zurückgreifen und die Simulationsdauer durch die Rechnerleistung begrenzt ist.

Es konnte dennoch gezeigt werden, dass zur Betrachtung einer Proteinstruktur in Lösung Kraftfeldberechnungen bei Verwendung einer hochaufgelösten Kristallstruktur als Ausgangskonformation und unter Einbeziehung von expliziten Wassermolekülen eine Alternative zu NMR-Studien darstellen [120].

¹ Auflösung < 2,0 Å

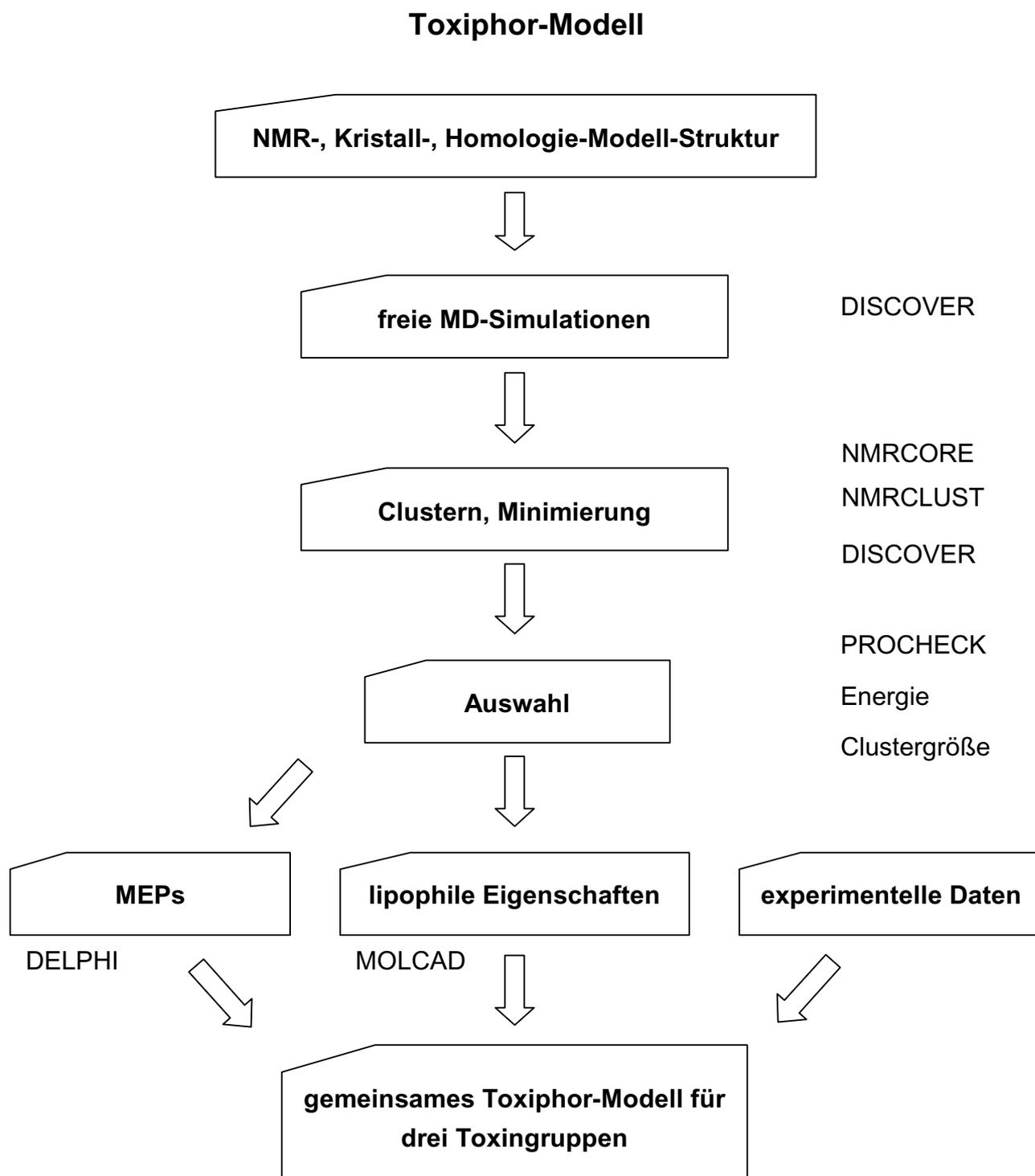


Bild 4.1: Fließschema zur Vorgehensweise. In Großbuchstaben sind die eingesetzten Programme aufgelistet. (MEP = molekulares elektrostatisches Potential)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den unterschiedlichen Polypeptiden Überlagerungen durchgeführt. Dabei waren die Konformationen der Seitenketten von besonderem Interesse. Deshalb wurde mit den untersuchten Verbindungen zunächst MD-Simulationen [93][94] mit dem Programm DISCOVER [100] durchgeführt (s. Bild 4.1). Durch die Verwendung eines einheitlichen Protokolls konnten Konformationen der einzelnen Polypeptide erzeugt werden, die unter vergleichbaren Bedingungen stabil und energetisch günstig waren. Von LqqV und BDSII wurden Homologie-Modelle erstellt.

Das Ergebnis einer MD-Simulation ist eine Trajektorie, die mögliche Konformationen (*frames*) des untersuchten Moleküls in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt. Aus diesen *frames* wurden mit den Programmen NMRCORE [98] und NMRCLUST [97] Gruppen (*cluster*) gebildet, in denen sich nur gering voneinander unterscheidende Konformere zusammengefasst wurden. Für die repräsentativen Konformationen aus den einzelnen *clustern* wurden Energieminimierungen (DISCOVER) durchgeführt.

Durch diese Vorgehensweise konnten für jedes Polypeptid mehrere Konformere erzeugt werden, von denen ein günstiger Vertreter für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurde. Hierbei wurden die Größe des *clusters*, die Energie und die geometrischen Eigenschaften (PROCHECK [121]) der minimierten *frames* berücksichtigt.

Auf der Basis experimenteller Literaturdaten wurden die Eigenschaften der Polypeptide in Bezug auf ihr Verhalten in der MD-Simulation, ihr molekulares elektrostatisches (DELPHI [100]) sowie ihre lipophiles Potential (MOLCAD [122]) untersucht. Es wurde zunächst ein mögliches Toxiphor-Modell für die Seeanemonen-Toxine erstellt, das die für die Interaktion mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger wichtigen Strukturelemente wiedergeben kann. Durch die Überlagerung mit Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxinen sollte dieses Modell bestätigt werden. Außerdem sollten sich aus den Untersuchungen ein möglicher Mechanismus für die Inaktivierung des Natriumkanals durch die Toxine, die an der Bindungsstelle 3 angreifen, ergeben. Dabei wurden folgende Schwerpunkte gesetzt:

4.1.2.1 Molekulares elektrostatisches Potential

Bei der Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle wird die Konformationsveränderung, die zur Öffnung der Pore führt, durch die Auswärtsbewegung der S4-Segmente hervorgerufen. Zusätzlich initialisiert diese Bewegung

wahrscheinlich den Inaktivierungsprozess. Die Konformationsveränderung der S4-Segmente, die beim Säuger zwischen vier und acht positive Ladungen enthalten, wird dabei durch die Depolarisation der Membran ausgelöst. Insofern ist es denkbar, dass ein im Loopbereich des Spannungssensors IVS4 gebundenes Toxin mit einem ausgeprägten positiven Potential durch elektrostatische Interaktionen diese Konformationsänderung inhibieren könnte. Für eine Bedeutung der positiv geladenen Aminosäuren der Toxine sprechen verschiedene Mutationsstudien von ApB. Dabei konnte ein Einfluss auf die Bindungsaffinität und auch auf die Fähigkeit des Toxins, die offene Konformation des Kanals zu stabilisieren, festgestellt werden. Ebenfalls in diese Richtung gehen die Beobachtung von Schweitz et al. [51]. Bei den Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe hatte sich für Toxine, isoliert aus einer Seeanemone, eine mit der positiven Nettoladung steigende Aktivität gegenüber Säugern ergeben. So ist ATXV (Nettoladung NL +3) aktiver als ATXII (NL +2) und ATXI (NL +2), und auch ApB (NL +3) zeigt eine höhere Toxizität als ApA (NL +1). Allerdings wird diese Tendenz nicht in Bezug auf die Aktivität gegenüber den Crustaceen gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei den Toxinen nach übereinstimmenden positiven molekularen elektrostatischen Potentialen gesucht.

4.1.2.2 Rigidität der Toxine

Bei einer rotierenden Auswärtsbewegung des IVS4-Segments muss sich ebenfalls die Konformation des Loops IVS3-S4 verändern. Insofern könnte bei einer Inhibierung der Konformationsänderung dieses relativ kurzen Loops, dessen Länge vermutlich bei 10 bis 15 Aminosäuren liegt, auch die normale Beweglichkeit des IVS4-Segments eingeschränkt werden. Zwar könnte die Aktivierung des spannungsabhängigen Natriumkanals noch erfolgen, die Inaktivierung würde aber verlangsamt werden.

Da die Toxine am Loop IVS3-S4 über mehrere Interaktionspartner binden [31], wäre es denkbar, dass die Konformationsänderung durch diese Wechselwirkungen eingeschränkt wird. Der Effekt wäre dabei umso stärker, je rigider der am Loop bindende Molekülbereich des Toxins ist. Aus diesem Grund wurde die Flexibilität der Toxine bei den MD-Simulationen mittels *angular order*-Parameter (AOP) und *root mean square*-Wert (RMSD) untersucht.

Ebenfalls möglich wäre eine zusätzliche Interaktion der Toxine mit anderen Loops des Kanals, so dass eine Überbrückung erfolgen könnte. Denkbar wäre

hier eine Beteiligung des Loops IVS5-SS1, der als Teil des Rezeptorkomplexes identifiziert wurde und nahe am Loop IVS3-S4 liegen müsste.

4.2 Moleküldynamik-Simulationen

Im Rahmen der Arbeit wurden mit den untersuchten Toxinen und Polypeptiden Moleküldynamik (MD)-Simulationen durchgeführt, um unter vergleichbaren Bedingungen stabile und energetisch günstige Konformere der einzelnen Polypeptide zu erhalten. Deshalb musste zunächst ein einheitliches Protokoll für die Vorgehensweise entwickelt werden.

Die MD-Simulationen der Polypeptide wurden unter Verwendung des *Consistent Valence Forcefields* (CVFF) (Referenzen s. [94]) mit dem Programm DISCOVER [100] durchgeführt. Dabei wurden die Moleküle in einer äquilibrierten Wasserbox des Programmpaketes INSIGHTII [100] mit periodischen Randbedingungen untersucht. Für das betrachtete System mussten zunächst die Parameter des *cutoffs* und der Dielektrizitätskonstante optimiert werden.

4.2.1 *Cutoff* für nichtkovalente Wechselwirkungen bei periodischen Randbedingungen

Bei der Berechnung der nichtkovalenten Wechselwirkungen werden im CVFF-Kraftfeld Dispersions- und Coulomb-Energien berücksichtigt. Dispersions-Wechselwirkungen¹, die eine geringe Reichweite besitzen, werden über ein empirisch ermitteltes Lennard-Jones-Potential beschrieben (vgl. Anhang E). Hierbei geht der Abstand r der Atome mit $1/r^6$ in den Term für die Berechnung der Attraktion (Anziehung) bzw. $1/r^{12}$ in den Repulsionsterm (Abstoßung) ein. Bei den weitreichenden elektrostatischen Wechselwirkungen wird der Abstand mit $1/r$ im Coulomb-Potential berücksichtigt.

Die Zahl der vom Programm durchzuführenden Berechnungen hängt quadratisch von der Atomanzahl des betrachteten Systems ab. Insofern ist die Berücksichtigung der weitreichenden nichtkovalenten Wechselwirkungen ein wichtiger Faktor sowohl für die Präzision als auch für den Rechenaufwand der Energieberechnungen. Durch den Wert des *cutoffs* wird der Abstand der Atome

¹ Im Programm DISCOVER werden die Dispersions-Wechselwirkungen als van-der-Waals (vdW)-Wechselwirkungen bezeichnet.

bestimmt, bis zu dem die Interaktionen der Atome in die Berechnungen einbezogen werden.

Zur Festlegung des für die Geometrieoptimierungen und MD-Simulationen verwendeten *cutoffs* wurden die vdW- und Coulomb-Energien in Abhängigkeit von unterschiedlichen *cutoffs* (11-40 Å) betrachtet. Hierfür wurde ein Homologie-Modell des klassischen α -Skorpion-Toxins LqqV (Aufbau vgl. Kapitel 4.4) untersucht, bei dem durch eine kurze Energieminimierung ungünstige Kontakte der Seitenketten korrigiert waren. Dieses Modell wurde in eine Wasserbox eingebracht und erneut kurz energieminimiert (*steepest descent*-Algorithmus, 100 Schritte mit $\epsilon = 4$, *cutoff* von 20 Å). Es wurden dabei verschiedene Wasserboxgrößen (Kantenlängen von 40, 45, 50, 60 bzw. 70 Å) verwendet. Anschließend wurden die Energien für *cutoffs* zwischen 11 und 40 Å berechnet.

In Bild 4.2 ist die Summe der inter- und intramolekularen van-der-Waals-Energien von LqqV in einer Wasserbox der Kantenlänge 50 Å dargestellt. Der Verlauf der Kurve war bei den anderen Boxgrößen vergleichbar. Dementsprechend ergab sich für einen *cutoff* von 15 Å unabhängig von der Größe der Wasserbox ein Abstand des vdW-Energiewertes zur Asymptote von etwa 2,5%.

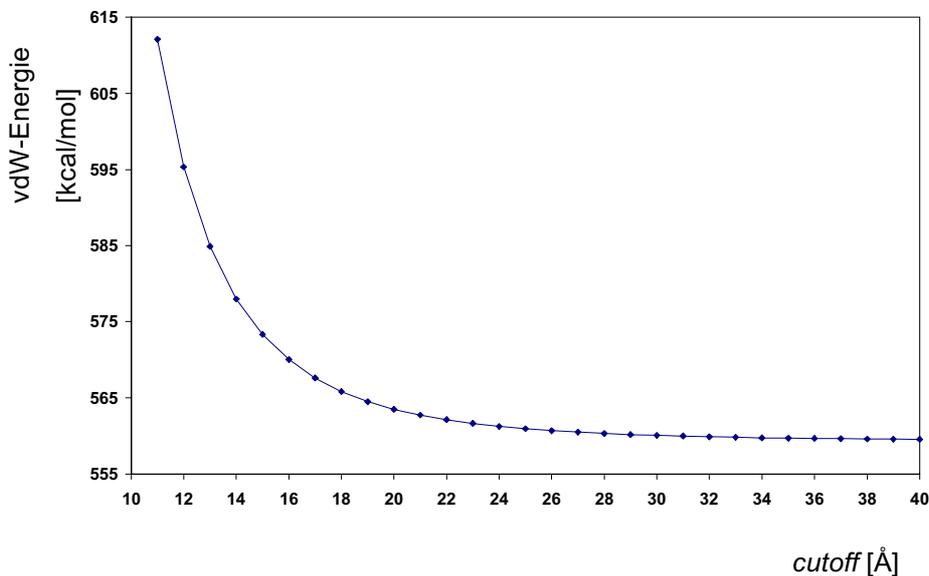


Bild 4.2: Summe der inter- und intramolekularen vdW-Energien von LqqV in einer Wasserbox der Kantenlänge 50 Å für *cutoffs* zwischen 11 und 40 Å.

Bei den weitreichenden Coulomb-Wechselwirkungen ist der Kurvenverlauf der intermolekularen Energie abhängig von der Größe der Box. Hier wird aufgrund der periodischen Randbedingungen mit zunehmendem *cutoff* die Wechselwirkung des betrachteten Polypeptids mit den benachbarten Polypeptiden in die

Berechnung einbezogen. Daher wird die Asymptote der Coulomb-Energie nur bei Untersuchungen in sehr großen Wasserboxen erreicht. Bei der Betrachtung des Energieverlaufs bei Verwendung einer Box der Kantenlänge 70 Å (s. Bild 4.3) liegt die Asymptote im mittleren Bereich der berechneten Energiewerte. Technisch ist es allerdings derzeit nicht vertretbar, mit einem derart großen System unter Verwendung von expliziten Wassermolekülen und periodischen Randbedingungen mit dem Programm DISCOVER zu arbeiten.

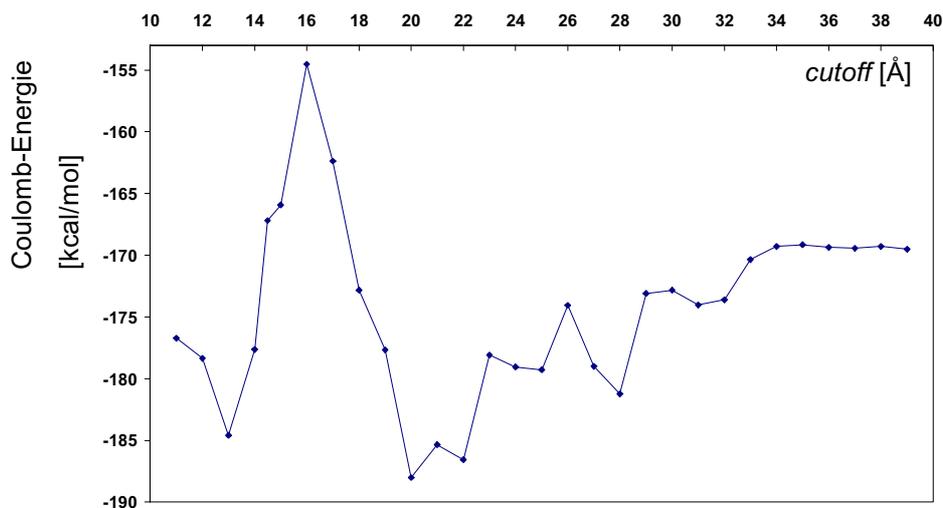


Bild 4.3: Summe der inter- und intramolekularen Coulomb-Energien von LqqV in einer Wasserbox der Kantenlänge 70 Å für *cutoffs* zwischen 11 und 39 Å.

Bei den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Berechnungen wurde deshalb generell ein *cutoff* von 15 Å verwendet. Durch diesen Wert konnte bei dem getesteten Toxin LqqV der Abstand der vdW-Energie zur Asymptote sehr gering gehalten werden (etwa 2,5 %). Die Werte der Coulomb-Energien lagen bei 15 Å für LqqV bei einer Boxgröße von 70 Å ebenfalls in einem vertretbaren Abstand zur Asymptote (< 2%). Die Größe der Wasserbox wurde für jedes Polypeptid individuell ermittelt, so dass sichergestellt wurde, dass bei dem eingesetzten *cutoff* von 15 Å die Nachbarmoleküle nicht erreicht wurden.

Speziell bei Energieminimierungen kann der Einfluss des eingesetzten *cutoffs* gezeigt werden. In Bild 4.4 ist die Gesamtenergie und die intramolekulare Coulomb-Energie für das Modell von LqqV nach einer Geometrieoptimierung dargestellt, bei der ein *cutoff* von 20 Å verwendet wurde. Dabei wird vor allem bei der Betrachtung der intramolekularen elektrostatischen Energie deutlich, dass sich die Konformation des Moleküls optimal für den vorgegebenen *cutoff*

von 20 Å bei der Minimierung ausgerichtet hat. Im Rahmen einer Untersuchung ist deshalb die Verwendung eines einheitlichen *cutoffs* wichtig.

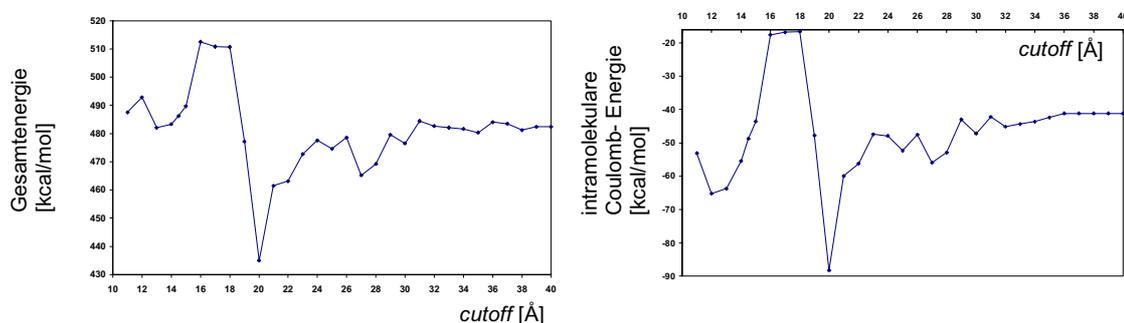


Bild 4.4: Gesamtenergie (*links*) und intramolekulare Coulomb-Energie (*rechts*) eines Modells von LqqV nach der Energieminimierung bei einem *cutoff* von 20 Å ($\epsilon = 4$).

4.2.2 Die Dielektrizitätskonstante

Die elektrostatische Energie, die im Kraftfeld über das Coulomb-Potential berechnet wird (vgl. Anhang E), ist abhängig von den Partialladungen der Atome, dem Atomabstand und der eingesetzten Dielektrizitätskonstante ϵ . Diese Konstante wird als Näherung verwendet, um die Abschirmung der Ladungen durch das Medium zwischen ihnen zu beschreiben. Ihr Wert gibt die Polarisierbarkeit des Mediums wieder. Dabei sind die in den theoretischen Untersuchungen angewendeten Dielektrizitätskonstanten, die als empirische Skalierungsfaktoren gelten, nicht mit experimentell bestimmten Werten vergleichbar.

Grundsätzlich wird bei Berechnungen in einer Wasserbox mit expliziten Wassermolekülen eine niedrige Dielektrizitätskonstante eingesetzt, da durch diese Moleküle die Abschirmung der Ladungen eines Proteins gegeben ist. Da in den Sequenzen der in der Arbeit betrachteten Polypeptide sehr viele geladene Aminosäure gefunden werden und bei den molekülmechanischen Berechnungen keine zusätzlichen Ionen berücksichtigt wurden, bestand die Möglichkeit, dass intramolekular zu starke elektrostatische Interaktionen auftreten könnten.

Bei der Generierung von stabilen Konformeren der einzelnen Polypeptide wurde im letzten Schritt eine ausführliche Energieminimierung der Konformationen aus den MD-Simulationen durchgeführt. Deshalb wurde der Einfluss der Dielektrizitätskonstante beim Vergleich von zwei Geometrieoptimierungen mit $\epsilon = 1$ bzw. 4 auf die Konformation eines Moleküls untersucht. Hierfür wurde ein Homologie-Modell von LqqV nach dem in Tabelle 4.2 wiedergegebenen Protokoll optimiert. Nach dem Einbringen des Polypeptids in die Wasserbox waren

zunächst nur die Wassermoleküle frei beweglich. Anschließend wurden die Atome des Polypeptids in mehreren Schritten freigegeben. Dadurch wurde sichergestellt, dass ungünstige Kontakte im Homologie-Modell schrittweise relaxiert wurden.

Tabelle 4.2: Protokoll^a für die Energieminimierung eines Homologie-Modells von LqqV in einer Wasserbox zur Untersuchung des Einflusses von $\epsilon = 1$ bzw. 4

Fixierte Atome	Atome mit TF ^b	TF ^b [kcal/molÅ ²]	Algorithmus ^c	Konvergenzkriterium ^d [kcal/molÅ]
Protein			SD	10
Proteinrückgrat	Seitenketten	500	SD	5
		100	SD	5
		50	SD	1
		10	SD	1
		0	SD	0,1
	Proteinrückgrat	500	SD	5
		100	CG	5
		50	CG	1
		10	CG	0,1
		0	CG	0,1

^a Die Kantenlänge der Wasserbox lag bei 50 Å, der *cutoff* für die nichtkovalenten Wechselwirkungen bei 20 Å. Die Omega-Torsionswinkel wurden mit 20 kcal/molÅ² in der trans-Konformation gehalten.

^b TF (*tethering force*): Kraftkonstante, mit der die Atome auf ihren Ursprungskordinaten festgehalten werden (*tethering*)

^c Die verwendeten Minimierungs-Algorithmen sind *steepest descent* (SD) und *conjugate gradient* (CG).

^d Das Konvergenzkriterium wird bei einer Energieminimierung als Abbruchkriterium eingesetzt.

Für die beiden optimierten Konformere wurden die stereochemischen Eigenschaften und die Stabilität der Sekundärstruktur untersucht (PROCHECK [121]). Außerdem wurde die Verteilung der Wasserstoffbrücken betrachtet. Bei der Untersuchung ergaben sich für die mit $\epsilon = 4$ minimierte Konformation günstigere PROCHECK-Ergebnisse (s. Tabelle 4.3). Dies betrifft die ϕ - ψ -Winkelverteilung (Ramachandran-Plot), die Konformation der Seitenketten und auch die G-Faktoren (s. Tabelle 4.3, Anmerkung c). Die Sekundärstruktur war stabil, obwohl die Anzahl der intramolekularen Wasserstoffbrücken leicht reduziert war. Darüber hinaus wurde die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Polypeptid und umgebenden Wassermolekülen begünstigt. Dies würde im Vergleich zu

den Ergebnissen mit $\epsilon = 1$ einer besseren Solvatation in der Wasserbox entsprechen.

Tabelle 4.3: PROCHECK^a-Ergebnisse für die mit $\epsilon = 1$ bzw. 4 minimierte Struktur von LqqV

	$\epsilon = 1$	$\epsilon = 4$
Ramachandran-Plot^b		
am meisten bevorzugte Region [%]	81,1	84,9
bevorzugte Region [%]	18,9	15,1
geduldete Region [%]	0	0
unerlaubte Region [%]	0	0
Seitenketten mit ungünstigen Torsionswinkeln		
χ_1 - χ_2 -Torsionswinkel (von 46 Aminosäuren)	1	0
G-Faktoren^d (Durchschnittswerte für alle Aminosäuren)		
Torsionswinkel	-0,36	-0,19
Bindungslängen und Bindungswinkel (Hauptkette)	-0,74	-0,33
Gesamtdurchschnitt	-0,51	-0,26
Sekundärstruktur		
α -Helix (Aminosäuren)	19-28	19-28
Strands des Betafaltblatts (Aminosäuren)	2-5 / 33-40 / 42-51	2-5 / 34-40 / 42-51
Wasserstoffbrücken^e		
intramolekular	40	35
intermolekular	145	161
gesamt	185	196

^a Das Programm PROCHECK [121] vergleicht die geometrischen Eigenschaften der Strukturen mit Standardwerten, die sich aus den Untersuchungen von hochaufgelösten (Auflösung < 2,0 Å), nicht homologen Kristallstrukturen der PDB ergeben haben.

^b Auswertung der ϕ - ψ -Winkelverteilung

^c G-Faktoren werden zur Bewertung eingesetzt, wie ‚normal‘ bzw. wie ‚ungewöhnlich‘ eine spezielle stereochemische Eigenschaft des betrachteten Moleküls im Vergleich zu den häufig in Kristallstrukturen gefundenen Werten ist. Ein negativer G-Faktor für eine bestimmte Eigenschaft weist auf eine eher unwahrscheinliche Konformation des Moleküls hin. Eigenschaften mit G-Faktoren unter -1,0 sollten mit Vorsicht betrachtet werden.

^d Die Wasserstoffbrücken wurden mit INSIGHTII [100] bestimmt.

Der relativ ungünstige G-Faktor für den Gesamtdurchschnitt bei $\epsilon = 1$ ist vor allem durch die schlechten Werte der Bindungslängen und -winkel (Hauptkette) verursacht. Hier scheint die niedrige Dielektrizitätskonstante zu einer leichten Verzerrung der Struktur zu führen, was vermutlich auf die hohe Anzahl der geladenen Aminosäuren bei LqqV zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde bei den im Rahmen der Arbeit durchgeführten molekulmechanischen Untersuchungen eine Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 4$ verwendet.

4.2.3 Zusammenfassung

Die MD-Simulationen wurden bei Körpertemperatur (310 K) mit einem *cutoff* von 15 Å und einer Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 4$ durchgeführt. Für die ionisierbaren Aminosäuren wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 berücksichtigt. Entsprechend lagen Glutamin-, Asparaginsäuren sowie die C-terminalen Carboxylatgruppen deprotoniert, Arginine, Lysine sowie die N-terminalen α -Aminogruppen protoniert vor, und Histidine waren nicht ionisiert. Dieses Vorgehen war möglich, da aufgrund der relativ geringen Molekülgröße der untersuchten Polypeptide die ionisierbaren Aminosäuren Lösungsmittel exponiert sind. Hierdurch dürften relativ geringe Abweichungen von Modell-pK_a-Werten [123] auftreten. Bei den Seeanemonen-Toxinen ApA, ATXII und ATXI liegen zudem Untersuchungen vor, bei denen mit Ausnahme eines pK_a-Wertes für eine stärker sauer reagierende Asparaginsäure keine auffälligen Abweichungen gefunden wurden [124] (vgl. Kapitel 4.6).

Zu Beginn einer MD-Simulation ist das System noch weit von seinem Gleichgewichtszustand entfernt, und es können bei ungünstigen Geometrien kurzfristig starke Beschleunigungen der Atome auftreten. Deshalb wurden vor den eigentlichen MD-Simulationen nach größeren Veränderungen des Systems kurze Energieminimierungen durchgeführt (s. Tabelle 4.4, Schritte 1, 3, 4).

Tabelle 4.4: Protokoll für die MD-Simulationen

Frei	Fixierte Atome	Atome mit TF ^a	TF ^a [kcal/molÅ ²]	Energeminimierung		MD-Simulation
				Algorithmus ^b	Schritte	
(1)	Wassermoleküle, Wasserstoffatome	schwere Atome des Polypeptids		SD	2000	10
(2)						20
(3)				SD	2000	10
(4)	Wassermoleküle	Polypeptid	200	SD	100	10
			200	CG	1000	1
(5)			200			20
			100			20
	Wassermoleküle, Seitenketten	Proteinrückgrat	50			20
(6)	gesamtes System		10			20
						120

^a TF (*tethering force*) ist die Kraftkonstante, mit der die Atome auf ihren Ursprungskoordinaten festgehalten werden (*tethering*).

^b Die verwendeten Minimierungs-Algorithmen sind *steepest descent* (SD) und *conjugate gradient* (CG).

Für die MD-Simulation wurde das Polypeptid zunächst in die äquilibrierte Wasserbox eingebracht. Um den Wassermolekülen die Anpassung an das Polypeptid zu ermöglichen, wurde nach einer kurzen Energieminimierung (s. Tabelle 4.4, 1) eine Simulation durchgeführt (20 ps), bei der lediglich die schweren Atome des Polypeptids in ihrer Position fixiert waren (2). Vor dem Übergang zum nächsten Schritt wurde das System einer weiteren kurzen Energieminimierung unterzogen (3). Bei der nachfolgenden Geometrieoptimierung (4) wurde das Polypeptid mit einer Kraftkonstante an seinen Ursprungskoordinaten festgehalten (*tethering*), um zu plötzliche Veränderungen auszuschließen. Diese Konstante wurde im Verlauf der Simulation (5) reduziert, so dass während der letzten 120 ps das Molekül frei beweglich vorlag (6). Bei der Simulation wurde nach jeweils 2 ps die aktuelle Konformation gespeichert. Dadurch standen für weitere Untersuchungen 60 *frames* aus der freien Dynamik zur Verfügung. Sowohl bei den Energieminimierungen als auch den Simulationen wurden die trans-konfigurierten Omega-Torsionswinkel mit einer Kraftkonstante von 20 kcal/molÅ² festgehalten.

Das beschriebene Protokoll (Eingabe s. Anhang F1 und F2) wurde für die Untersuchungen von ApA, ApB, ApB-Modifikationen (Asp7H, Asp9H, Asp7H9H, R12SK49Q, Loopspaltung), ATXIa, ATXIII, BDSI, BDSII, AaHII, LqqV, AaHII-Modifikation Y5E, LqhαIT und Cn2 verwendet. Bei dem Trichternetzspinnen-Toxin δ-ACTX-Ar1 stammen die Konformere aus dem Vergleich einer freien und einer mit experimentellen NMR-Restraints¹ durchgeführten Simulation. Dabei wurden andere Protokolle verwendet. Allerdings ergab das ausgewählte Konformer der Simulation mit Restraints (Eingabe s. Anhang F4) eine sinnvolle Überlagerung mit den Skorpion-Toxinen. Deshalb wurde auf eine erneute Berechnung nach dem in Tabelle 4.4 beschriebenen Protokoll verzichtet.

Im Folgenden soll am Beispiel des Seeanemonen-Toxins ApB das Vorgehen zur Generierung stabiler Konformere der Polypeptide gezeigt werden.

¹ Die verwendeten NMR-Restraints definieren Abstände von zwei Atomen.

4.3 Moleküldynamik-Simulation von ApB

Als Startstruktur für die MD-Simulation von ApB wurde die NMR-Konformation 7, die am nächsten zur geometrischen Durchschnittsstruktur der 20 NMR-Konformationen liegt, eingesetzt. Bei dem Molekül findet man eine cis-Peptidbindung zwischen Gly40 und Pro41. Die Untersuchung wurde in einer Wasserbox mit 56x50x50 Å Kantenlänge und periodischen Randbedingungen durchgeführt.

4.3.1 Auswertung der freien MD-Simulation

4.3.1.1 Flexibilität

Für die 60 *frames* der freien MD-Simulation wurden die *root mean square*-Werte (RMSD) bezogen auf die Rückgrat-Atome der Durchschnittsstruktur sowie die *angular order*-Parameter (AOP) für die einzelnen Aminosäuren berechnet (PROCHECK-NMR [95]).

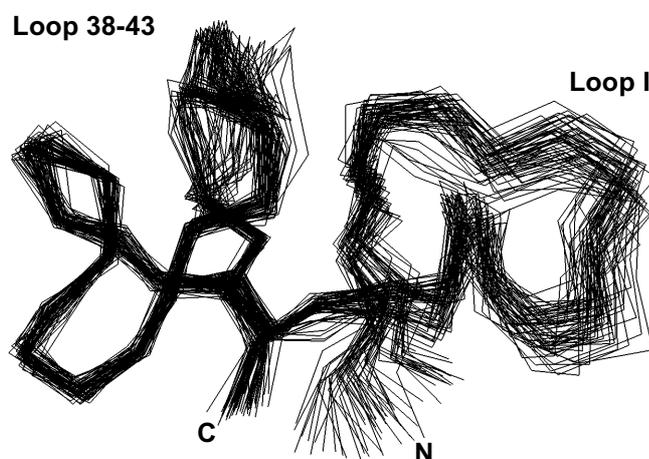


Bild 4.5: Dargestellt ($C\alpha$ -Atome) sind die 60 *frames* der freien MD-Simulation nach Superpositionierung auf die $C\alpha$ -Atome der größten *local structural domain* LSD1 (Aminosäuren 19-26, 28-35, 45-49).

In Bild 4.6 sind die berechneten RMS-Werte der einzelnen Aminosäuren von ApB dargestellt. Bei der Superpositionierung auf alle Rückgrat-Atome wurden größere Veränderungen der Rückgrat-Atome ($RMSD > 1,0$ Å) bei den Aminosäuren 1-2, 7-15, 26-27, 31, 38-40, 42-43 und 49 gefunden. Deutlicher wurden die Unterschiede zwischen variablen und wenig flexiblen Rückgrat-Atomen bei der Überlagerung auf die $C\alpha$ -Atome der größten *local structural domain* LSD1

(19-26, 28-35, 45-49), denn dabei werden Atome superpositioniert, die eine geringe Variabilität in allen Konformationen besitzen. Die Bestimmung der LSD1 wird in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben. Es ergaben sich nach dieser Überlagerung RMS-Werte $> 1,0 \text{ \AA}$ für den C- und N-Terminus. Außerdem traten hohe Werte in den Bereichen 6-18 (Loop I) und 38-43 auf. Diese deutlich flexibleren Bereiche sind gut in der Überlagerung der 60 *frames* in Bild 4.5 zu erkennen.

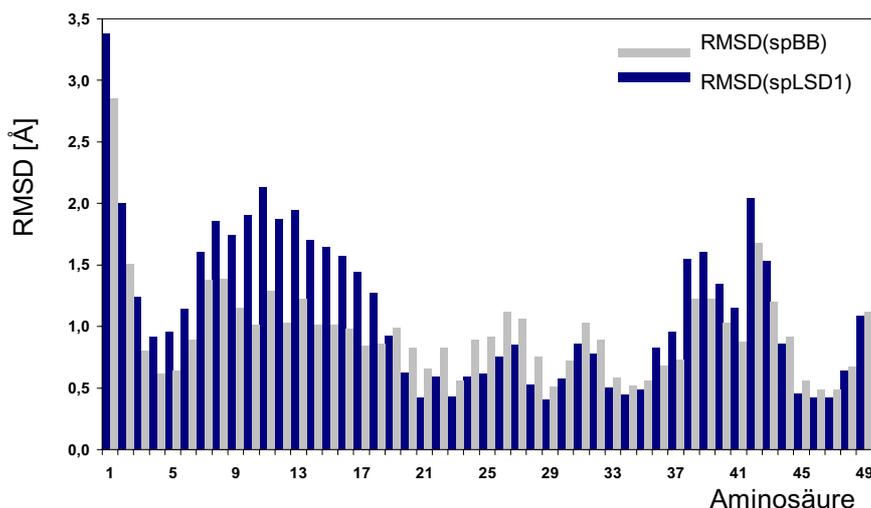


Bild 4.6: RMS-Werte für die Rückgrat-Atome der einzelnen Aminosäuren von ApB bezogen auf die Durchschnittsstruktur der 60 *frames* aus der freien Simulation. RMSD(spBB) gibt die Werte nach der Superpositionierung auf alle Rückgrat-Atome, RMSD(spLSD1) auf die C α -Atome der LSD1 wieder.

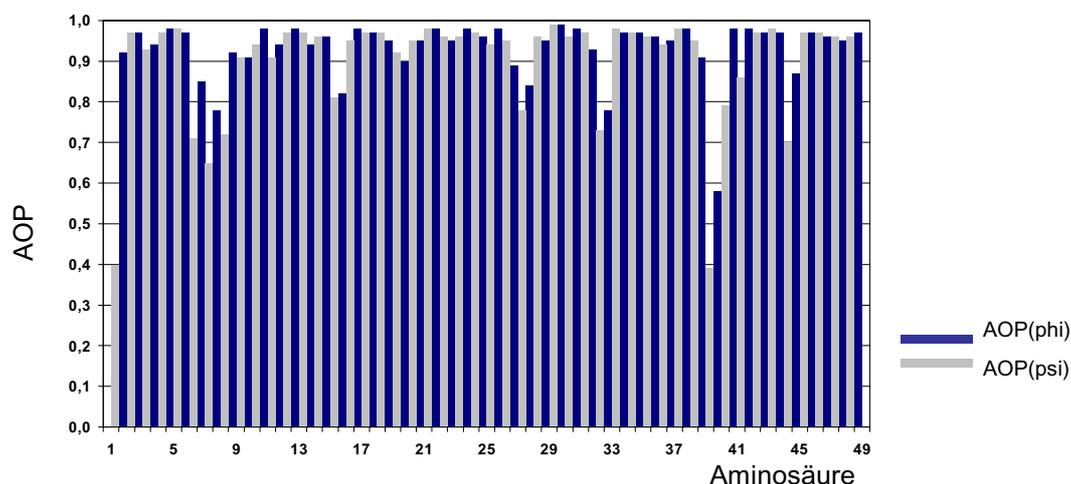


Bild 4.7: *Angular order*-Parameter (AOP) für die phi- und psi-Winkel der einzelnen Aminosäuren von ApB

In Bild 4.7 sind die AOPs der einzelnen Aminosäuren dargestellt. Es fällt auf, dass im Loop I-Bereich trotz hoher RMS-Werte die Variabilität der Proteinerückgrat-Torsionswinkel (ϕ , ψ) auf die Aminosäuren am Beginn (6-8) bzw. am Ende (15, 16) des Loops beschränkt ist. Der Loop in sich bleibt bei der Simulation relativ stabil (s. Bild 4.8). Auf die Stabilität dieser Region wird in Kapitel 4.7 detaillierter eingegangen.

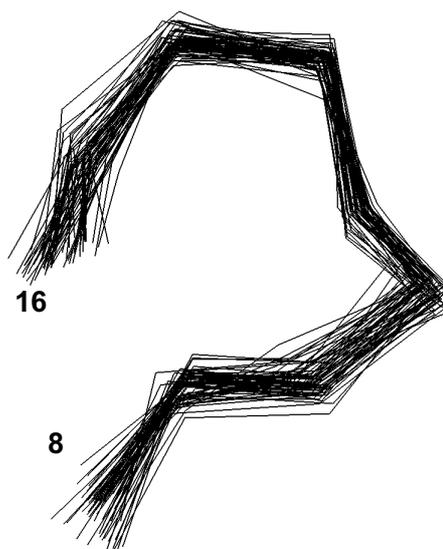


Bild 4.8: Darstellung der α -Atome des Loops I der 60 *frames* nach der Superpositionierung auf die Rückgrat-Atome der Aminosäuren 8-16.

4.3.1.2 Einteilung in *Cluster*

Zur Einteilung der *frames* in konformatorisch ähnliche Gruppen (*cluster*) wurden zunächst mit dem Programm NMRCORE [98] die *local structural domains* (LSDs) bestimmt. Dabei wurden die Standardparameter des Programms verwendet. Es ergaben sich die sechs, in Tabelle 4.5 beschriebenen LSDs.

Tabelle 4.5: *Local structural domains* (LSDs), ermittelt mit NMRCORE

	LSD1	LSD2	LSD3	LSD4	LSD5	LSD6
Aminosäuren	19-26, 28-35, 45-49	9-14	15-18	36-39	41-44	3, 5-6
Anteil^a [%]	50,00	14,29	9,52	9,52	9,52	7,14

^a bezogen auf die Anzahl der *core*-Atome (Atome mit geringer Variabilität in allen Konformationen)

Anschließend wurde mit NMRCLUST [97] die Einteilung vorgenommen. Dabei wurde für die Überlagerung der einzelnen Konformationen die größte *local*

structural domain, LSD1 (19-26, 28-35, 45-49), verwendet. Die *cluster* wurden danach über alle schweren Atome (C-, N-, O-, S-Atome) gebildet. Es ergaben sich sieben *cluster*, deren Populationen in Tabelle 4.6 dargestellt sind.

Tabelle 4.6: Einteilung der 60 MD-Konformationen durch NMRCLUST

Cluster	1	2	3	4	5	6	7
Frames	26-42, 44	43, 45-57	12-19	5-11	20-25	1-4	58-60
Anzahl	18	14	8	7	6	4	3
RF^a	RF33	RF50	RF14	RF8	RF21	RF2	RF59
Häufigkeit [%]^b	30,0	23,3	13,3	11,7	10,0	6,7	5,0

^a RF: repräsentativer *frame* eines *clusters*

^b Häufigkeit bezogen auf die 60 untersuchten Konformationen

4.3.1.3 Energieminimierung der repräsentativen *Frames*

Die repräsentativen *frames* (RFs) der sieben *cluster* aus Tabelle 4.6 wurden nach dem in Tabelle 4.7 beschriebenen Protokoll energieminiert (Eingabe s. Anhang F3). Dabei wurde wie bei der MD-Simulation ein *cutoff* von 15 Å sowie eine Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 4$ verwendet. Die Omega-Torsionswinkel wurden mit Ausnahme der cis-Peptidbindung (Gly40-Pro41) mit einer Kraftkonstante von 20 kcal/molÅ² in der trans-Konformation gehalten. Zu Beginn der Optimierung wurde eine hohe Kraftkonstante (TF = 500 kcal/molÅ²) auf die Atome des Polypeptids gelegt, damit sich möglichst geringe Veränderungen zur Ausgangskonformation ergaben.

Tabelle 4.7: Protokoll für die Minimierung der repräsentativen *frames* (RFs) (s. Tabelle 4.6)

Atome mit TF^a	TF^a [kcal/molÅ ²]	Algorithmus^b	Schritte	Konvergenzkriterium [kcal/molÅ]
Polypeptid	500	SD	2000	5
	500	CG	2000	5
	100	CG	2000	5
	50	CG	2000	1
	10	CG	2000	0,1
	0	CG	5000	0,1

^a TF (*tethering force*) ist die Kraftkonstante, mit der die Atome auf ihren Ursprungskordinaten festgehalten werden (*tethering*).

^b Die verwendeten Minimierungs-Algorithmen sind *steepest descent* (SD) und *conjugate gradient* (CG).

4.3.1.4 Auswahl einer MD-Konformation

Für die Bewertung der minimierten repräsentativen *frames* (RFs) wurde die Größe des vertretenen *clusters* als Hinweis auf die Stabilität der Konformation berücksichtigt. Eine Konformation, die über eine längere Simulationsdauer stabil bleibt oder erneut auftritt, scheint eine günstige Geometrie des Moleküls darzustellen. Weiterhin wurden die Gesamtenergie und die stereochemischen Eigenschaften (PROCHECK [121]) untersucht. In Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse dieser Auswertung zusammengefasst.

In der Regel werden bei der beschriebenen Vorgehensweise *cluster* gefunden, in denen bei der freien Simulation relativ früh auftretende *frames* enthalten sind und die zusätzlich eine relativ geringe Populationsdichte besitzen. Sie geben ein System wieder, das noch nicht im Gleichgewichtszustand vorliegt. Bei ApB fallen hierunter die *cluster* 4 bzw. 6, in denen die *frames* 5-11 bzw. 1-4 zusammengefasst sind. Die Gesamtenergien der repräsentativen *frames* RF2 und RF8 liegen außerdem etwa 10% höher als der niedrigste Wert (*cluster* 2, RF50: 278,0 kcal/mol). Beide *frames* wurden für weitere Untersuchungen nicht berücksichtigt. Ebenfalls nicht weiter betrachtet wurden die Vertreter der *cluster* 5 und 7. Die Anzahl der hier zusammengefassten *frames* ist relativ gering. Außerdem werden in der Sekundärstruktur nur drei Strands gefunden, und die G-Faktoren sind im Vergleich zu denen der *cluster* 1, 2 und 3 schlechter.

Beim Vergleich der repräsentativen *frames* der *cluster* 1, 2 und 3 wurden für RF33 (*cluster* 1) die besseren Ergebnisse gefunden. RF33 repräsentiert eine größere Anzahl von Konformationen aus der Simulation, und die Betafaltblatt-Struktur blieb mit vier Strands stabil. Die Gesamtenergie unterscheidet sich gering vom minimalen Wert des *frames* RF50 (278 kcal/mol), und die Überlagerung der Rückgratotope dieser Vertreter von *cluster* 1 (RF33) und 2 (RF50) ergab einen RMS-Wert von 1,09 Å (nicht abgebildet). Dabei wurden nur leichte Unterschiede in der Konformation des N-Terminus und des Loops I gefunden. Die Lage der wichtigen Aminosäuren (vgl. Kapitel 4.5) war vergleichbar. Deshalb wurde RF33 des *clusters* 1 für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Tabelle 4.8: Ergebnisse für die minimierten repräsentativen *frames* (RF) der sieben *cluster*

Cluster	1	2	3	4	5	6	7
RF	RF33	RF50	RF14	RF8	RF21	RF2	RF59
Frames	26-42, 44	43, 45-57	12-19	5-11	20-25	1-4	58-60
Häufigkeit^a [%]	30,0	23,3	13,3	11,7	10,0	6,7	5,0
Gesamtenergie^b [kcal/mol]	280,8	278,0	293,8	305,0	288,3	308,8	288,0
Ramachandran-Plot^c [%]							
am meisten bevorzugte Region	70,6	70,6	67,6	76,5	61,8	82,4	73,5
bevorzugte Region	23,5	23,5	29,4	17,6	35,3	17,6	23,5
geduldete Region	2,9	2,9	0	0	0	0	0
unerlaubte Region	2,9 ^d	2,9 ^d	2,9 ^d	5,9 ^d	2,9 ^d	0	2,9 ^d
Seitenketten mit ungünstigen Torsionswinkeln^c							
χ_1 - χ_2 -Torsionswinkel (von 28 Aminosäuren)	0	0	1	1	1	0	0
Betafaltblatt^c							
Anzahl der Strands	4	3	3	4	3	4	3
G-Faktor^c (Durchschnittswert für alle Aminosäuren)							
Gesamtdurchschnitt	-0,45	-0,42	-0,44	-0,50	-0,51	-0,43	-0,47

^a bezogen auf 60 *frames*

^b Die Gesamtenergie berücksichtigt die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen des Toxins ApB.

^c Untersuchung mit PROCHECK, Erläuterungen s. Tabelle 4.3

^d Bei diesen RFs wurde Asn16 in einer unerlaubten Region des Ramachandran-Plots gefunden. Die Aminosäure liegt im Loop I und ist an Wasserbrücken-Bindungen beteiligt, wodurch die ungünstige Konformation verursacht wird. Deshalb soll hierauf nicht weiter eingegangen werden.

4.3.2 Vergleich der MD-Konformation mit der Startstruktur

4.3.2.1 Überlagerung der Konformationen

Die ausgewählte Konformation des *clusters* 1 (RF33) wurde mit der NMR-Konformation 7, die als Ausgangstruktur für die Simulation verwendet wurde, verglichen. Bei der Überlagerung der Konformationen wurden vor allem im N-terminalen Bereich sowie im Loop I Unterschiede gefunden. Der RMS-Wert für die Rückgratatome des gesamten Moleküls ergab 2,73 Å (s. Bild 4.9). In der NMR-Struktur waren aber lediglich die Bereiche der Aminosäuren 2-7 und 18-49 gut definiert. Bei der Überlagerung auf die Rückgratome dieser Aminosäuren lag der RMS-Wert deutlich niedriger bei 1,85 Å.

Die NMR-Struktur wurde bei einer Temperatur von 25 °C und einem pH-Wert von 4,5 bestimmt. Bei diesem pH-Wert liegen His34 (s. Bild 4.9: Bereich A) und His39 (Bereich B) zum größten Teil protoniert vor. Im Gegensatz dazu wurde die Simulation bei physiologischem pH-Wert (7,4) mit nicht ionisiert vorliegenden Histidinen und einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Struktur von ApB blieb trotz dieser Unterschiede bei RF33 in den Bereichen A und B weitestgehend unbeeinflusst. Die Konformation der freien MD-Simulation wurde nach diesen Ergebnissen als unter physiologischen Bedingungen mögliches Konformer von ApB eingestuft.

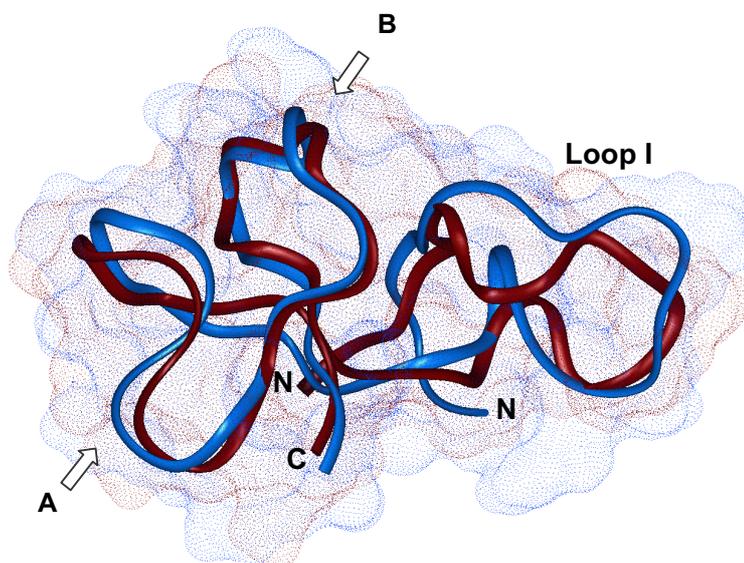


Bild 4.9: Überlagerung der ausgewählten MD-Konformation RF33 (*blau*) auf die NMR-Konformation 7 (*dunkelrot*) unter Berücksichtigung aller Rückgrat-Atome (RMS-Wert 2,73 Å). Dargestellt sind Bändermodelle mit Connolly-Oberflächen. Im Bereich A liegt His34, im Bereich B His39.

4.3.2.2 Untersuchung der geometrischen Eigenschaften

In Tabelle 4.9 sind die PROCHECK-Ergebnisse für die NMR-Konformation 7 und die MD-Konformation RF33 dargestellt. Dabei zeigt die MD-Konformation in der ϕ - ψ -Winkelverteilung (Ramachandran-Plot), den Seitenketten-Konformationen und den G-Faktoren günstigere geometrische Eigenschaften.

Tabelle 4.9: Vergleich der PROCHECK-Ergebnisse für die NMR- bzw. MD-Konformation

	NMR 7	RF33
Ramachandran-Plot^a		
am meisten bevorzugte Region [%]	44,1	70,6
bevorzugte Region [%]	50,0	23,5
geduldete Region [%]	2,9	2,9
unerlaubte Region [%]	2,9	2,9
Seitenketten mit ungünstigen Torsionswinkeln		
χ_1 - χ_2 -Torsionswinkel (von 28 Aminosäuren)	2	0
G-Faktoren^a (Durchschnittswerte für alle Aminosäuren)		
Torsionswinkel	-0,50	-0,41
Bindungslängen und Bindungswinkel (Hauptkette)	-0,49	-0,45
Gesamtdurchschnitt	-0,50	-0,44

^a Erläuterungen s. Tabelle 4.3

Bei den Werten für die NMR-Konformation wird ein Problem deutlich, das generell bei der durchgeführten Untersuchung von NMR-Strukturen aufgetreten ist. Es ergaben sich dabei relativ schlechte Übereinstimmungen mit den geometrischen Eigenschaften, die für Kristallstrukturen typische Werte darstellen. Ein MD-Konformer, das ein Modell darstellt, kann nicht besser sein als seine Vorlage. Deshalb wurde auf den Vergleich mit den Idealwerten, die sich aus Untersuchungen von Kristallstrukturen ergeben haben, verzichtet. Stattdessen wurden die geometrischen Eigenschaften der minimierten Konformere untereinander verglichen.

4.3.3 Einfluss der Simulationsdauer auf die Konformation

Weiterhin wurde untersucht, ob eine längere Simulationsdauer zu einer deutlichen Veränderung der Konformation des Polypeptids führt. Deshalb wurden freie Simulationen über 120 ps bzw. 322 ps nach identischen Kriterien ausgewertet.

Aus der über 322 ps freien Simulation wurde ebenfalls der Vertreter des größten *clusters* (10,6% von 161 *frames*) aufgrund seiner günstigeren Eigenschaften ausgewählt. Die Gesamtenergie dieses *frames* lag bei 267,1 kcal/mol, was einer Differenz von etwa 5% zur Energie des ausgewählten Vertreters der kürzeren Dynamik entsprach. Dies wurde nicht als charakteristischer Unterschied gewertet, da auch bei der kürzeren Simulation zwischen den reprä-

sentativen *frames* RF33 und RF50 zu RF14 ein vergleichbarer Unterschied aufgetreten war.

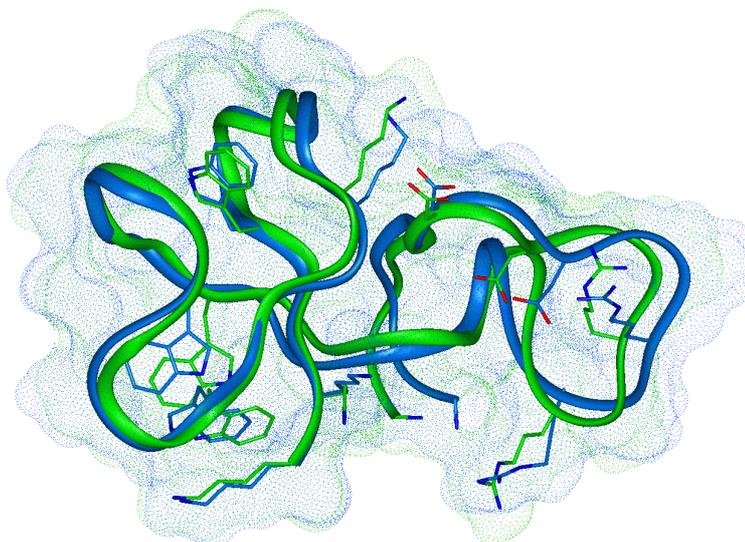


Bild 4.10: Ausgewählte Konformere der Untersuchungen einer über 120 ps (*blau*) bzw. 322 ps (*grün*) freien MD-Simulation von ApB (überlagert auf die Rückgratatome). Dargestellt sind Bändermodelle mit Connolly-Oberflächen.

Bei der Überlagerung der Rückgratome der beiden ausgewählten Konformere auf das Proteinrückgrat ergab sich ein RMS-Wert von 1,28 Å. In Bild 4.10 ist gut erkennbar, dass sich keine drastische Veränderung der Konformation ergeben hat, hydrophobe und hydrophile Aminosäuren unterscheiden sich in ihrer räumlichen Position nur gering. Insofern war es für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Überlagerungen der einzelnen Polypeptide unerheblich, welches Konformer eingesetzt wurde.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass sich bereits nach einer Simulationsdauer von 120 ps, bei denen das Polypeptid frei beweglich war, eine stabile Konformation eingestellt hatte. Bei den anderen MD-Simulationen wurde zur Einsparung von Rechenzeit auf längere MD-Simulationen verzichtet.

4.4 Weitere MD-Simulationen

Im Folgenden wird kurz die Auswahl der Startstrukturen für die MD-Simulationen der einzelnen Polypeptide beschrieben. Außerdem wird auf die Kapitel verwiesen, in denen die Ergebnisse näher erläutert werden.

Grundsätzlich wurde für die Untersuchungen aus den NMR-Konformationen die jeweils repräsentative als Startstruktur verwendet. Die minimierte Durchschnittsstruktur der NMR-Konformationen von BDSI (PDB: 1bds [58]) diente als

Vorlage für BDSII. Beide Polypeptide unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäuren. Die betreffenden Seitenketten in der Durchschnittsstruktur von BDSI wurden entsprechend substituiert.

Für AaHII standen zwei Kristallstrukturen zur Verfügung. Dabei wurde eine Struktur (1aho [71]) mit einer Auflösung von 0,96 Å, die andere (1ptx [125]) mit 1,3 Å aufgeklärt. Die beiden Konformationen von AaHII unterscheiden sich aber nur geringfügig, denn der RMS-Wert liegt für die Rückgratome bei 0,155 Å. Für die Simulation wurde die Struktur 1aho nach Amidierung (SWISS-PROT-Datenbank: SCX2_ANDAU) des C-terminalen Histidins verwendet.

Für das Seeanemonen-Toxin ApA wurde eine MD-Simulation mit der Konformation 7, die am nächsten zur Durchschnittsstruktur der 20 NMR-Konformationen liegt, durchgeführt. Außerdem wurde für eine weitere Simulation die Konformation 1 verwendet. Für die Berechnung des pK_a -Wertes wurde aus beiden Simulationen je ein Vertreter untersucht (vgl. Kapitel 4.6.2). Bei der Untersuchung der Loop I-Konformation, speziell der Aminosäure Arg14, wurden die mit der NMR 1-Konformation erzielten Ergebnisse verwendet (vgl. Kapitel 4.7).

Auch für das Skorpion-Toxin Lqh α IT (1lqi, 1lqh [116]) wurden zwei MD-Simulationen durchgeführt. Zum einen wurde die Konformation 1 (1lqi) als Startstruktur verwendet (Lqh α IT-MD1). Hier findet man allerdings im N-terminalen Bereich die Aminosäure Met, die normalerweise bei diesem Toxin nicht auftritt. Deshalb wurde eine weitere Simulation mit der minimierten Durchschnittsstruktur (1lqh) ohne diese Aminosäure durchgeführt (Lqh α IT-MD2). Die Unterschiede in den Konformationen der beiden Simulationen zeigten sich vor allem in flexiblen Bereichen. Deshalb wurden Konformere aus beiden Simulationen bei den Überlagerungen der Toxingruppen verwendet (vgl. Kapitel 4.10.3).

Ein Modell für das Skorpion-Toxin LqqV wurde mit dem HOMOLOGY-Modul des INSIGHTII-Programmpaketes [100] aufgebaut. Dabei wurden nach einem Alignment mit AaHII die Koordinaten der Kristallstruktur (1aho) für das Proteinrückgrat und die identischen Aminosäuren übernommen. Bei den unterschiedlichen Aminosäuren in Modell- und Referenzmolekül wurden die Koordinaten der Seitenketten so weit wie möglich zugewiesen. Die über diese Seitenketten hinausreichenden Atome wurden in gestreckter Konformation angeordnet. Mit diesem Modell wurden weitere Optimierungsschritte vor der Simulation durch-

geführt. Die Anwendung der Rotamerbibliothek nach Ponder und Richards¹ brachte keine Verbesserung der geometrischen Eigenschaften [126].

4.5 Funktionelle Seite des Seeanemonen-Toxins ApB

Für die Erstellung des Toxiphor-Modells mussten zunächst Literaturodaten über Sequenzvergleiche, chemische Modifikationen und Mutationsstudien ausgewertet werden, um Anhaltspunkte über wichtige Aminosäuren der Seeanemonen-Toxine zu erhalten. Aus diesen Informationen ergibt sich ein Bereich, der als „funktionelle Seite“ des Toxins bezeichnet wird und mit dem Natriumkanal interagieren könnte. Da in der Literatur zum Teil widersprüchliche Ergebnisse publiziert sind, wurden vor allem die Mutationsstudien mit ApB der Arbeitsgruppen Blumenthal und Hanck berücksichtigt. Derzeit ist ApB das einzige Typ 1-Seeanemonen-Toxin, von dem detaillierte Mutationsstudien zur Verfügung stehen.

Zur Abschätzung der Wirksamkeit eines Polypeptids wird bei den Mutationsstudien vor allem die *ion flux*-Methode verwendet [127]. Hierbei wird ermittelt, in welchem Ausmaß das Toxin bzw. seine Mutante synergistisch mit dem Steroidalkaloid Veratridin die Natriumionen-Aufnahme in Zellen erhöhen kann. Bei Veratridin handelt es sich um einen Natriumkanal-Aktivator, der die Aktivierungszeit verlängert. Bei den Experimenten werden die Zellen zunächst in einem Natrium-freien Medium mit Veratridin und unterschiedlichen Konzentrationen des zu testenden Toxins vorinkubiert. Danach wird in ²²Na⁺-haltigem Medium (β -Strahler) die absolute Aufnahme der Natriumionen gemessen. Nach Abschluss der Messung wird zusätzlich die Masse der vorhandenen Natriumkanäle bestimmt. Für jede Toxinkonzentration werden mehrere Versuche durchgeführt und die gemessene Natriumaufnahme um den Anteil korrigiert, den Veratridin alleine verursachen würde. Aus den erhaltenen Daten werden die kinetischen Konstanten $k_{0,5}$ und V_{max} berechnet. Dabei gibt $k_{0,5}$ [nM] die Bindungsaffinität und V_{max} [nmol/min pro mg Protein] die Fähigkeit, die offene Konformation des Kanals zu stabilisieren, wieder.

Bemerkenswert war in den Studien die Beobachtung, dass bei einigen Mutanten die Veränderungen von $k_{0,5}$ und V_{max} nicht einheitlich verliefen. So zeigte die ApB-Mutante R12SK49Q eine reduzierte Bindungsaffinität und den-

¹ Die Rotamerbibliothek nach Ponder und Richards enthält energetisch günstige Seitenkettenrotamere, die häufig in Proteinkristallstrukturen beobachtet werden.

noch einen um 20% höheren V_{\max} -Wert als ApB selbst (s. Tabelle 4.10). Hierauf wird in Kapitel 4.7 eingegangen.

Die Mutanten wurden vielfach in neuronalen und kardialen Testsystemen untersucht. Dabei ergaben sich zum Teil sowohl für die Bindungsaffinität als auch für die Fähigkeit, die offene Konformation des Kanals zu stabilisieren, Unterschiede in Bezug auf die neuronale bzw. kardiale Isoform des Natriumkanals (s. Tabelle 4.10). Insofern scheinen hier trotz der hohen Homologie zwischen den Isoformen der Kanäle zum Teil unterschiedliche Bereiche der Toxine für die Effekte von Bedeutung zu sein. Da die Untersuchungen der Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine in der Regel am neuronalen Natriumkanal der betreffenden Spezies (Säuger, Insekten) durchgeführt werden, wurde im Rahmen der Arbeit nur die jeweilige neuronale Isoform betrachtet.

Tabelle 4.10: Experimentelle Daten, die mittels *ion flux*-Methode bestimmt wurden.

Toxin	$k_{0,5}^a$, neuronal [nM]	V_{\max}^b , Mutante/ApB neuronal	$k_{0,5}^a$, kardial [nM]	V_{\max}^b , Mutante/ApB kardial
ApB ^c	22	1,0	9	1,0
ApA ^c	400	0,6	14	0,8
R12SK49Q ^c	818	1,2	43	0,9
R12SR14Q ^c	1588	0,3	504	1,1
W45A ^d	97	0,4	69	0,4

^a Bindungsaffinität

^b V_{\max} gibt die Fähigkeit des Toxins wieder, die offene Konformation des Kanals zu stabilisieren.

^c Khera et al. [128]

^d Dias-Kadambi et al. [129]

In Tabelle 4.11 ist aufgelistet, welche Aminosäuren einen Einfluss auf die Bindungsaffinität von ApB zum neuronalen Säugerkanal besitzen. Interessant war bei den Mutationsstudien an ApB, dass keine Substitution gefunden wurde, die zu einem völligen Verlust der Aktivität führte. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der Bindungsstelle der Toxine am Kanal um eine *multisite* handelt, bei der mehrere Aminosäuren an Interaktionen beteiligt sind. Hierdurch kann das Fehlen einzelner Kontakte durch andere kompensiert werden.

Tabelle 4.11: Einstufung einzelner Aminosäuren von ApB in Bezug auf die Bindung am neuronalen Natriumkanal der Säuger.

drastischer Effekt	Literatur	geringer Effekt	Literatur
Trp33	[129]	Lys49	[131]
Leu18	[130]	Arg14	[134]
starker Effekt		Pro3	[133]
Arg12	[131]	Trp45	[129]
Asp9	[132]	Phe24	[133]
Lys37	[132]	α -Aminogruppe (N-terminal)	[135][136]
Pro13	[133]	sehr geringer Effekt	
deutlicher Effekt		Ile21	[133]
Lys48	[134]	Ile43	[130]
Asp7	[132]	Asn42	[133]
		His34	[132]

Die Verteilung der wichtigen Aminosäuren bei ApB gibt einen ersten Hinweis auf den möglichen Bindungsbereich des Toxins (s. Bild 4.11). Es fällt auf, dass die geladenen Aminosäuren auf eine bestimmte Region gegenüber der hydrophoberen Seite des Moleküls konzentriert sind (vgl. Kapitel 4.9). Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch bei den Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxinen gemacht.

Einfluss auf die Bindungsaffinität von ApB und die Hemmung der Inaktivierung zeigen sowohl hydrophobe als auch hydrophile Aminosäuren. Dabei kann die Bedeutung einer Aminosäure in der direkten Interaktion mit dem Rezeptor liegen, sie könnte aber auch die Konformation des Moleküls selbst oder die Anordnung von Aminosäuren stabilisieren, die für die Interaktion mit dem Rezeptor wichtig sind. Weiterhin wäre eine Beteiligung an der Ausbildung eines charakteristischen molekularen elektrostatischen Potentials möglich.

Bei den Mutationsstudien wurde nur für Leu18 und Trp33 eine sehr hohe Bedeutung für die Affinität von ApB festgestellt (s. Tabelle 4.11). Dies stimmt mit Untersuchungen überein, bei denen gezeigt wurde, dass die Wechselwirkungen weniger Aminosäuren bei Protein-Protein-Komplexen den größten Anteil der Bindungsenergie ausmachen (vgl. Kapitel 1.6). Bei diesen Wechselwirkungen waren zumeist hydrophobe Aminosäuren beteiligt.

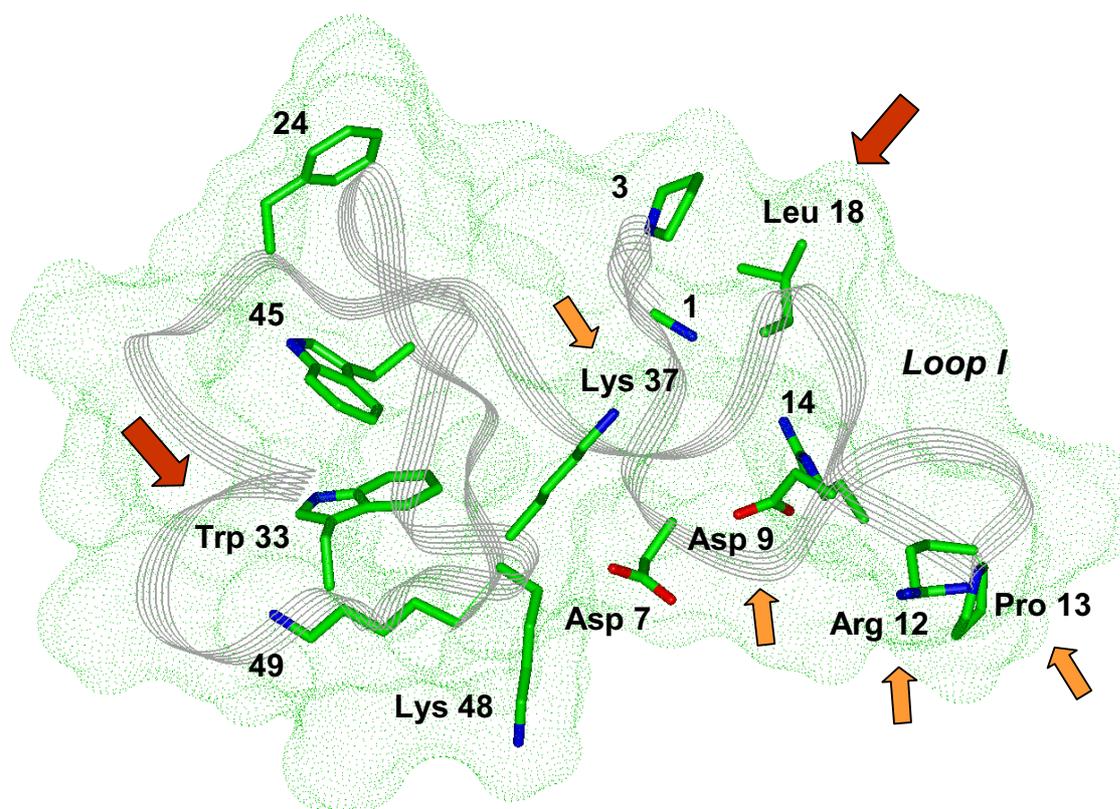


Bild 4.11: Wichtige Aminosäuren (Einstufung s. Tabelle 4.11) des Seeanemonen-Toxins ApB. Darstellung eines Bändermodells mit Connolly-Oberfläche; die Seitenketten sind nach Atomtypen gefärbt: Kohlenstoffe grün, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot. Dunkle Pfeile kennzeichnen sehr wichtige, helle wichtige Aminosäuren.

Die positiv geladene Aminosäure Arg12, die bei den Seeanemonen-Toxinen lediglich bei ApB gefunden wird, besitzt eine wichtige funktionelle Bedeutung. Im Gegensatz dazu konnte für die konservierte Aminosäure Arg14 nur ein geringerer Beitrag zur Bindungsaffinität festgestellt werden. Lys49 kommt ebenso wie Arg12 bei Typ 1-Toxinen nur bei ApB vor, es besitzt allerdings nur eine geringe funktionelle Bedeutung.

Für die Aminosäure Asp9 konnte eine funktionelle Bedeutung gezeigt werden. Mutationen von Pro13, das bei Typ 1-Seeanemonen-Toxinen lediglich bei dem wirkstärksten Polypeptid ApB vorkommt, führten zu einer stark verringerten Bindungsaffinität. Die Funktion von Pro13 liegt dabei nicht in einer direkten Interaktion mit dem Kanal, sondern eher in der Stabilisierung der Konformation des ansonsten relativ flexiblen Loops I (Aminosäuren 8-17). Dieser Loop I scheint von besonderer Bedeutung zu sein. Man findet bei ApB in diesem Bereich vier für die Affinität wichtige Aminosäuren: Asp9, Arg12, Pro13 sowie Arg14. Aus ihren Mutationsstudien schlossen Khera et al., dass Arg12 und

Pro13 für die im Vergleich zu den anderen Typ 1-Toxinen erhöhte Affinität von ApB wichtig sind [128].

Interessant ist weiterhin die Beobachtung, die Gould et al. bei der Spaltung des Loops im Toxin ApA machten [137]. Nach dieser Spaltung konnte bei Versuchen mit präparierten Herzen keine positiv inotrope Aktivität des Toxins mehr gemessen werden, obwohl die Bindung nahezu unverändert erfolgte. Zwar wurden in der unmittelbaren Umgebung von Arg14 und Gly15 leichte Veränderungen der dreidimensionalen Struktur beobachtet, es ergaben sich dennoch keine grundlegenden Modifikationen in der Faltung des Proteinerückgrats. Für die kardiale Aktivität scheint demnach die Integrität des Loops I essentiell zu sein, obwohl sie für die Bindung an den Rezeptor keine unmittelbare Bedeutung besitzt.

Interessant sind die Untersuchungen bezüglich der Funktion von Lys37, dessen Austausch ebenfalls zu einer starken Reduktion der Affinität führt. Benzinger et al. zeigten, dass vermutlich Lys37 von ApB mit Asp1612 am kardialen Natriumkanal der Ratten interagiert [138]. Diese Untersuchungen basierten auf den vorhergehenden Experimenten von Rogers et al., die zeigen konnten, dass für die Bindung der Seeanemonen-Toxine am neuronalen Natriumkanal aus Rattenhirn (Typ IIa) zwei Glutamate, Glu1613 und Glu1616, wichtig sind [31]. Die Aminosäure Asp1612 am kardialen Kanal entspricht aufgrund der Homologien Glu1613 am neuronalen Kanal. Demnach könnte Lys37 auch bei den neuronalen Natriumkanälen als Wechselwirkungspartner von Glu1613 in Frage kommen. Dabei ist die genaue Lage von Glu1613 umstritten. In einigen Veröffentlichungen wird eine Position im Segment S3 postuliert, andere vermuten eine Lage am extrazellulären Ende des S3-Segments oder eine Position an der extrazellulären Oberfläche des Kanals (Referenzen s. [31]).

In der Umgebung von Lys37 findet man neben sehr wichtigen Aminosäuren, wie Asp9 und Arg12, auch Asp7 und Lys48, deren Substitution einen deutlichen Effekt auf die Affinität zeigt. Zudem fiel bei der Untersuchung der Dimutante R12SK49Q, die im Vergleich zu ApB die offene Konformation des Kanals besser stabilisieren kann, die höhere Rigidität des unmittelbar benachbarten Umfeldes (Aminosäuren 6-9) von Lys37 auf (vgl. Kapitel 4.7). Insofern scheint dieser Bereich von besonderem Interesse zu sein.

Modifikationen von Asp7 stellten sich als schwierig heraus, da diese Aminosäure für die Faltung des Polypeptids eine wichtige Rolle spielt [132]. So konnte

nach der Substitution durch Ala kein intaktes Molekül isoliert werden. Der Austausch durch Asn führte zu einer 4fachen Reduktion der Affinität für die neuronalen Kanäle. Da von Asn aber immer noch Wasserstoffbrücken-Bindungen akzeptiert und doniert werden können, ist es durchaus möglich, dass Asp7 für die Funktion eine noch höhere Bedeutung besitzt.

Die Auswertung der Daten über die Bedeutung der N-terminalen α -Aminogruppe stellte sich als schwierig heraus, denn in der Literatur werden die Untersuchungsergebnisse unterschiedlich bewertet. Chemische Modifikationen von ATXII ergaben, dass die α -Aminogruppe grundsätzlich eine Rolle spielt, auch wenn ihr Einfluss auf die Affinität als gering eingestuft wird [135]. Im Gegensatz dazu fanden Gallagher et al. bei einer N-terminalen Verlängerung von ApB um Gly und Arg keine funktionelle Veränderung [127]. Zu diesem Ergebnis kamen auch Kelso et al., die Eigenschaften von Glu-ApB untersuchten [133]. Beide Autoren schlossen daher eine Bedeutung der α -Aminogruppe für die Wirkung von ApB aus. Dagegen ist aber einzuwenden, dass sowohl bei Gly-Arg-ApB als auch bei Glu-ApB eine positiv geladene α -Aminogruppe vorhanden ist. Dies gilt in besonderem Maße für Gly-Arg-ApB, bei dem zusätzlich zur α -Aminogruppe durch Arginin eine weitere positive Ladung eingeführt wurde. Aus diesem Grund erfolgt die Einstufung der α -Aminogruppe im Rahmen der vorliegenden Arbeit als funktionelle Gruppe mit geringer Bedeutung für die Affinität, zumal der N-terminale Bereich in unmittelbarer Nähe zur wichtigen Aminosäure Leu18 liegt.

4.6 Säurestärken der Asparaginsäuren bei Seeanemonen-Toxinen

In der Sequenz von ApA findet man zwei Asparaginsäuren. Auffallend ist der untypisch niedrige pK_a -Wert von etwa 2 bei einer der beiden Aminosäuren [124], denn in kleinen Peptiden werden in der Regel Werte um 3,9 gefunden [123]. Für die Toxine ATXII (pK_a etwa 2) und ATXI ($pK_a = 3$) wurde ebenfalls jeweils eine stark saure Asparaginsäure festgestellt [124]. Die Ursachen für eine Erniedrigung des pK_a -Wertes sind meistens elektrostatische Interaktionen in Form von Salz- oder Wasserstoffbrücken.

Die strukturelle Bedeutung von Asp7 und Asp9 wurden von Gruen et al. durch NMR- und CD-Experimente untersucht [139]. Dabei ergab sich nach chemischer Modifikation der Asparaginsäuren von ApA eine deutlich veränderte Tertiärstruktur. Weiterhin konnte bei sehr niedrigem pH-Wert eine Veränderung

der Konformation festgestellt werden. Gooley et al. führten dies auf die Protonierung der stark sauren Asparaginsäure im Molekül zurück [124].

Allerdings gehen die Meinungen, welche der beiden Aminosäuren den stark erniedrigten pK_a -Wert von etwa 2 besitzt, in der Literatur auseinander (vgl. [55][124][132][137]). Die Ursache hierfür ist die unmittelbare räumliche Nähe der beiden Asparaginsäuren, durch die bei NMR-Untersuchungen keine Differenzierung möglich ist.

Zur Untersuchung der Bedeutung dieser beiden Asparaginsäuren für die Stabilisierung der Sekundärstruktur wurde zunächst in zwei MD-Simulationen jeweils eine der Aminosäuren protoniert (Asp7H und Asp9H). Dabei wurde in allen durchgeführten Dynamiken das Toxin ApB verwendet, dessen Eigenschaften im Rahmen dieser Arbeit sehr ausführlich untersucht wurden. Aufgrund der ähnlichen Strukturen und Eigenschaften von ApB und ApA bzw. ATXII ist auch bei diesem Toxin eine stark saure Asparaginsäure zu erwarten. In einer weiteren Simulation wurden sowohl Asp7 als auch Asp9 protoniert (Asp7H9H). Dies würde der Protonierung bei niedrigem pH-Wert entsprechen. Die Sekundärstrukturen der Konformationen aus den verschiedenen Dynamiken wurden mit PROCHECK-NMR [95] untersucht und mit den Ergebnissen einer Simulation des unveränderten ApBs verglichen. Bei allen MD-Simulationen wurde ein einheitliches Protokoll verwendet (vgl. Kapitel 4.2.3). Außerdem erfolgte die Berechnung der pK_a -Werte für ApA und ApB mit dem Programm UHBD [101].

4.6.1 Vergleich der MD-Simulationen

Bei ApB findet man ein Betafaltblatt mit 4 antiparallelen Strands (s. Bild 4.12). Zusätzlich wird die Struktur durch drei Disulfidbrücken (4-46, 6-36, 29-47) stabilisiert. Zum Vergleich der Stabilität der Sekundärstruktur wurden jeweils 60 unminimierte Konformationen aus einem übereinstimmenden Zeitintervall (104 bis 222 ps) der vier Simulationen untersucht.

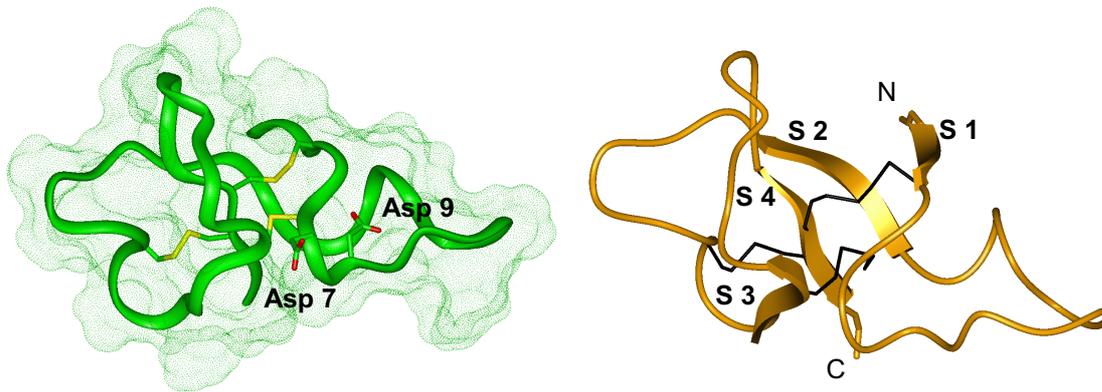


Bild 4.12: Abgebildet ist die NMR-Konformation 7 von ApB, die als Startstruktur für die MD-Simulationen verwendet wurde. *Links* sind neben den Disulfidbrücken (*gelb*) auch die beiden untersuchten Asparaginsäuren sowie die Connolly-Oberfläche dargestellt. *Rechts* ist die Betafaltblatt-Struktur mit den vier Strands (S1-S4) abgebildet. Auch hier sind zusätzlich die Disulfidbrücken gezeigt (*schwarz*).

In Tabelle 4.12 ist das Auftreten der einzelnen Strands bei den jeweiligen MD-Simulationen wiedergegeben. Beim Vergleich der Simulationen ApB und Asp7H wurden für die Strands 2, 3 und 4 des Betafaltblatts keine drastischen Unterschiede in der Häufigkeit gefunden. Die drei Strands blieben bei den Berechnungen sehr stabil (Auftreten > 60%). Im Gegensatz dazu trat aber Strand 1 in den Konformationen von Asp7H nicht mehr auf. Bei der Simulation Asp9H ergab sich ein ähnliches Ergebnis für Strand 1, das auch hier nicht gefunden wurde. Die Strands 2 und 4 waren wie bei den *frames* aus den Simulationen ApB und Asp7H sehr stabil (> 60%). Ein deutlicher Unterschied ergab sich für Asp9H im Auftreten von Strand 3, das hier nur noch in 42% der *frames* gefunden wurde. Außerdem konnte bei 17% der Konformationen überhaupt keine Betafaltblatt-Struktur festgestellt werden. Insofern deuten die MD-Simulationen auf eine wichtigere strukturelle Bedeutung von Asp9 gegenüber Asp7 hin.

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Sekundärstruktur-Analyse mit PROCHECK-NMR

	ApB [%] ^c	Asp7H^a [%] ^c	Asp9H^a [%] ^c	Asp7H9H^b [%] ^c
Strand 1 Aminosäuren 2-4	2	0	0	53
Strand 2 Aminosäuren 20-23	77	63	63	95
Strand 3 Aminosäuren 34-37	98	90	42	37
Strand 4 Aminosäuren 45-48	100	97	83	97
kein Strand	0	3	17	0

^a MD-Simulation mit je einer protonierten Asparaginsäure (Asp7 oder Asp9)

^b MD-Simulation, bei der beide Asparaginsäure protoniert vorlagen

^c Häufigkeit der gefundenen Strands bezogen auf 60 unminimierte *frames* aus einem übereinstimmenden Zeitintervall der jeweiligen MD-Simulation

Bei der Protonierung beider Asparaginsäuren in der MD-Simulation Asp7H9H zeigte sich ein anderes Verteilungsbild der Faltblattstruktur. Die Strands 2 und 4 traten auch hier in den 60 *frames* mit sehr hohen Prozentsätzen auf (≥95%). Zusätzlich konnte bei dieser Simulation deutlich häufiger Strand 1 (53%) gefunden werden. Im Gegensatz dazu war das Auftreten von Strand 3 in den Konformationen sehr stark reduziert (37%).

Bei der genaueren Untersuchung der Simulation Asp7H9H wurde deutlich, dass das Polypeptid in zwei verschiedenen Konformationen vorlag. Hierbei wurde eine Konformation durch die *frames* 1-41, die andere durch die *frames* 42-60 wiedergegeben. Deshalb wurde zusätzlich das Auftreten der Strands für die beiden Gruppen getrennt ausgewertet (s. Tabelle 4.13).

Tabelle 4.13: Sekundärstruktur-Analyse

	Asp7H9H		
	Frames 1–60 [%]	Frames 1–41 [%]	Frames 42–60 [%]
Strand 1	53	78	0
Strand 2	95	100	84
Strand 3	37	15	84
Strand 4	97	95	100

In der ersten Konformationsgruppe (*frames* 1–41) war das Auftreten von Strand 3 drastisch reduziert (15%). Auf der anderen Seite wurde aber Strand 1 mit 78% sehr häufig gefunden. Ein deutlich anderes Bild ergab die zweite Gruppe (*frames* 42–60). Hier traten lediglich die Strands 1-3 auf, die sich dafür aber sehr stabil zeigten (Auftreten > 80%).

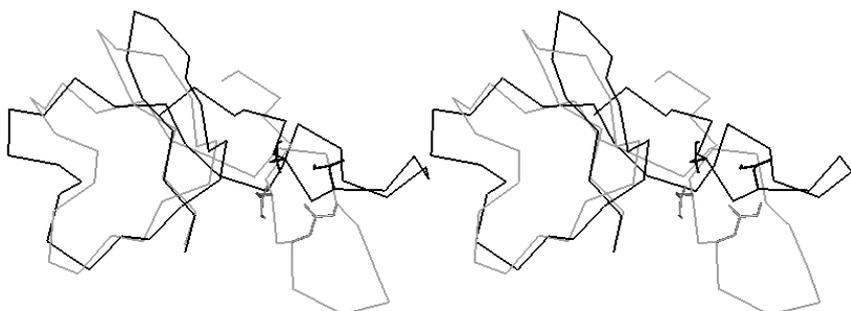


Bild 4.13: Stereoansicht von jeweils einer minimierten Konformation der beiden Gruppen, die sich bei der Simulation Asp7H9H mit beiden protonierten Asparaginsäuren ergeben haben (Darstellung der C α -Atome). Die Konformationen wurden auf die Proteinrückgrat-Atome der Aminosäuren 1-6 und 20-49 überlagert (RMSD = 2,5 Å).

Die Minimierung von repräsentativen Vertretern¹ beider Konformationsgruppen ergab nur geringe Unterschiede in der Gesamtenergie des Moleküls und des Gesamtsystems². Insofern führte die Protonierung beider Asparaginsäuren von ApB bei der MD-Simulation zu zwei unterschiedlichen, stabilen Konformationen (s. Bild 4.13). Die bei den NMR-Untersuchungen festgestellten Unterschiede infolge der Protonierung der stark sauren Asparaginsäure (pK_a etwa 2) könnten durch diese Veränderungen und Konformationswechsel hervorgerufen worden sein.

4.6.2 Berechnung der pK_a-Werte bei den Toxinen ApA und ApB

Zur Berechnung der pK_a-Werte für die ionisierbaren Aminosäuren der Toxine ApA und ApB wurde das *single site*-Modell des Programms UHBD [101] verwendet. Zur Überprüfung der Vorgehensweise wurde zunächst ApA untersucht, da Gooley et al. für dieses Polypeptid durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmte pK_a-Werte veröffentlicht haben [124].

¹ Die repräsentativen Vertreter wurden mit NMRCORE [98] und NMRCLUST [97] bestimmt.

² Die Energie des Gesamtsystems ergibt sich aus den intra- und intermolekularen Wechselwirkungen des Moleküls selbst und aus den Wechselwirkungen der Wassermoleküle untereinander.

4.6.2.1 Durchführung

Die NMR-Experimente waren bei 27°C in D₂O durchgeführten worden. Deshalb wurde bei den Berechnungen eine Temperatur von 300 K und eine Ionenstärke von 0 mol/L verwendet. Durch die herabgesetzte Ionenstärke fällt die Abschirmung der ionisierten Gruppen des Polypeptids durch eventuell umgebende Ionen weg, so dass vor allem der Einfluss der intramolekularen Interaktionen auf den pK_a-Werte erfasst wird. Das *single site*-Modell des Programms UHBD ergab in Untersuchungen deutlich bessere Ergebnisse bei der Verwendung einer relativ hohen Dielektrizitätskonstante ($\epsilon = 20$) für das Protein [101]. Die Autoren bewerten dies als Korrekturfaktor, da das Programm bei den Berechnungen auf die Anwendungen von Näherungen angewiesen ist. Daher wurde bei den durchgeführten Untersuchungen die Dielektrizitätskonstante $\epsilon = 20$ für das Polypeptid bzw. $\epsilon = 80$ für das Lösungsmittel verwendet. Die Partialladungen der Atome entsprachen dem *Consistent Valence Forcefield* (CVFF).

Zur Einsparung von Rechenzeit wurde mit einer *focussing*-Methode gearbeitet. Hierbei wurde zunächst um das Molekül ein Punktgitter der Kantenlänge 65 Å mit einem Abstand von 2,5 Å pro Gitterpunkt verwendet. Im weiteren Verlauf der Rechnung wurde die Kantenlänge auf 40 Å reduziert und die Abstände der Gitterpunkte schrittweise von 1,2 über 0,75 auf 0,25 Å herabgesetzt.

Bei den Berechnungen muss berücksichtigt werden, dass bei unterschiedlichen Konformationen eines Polypeptids die intramolekularen elektrostatischen Interaktionen unterschiedlich stark sein können. Da die Säurestärke der einzelnen Aminosäuren durch diese Wechselwirkungen beeinflusst werden kann, würden sich in diesen Fällen unterschiedliche Werte ergeben [108]. Deshalb wurden für die Untersuchungen mehrere Konformationen von ApA mit unterschiedlicher Herkunft verwendet. So wurden zum einen die pK_a-Werte für die repräsentative Konformation 7 aus den NMR-Konformationen bestimmt. Zum anderen wurden zwei *frames* aus unterschiedlichen MD-Simulationen getestet, bei denen lediglich andere Startkonformationen (NMR-Konformation 1 und 7) eingesetzt wurden (vgl. Kapitel 4.4).

4.6.2.2 Ergebnisse

In Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse der pK_a-Berechnungen für ApA im Vergleich mit den experimentellen Daten wiedergegeben. Die berechneten Werte für die N-terminale α -Aminogruppe von Gly1 und die Aminosäuren Arg14,

Tyr25, His34, Lys37 und His 39 stimmten bei allen untersuchten Konformationen mit einer Differenz von meist deutlich unter 1,1 pK_a-Einheiten gut mit den experimentellen Werten überein. Bei den MD-Konformationen ergaben sich außerdem für Lys48 mit den NMR-Daten vergleichbare Werte. Die C-terminale Carboxylatgruppe (Gln49) wurde in allen Konformationen als zu azide vorhergesagt. Bei den Dynamik-Konformationen lag der pK_a-Wert um 1,6 bzw. um 1,3 pK_a-Einheiten unter dem experimentell bestimmten. Die Berechnung mit der NMR-Konformation ergab für die C-terminale Carboxylatgruppe und für Lys48 pK_a-Werte, die eine Differenz von mehr als drei Einheiten zu den NMR-Daten aufwiesen. Insofern können die Konformationen aus den Dynamiken offensichtlich die tatsächlichen intramolekularen Interaktionen der ionisierbaren Gruppen am besten wiedergeben. Bei den berechneten pK_a-Werten für die beiden Asparaginsäuren Asp7 und Asp9 konnte bei allen Konformationen ein deutlich niedrigerer Wert für Asp7 gefunden werden.

Tabelle 4.14: pK_a-Werte für das Seeanemonen-Toxin ApA

Aminosäure	pK _{modell} ^a	exp. pK _a ^b	pK _{app} ^c		
			NMR 7	Dynamik I ^e	Dynamik II ^f
Gly 1, α-Aminogruppe	7,5	7,9	7,5	7,5	7,5
Asp 7	4,0	2 / 3,5	2,6	2,5	2,3
Asp 9	4,0	2 / 3,5	4,1	3,6	4,4
Arg 14	12,0	> 12	12,3	12,9	12,5
Tyr 25	9,6	9,9	9,5	9,7	10,1
His 34	6,3	6,9	6,6	6,1	5,8
Lys 37	10,4	11 / 11,4	11,0	10,9	11,4
His 39	6,3	6,7	5,8	5,6	6,0
Lys 48	10,4	11 / 11,4	14,5	11,8	11,5
Gln 49, Carboxylatgruppe	3,8	3,4-3,5 ^d	-0,8	1,8	2,1

^a Modellwerte, die das Programm UHBD verwendet.

^b Mittels ¹H-NMR bestimmte experimentelle Werte ohne Angabe der Standardabweichungen. Bei ApA treten zum Teil zwei Konformationen auf (cis-trans-Isomerisierung Gly40-Pro41), die häufigere Form ist in der Tabelle angegeben. Bei Lys37/ 48 und Asp7/ 9 ist keine Zuordnung der Werte vorgenommen worden [124].

^c Der apparente pK_a-Wert ist definiert als der Punkt in der berechneten Titrationskurve, bei dem die betreffende ionisierbare Gruppe zur Hälfte protoniert vorliegt. Die Berechnung erfolgte mit den Programmen UHBD und HYBRID.

^d ¹³C-NMR-Untersuchungen von Norton et al. [140]

^e Konformer aus einer MD-Simulation mit der NMR-Konformation 7 als Startstruktur

^f Konformer aus einer MD-Simulation mit der NMR-Konformation 1 als Startstruktur

Neben den Untersuchungen mit dem Toxin ApA wurden ebenfalls die pK_a -Werte für ApB berechnet. Auch hier wurden zwei verschiedene Konformationen verwendet. Die eine stammt aus den NMR-Konformationen (NMR 7), die andere aus einer MD-Simulation. Da für ApB keine detaillierten experimentellen Daten zur Verfügung standen, wurde hier auf eine genaue Betrachtung der einzelnen Werte verzichtet. Bei der Untersuchung ergaben sich für beide Konformationen deutliche Unterschiede in den pK_a -Werten zwischen Asp7 und Asp9. Übereinstimmend mit den Berechnungen für ApA wurde auch hier Asp7 azider als Asp9 eingestuft.

4.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit dem Programm UHBD konnten die experimentell bestimmten pK_a -Werte des Seeanemonen-Toxins ApA weitestgehend wiedergefunden werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die sich mit der NMR-Konformation ergeben haben, lagen dabei die berechneten pK_a -Werte der MD-Konformationen näher an den experimentellen Werten.

Die Berechnungen zur Bestimmung der stark sauren Asparaginsäure bei den Toxinen ApA und ApB ergaben deutlich niedrigere Werte für Asp7. Dieses Ergebnis war unabhängig von der eingesetzten Konformation.

Die durchgeführten MD-Simulationen ergaben für Asp9 eine im Vergleich zu Asp7 wichtigere Funktion bei der Stabilisierung der Faltblattstruktur. Die Veränderungen der Sekundärstruktur nach Protonierung der stark sauren Asparaginsäure bei einem niedrigen pH-Wert werden insofern nicht auf die stark saure Aminosäure Asp7 zurückgeführt. Vielmehr zeigte die Simulation mit beiden protonierten Asparaginsäuren, dass hier andere Konformationen auftreten. Dies könnte die experimentell festgestellten Veränderungen der Sekundärstruktur bei einem niedrigerem pH-Wert erklären.

4.7 Bedeutung der Arginine im Loop I bei Seeanemonen-Toxinen

Der flexible Loop I (8-17) der Seeanemonen-Toxine ist von besonderem Interesse (vgl. auch Kapitel 4.5). In dieser Region wurden bei ApB, dem wirkstärksten Toxin bei Säugern, vier funktionell wichtige Aminosäuren gefunden (Asp9, Arg12, Pro13 und Arg14). Außerdem liegen in unmittelbarer Nähe

weitere Aminosäuren, die eine Rolle für die Affinität spielen (Asp7, Lys37 und Leu18).

Die beiden Arginine unterscheiden sich bei ApB in ihrer Bedeutung für die Bindungsaffinität. Bei der Substitution von Arg12 durch Ala wird die Affinität gegenüber dem neuronalen Natriumkanal 16fach verringert [131], die Substitution von Arg14 führt lediglich zu einer 4fachen Reduktion [134]. Die wichtige Funktion von Arg12 wurde nicht erwartet, denn eine positiv geladene Aminosäure in der Position 12 tritt lediglich bei diesem langkettigen Seeanemonen-Toxin auf. Der relativ geringe Effekt bei der Substitution des konservierten Arg14 ist ebenfalls unerwartet. Das Toxin ApA unterscheidet sich im Loop durch die Aminosäuren Ser12 und Val13 von ApB (Arg12, Pro13). Im Vergleich zu ApB besitzt ApA eine 18fach niedrigere Affinität zum neuronalen Natriumkanal und die Fähigkeit, die offene Konformation des Kanals zu stabilisieren, liegt verglichen mit ApB nur bei 60% (s. Tabelle 4.10).

Die Dimutante R12SR14Q von ApB, bei der beide Arginine neutralisiert wurden, zeigte die enorme Bedeutung der positiven Ladungen im Loop I für die Bindungsaffinität am neuronalen Säugerkanal [128]. Hierbei wurde die Affinität im Vergleich zu ApB 72fach reduziert. Interessant waren außerdem die Untersuchungen der Dimutante R12SK49Q [128]. Hierbei wurde eine deutlich reduzierte Bindungsaffinität (37fach) festgestellt, obwohl die Fähigkeit des Toxins, die offene Konformation des Natriumkanals zu stabilisieren, im Vergleich zu ApB ausgeprägter war (120%).

Das Verhalten der Toxine ApB, R12SK49Q und ApA wurde in MD-Simulationen mit einheitlichem Protokoll (vgl. Kapitel 4.2.3) untersucht. Hierbei wurde besonders ihre Flexibilität und das Verhalten der Arginine im Loop I betrachtet.

4.7.1 MD-Simulationen von ApB, R12SK49Q und ApA

Zunächst wurde bei den Toxinen das Verhalten der Arginine im Loop I anhand der 60 *frames* aus den freien MD-Simulationen untersucht. In Bild 4.14 sind für ApB, ApA und R12SK49Q die Seitenketten der Arginine nach der Überlagerung der Konformationen auf die Rückgratatompositionen des Loops I (Aminosäuren 8-17) dargestellt.

Bei ApB wurden in der Simulation elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Arg12 und Asp9 gefunden. Es traten häufig Salzbrücken¹ und in einigen *frames* zusätzlich Wasserstoffbrücken-Bindungen auf. Die Untersuchung der Konformationen von ApA aus der Simulation mit der NMR-Konformation 1 (PDB: 1ahl [55]) zeigte, dass auch hier Arg14 durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Asp9 und auch Asp7 stabilisiert wurde. Ein ähnliches Bild ergab die Dimutante R12SK49Q, denn hier wurden Interaktionen zwischen Arg14 und Asp9 gefunden. Durch dieses Verhalten der Aminosäuren im Loop I konnte Arg14 bei ApA und R12SK49Q eine mit Arg12 bei ApB vergleichbare Position einnehmen. Hierdurch könnten ApA und R12SK49Q direkte Interaktionen, die ApB über Arg12 mit dem Natriumkanal eingeht, durch Arg14 ausgleichen. Außerdem wird bei allen drei Toxinen durch die Arginine ein positives molekulares elektrostatisches Potential in vergleichbarer Position gebildet (für ApB und ApA vgl. Kapitel 4.8.2).

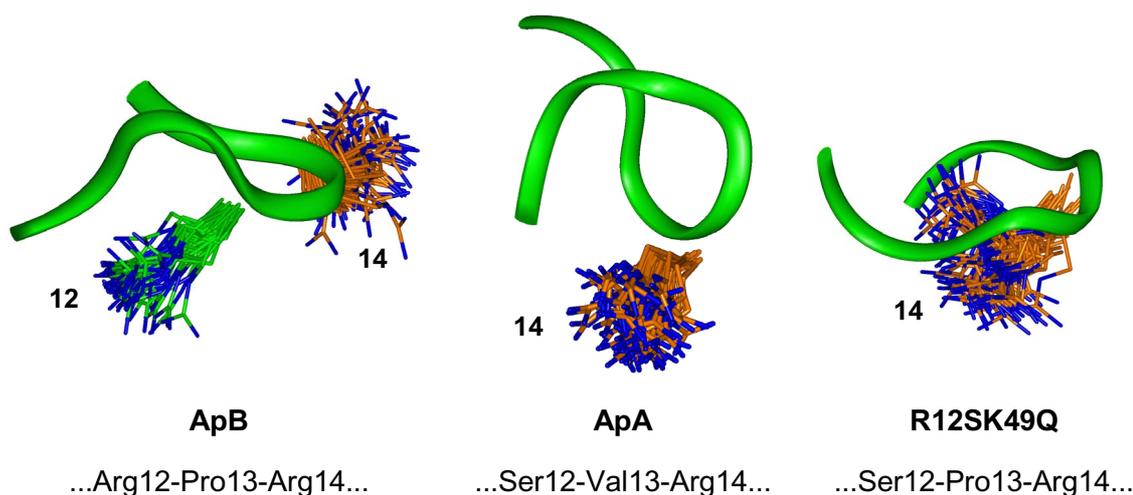


Bild 4.14: *Frames* der MD-Simulationen von ApB, ApA und der ApB-Mutante R12SK49Q nach der Überlagerung auf die Rückgratatomatome des Loops I (Aminosäuren 8-17). Dargestellt ist jeweils der Loop einer Konformation als Bändermodell und die Seitenketten der Arginine. Bei ApA stammen die *frames* aus der Simulation mit der NMR-Konformation 1 als Startstruktur.

Die Interaktionen von Arg12 bzw. Arg14 mit den negativen Aminosäuren Asp7 und Asp9 hatten einen zusätzlichen Effekt auf die Stabilität des Loops I. Bei ApB findet man neben Arg12 und Arg14 die Aminosäure Pro13, die eine wichtige Rolle für die Affinität spielt. Dabei ist unklar, ob Pro13 eine Bedeutung

¹ Definition nach Sheinerman et al. [91],
Abstand der positiven und negativen Atome $\leq 4,1 \text{ \AA}$

für die Stabilisierung des Loops oder von bestimmten, mit dem Natriumkanal interagierenden Aminosäuren besitzt. In der Simulation konnte gezeigt werden, dass der Loop bei ApB in sich relativ stabil bleibt (vgl. auch Kapitel 4.3.1.1). Die Untersuchung der *angular order*-Parameter ergab flexible Bereiche (AOP < 0,8) für die Rückgrat-Torsionswinkel (ϕ , ψ) der Aminosäuren Cys6, Asp7 und Ser8 (s. Bild 4.16, A). Zusätzlich wurden AOPs nahe 0,8 bei Gly15 und Asn16 gefunden. Für diese Stabilität ist neben Pro13 die Interaktion zwischen Arg12 und Asp9 wichtig.

Bei der Untersuchung der AOPs für die Dimutante R12SK49Q, bei der ebenfalls durch Pro13 die Konformationsfreiheit des Loops I einschränkt wird, wurden Werte < 0,8 für die Aminosäuren Pro11, Gly15 sowie Thr17 gefunden, der Wert für Ser12 lag bei 0,8 (s. Bild 4.16, B). Auffallend war im Vergleich zu den Ergebnissen von ApB die erhöhte Stabilität im Bereich der Aminosäuren 6-10. Dabei war bei R12SK49Q die Interaktion von Arg14 mit Asp9 wichtig, da hierdurch ein Netz von Wasserstoffbrücken-Bindungen im Loop I ermöglicht wurde (s. Bild 4.15). Zusätzlich wurde dieser Bereich durch Asp7 stabilisiert, das in vielen *frames* der Simulation über Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Lys37 in Kontakt stand.

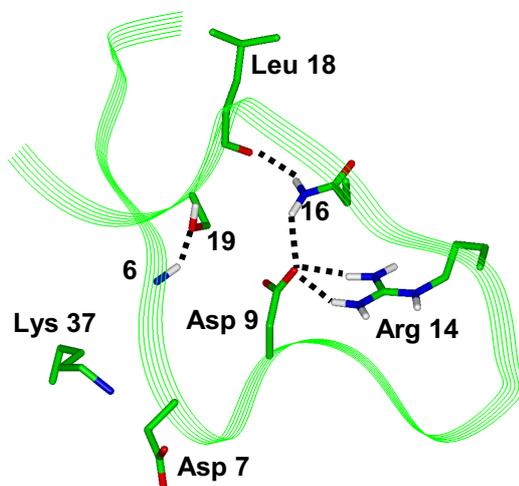


Bild 4.15: Bändermodell der Dimutante R12SK49Q für den Bereich der Aminosäuren 1-21. Dargestellt sind über Wasserstoffbrücken-Bindungen vernetzte und funktionell wichtige Aminosäuren.

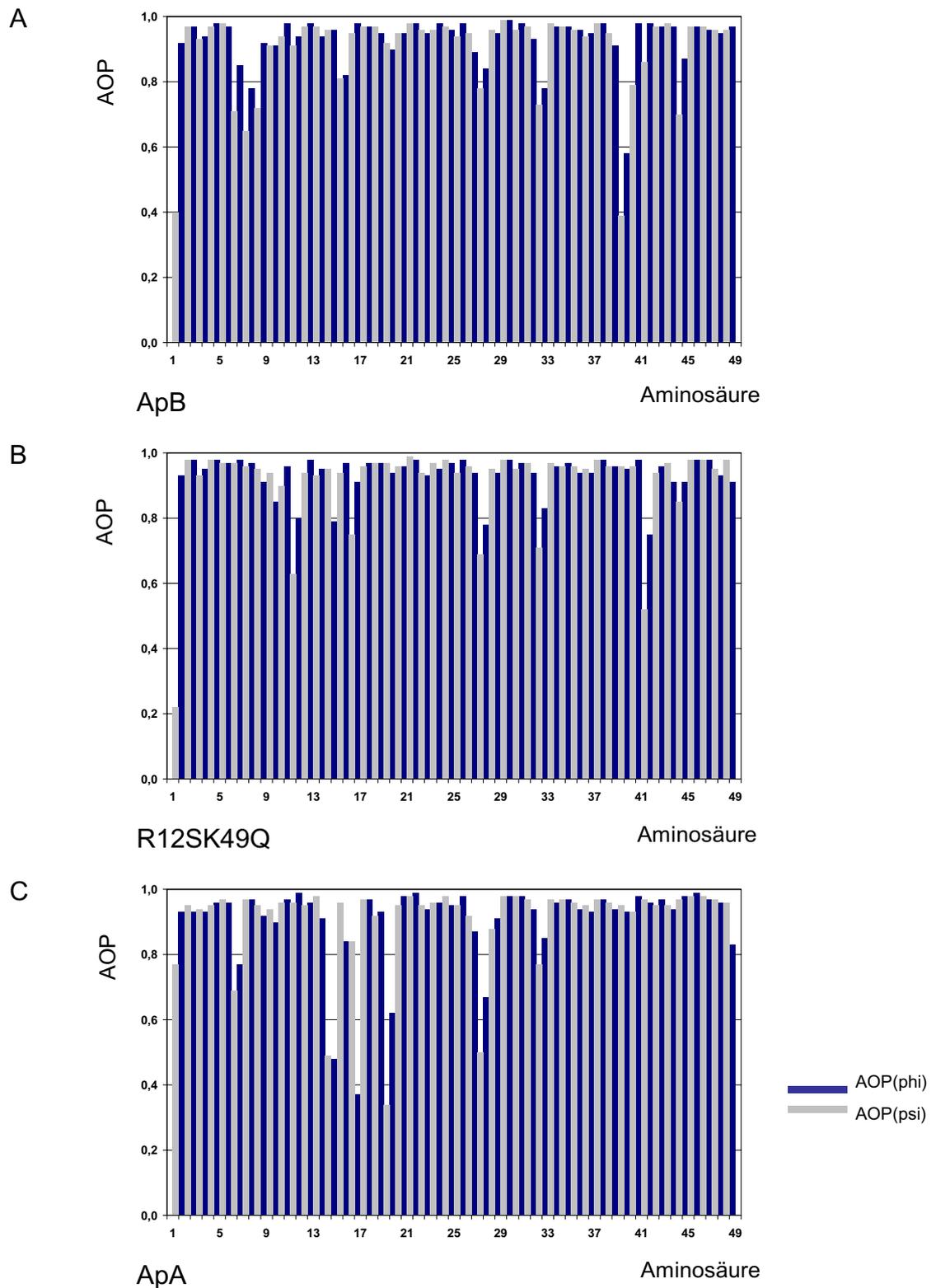


Bild 4.16: *Angular order*-Parameter für die Torsionswinkel des Proteinrückgrats von **(A)** ApB, **(B)** R12SK49Q und **(C)** ApA

Bei dem Toxin ApA findet man im Loop I Val13 anstelle von Pro bei ApB, wodurch der Loop eine höhere Flexibilität besitzt. Dies zeigte sich in den *angular order*-Parametern für die *frames* der MD-Simulation, denn hier wurden Werte $< 0,8$ für Cys6, Asp7, Arg14, Gly15, Thr17 sowie Ser19 gefunden (s. Bild 4.16, C). Dabei ergaben sich bei den Aminosäuren 14, 15, 17 und 19 in diesem Fall sogar AOP $< 0,5$. Dies weist auf eine sehr hohe Flexibilität hin.

4.7.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Arg14 bei ApA und R12SK49Q eine zu Arg12 im Toxin ApB vergleichbare Funktion einnehmen kann. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Bedeutung von Arg14 für die Bindungsaffinität bei ApB. Hingegen ist eine wichtige Funktion der konservierten Aminosäure Arg14 für die anderen Toxine, bei denen Arg12 fehlt, zu erwarten. Mutationsstudien mit ApA wären von besonderem Interesse.

Die Bedeutung von Arg12 bzw. Arg14 scheint nicht nur in einer möglichen direkten Interaktion mit dem Natriumkanal sowie einem Beitrag zum positiven molekularen elektrostatischen Potential der Polypeptide zu liegen. Die positiv geladenen Arginine stabilisieren zusätzlich durch elektrostatische Interaktionen mit Asp9 und zum Teil auch mit Asp7 die Konformation des Loops I (Aminosäuren 8-17).

Für die Fähigkeit der Toxine, die offene Konformation des Natriumkanals zu stabilisieren, sollte nach diesen Untersuchungen die Stabilität des Loops I und seiner unmittelbaren Umgebung eine wichtige Rolle spielen. Man findet in diesem Bereich die wichtigen Aminosäuren Asp9, Arg12, Pro13, Arg14 sowie Asp7, Lys37 und Leu18. Bei der Dimutante, die im Vergleich zu ApB und ApA die offene Konformation des Kanals besser stabilisieren kann, wurde im Bereich bis Gly10 eine höhere Stabilität gefunden. ApA zeigt gleichzeitig mit der höchsten Flexibilität im Loopbereich auch die geringste Fähigkeit zur Stabilisierung des Kanals.

Die Mutationen von Trp45 bei ApB sprechen ebenfalls für eine Bedeutung der Stabilität bei der Hemmung des Inaktivierungsprozesses. In der Untersuchung von W45A konnte eine nur leicht reduzierte Affinität festgestellt werden, der V_{\max} -Wert war jedoch im Vergleich zu ApB auf 40% reduziert. Die Substitution von Trp45, das zum Strand 4 des Betafaltblatts gehört, führte zu einer leichten Veränderung der Sekundärstruktur [130]. Insofern könnte auch bei W45A die

geringe Fähigkeit, die offene Konformation des Kanals zu stabilisieren, auf eine reduzierte Stabilität des Toxins zurückzuführen sein, denn Strand 4 steht in Kontakt mit Strand 2 (Aminosäuren 20-23) und 3 (Aminosäuren 34-37).

4.8 Toxiphor-Modell der Seeanemonen-Toxine

4.8.1 Vorgehensweise

Zur Entwicklung eines Toxiphor-Modells für Seeanemonen-Toxine, die mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger interagieren, wurden zunächst ApB und ApA betrachtet (vgl. Kapitel 4.8.3.1). Beide Polypeptide sind sowohl für Säuger als auch für Crustaceen toxisch, dabei stellt ApB das gegenüber Säugern aktivste Toxin dar (s. Tabelle 4.15) [51]. Mit Hilfe der *ion flux*-Methode konnte außerdem für ApB im Vergleich zu ApA eine 18fach höhere Affinität zum neuronalen Natriumkanal festgestellt werden [128]. Beide Toxine sollten bei der Untersuchung charakteristische Eigenschaften zeigen, die für die Interaktion mit der Bindungsstelle 3 des Natriumkanals und für die Hemmung des Inaktivierungsprozesses von Bedeutung sind.

Tabelle 4.15: Pharmakologische Eigenschaften der Seeanemonen-Toxine [51]:
Toxizität (LD) und Affinität (K_d)

Toxin	LD ₅₀ (Mäuse) [µg/kg]	LD ₁₀₀ (Krabben) [µg/kg]	K _d (Rattenhirn) ^a [nM]
ATXI ^b	> 4 000	4,4	7 000
ATXII	100	3,7	150
ATXIII	> 18 000	6,7	> 10 000
ATXV	19	10,4	50
ApA	66	22	120
ApB	8	78	35

^a K_d gegen ¹²⁵I-ATXII

^b ATXI kommt in zwei Isoformen vor (ATXIa/b: 3A/3P), dabei überwiegt ATXIa (80%).

Neben ApB und ApA wurden weiterhin die blutdrucksenkenden *Anemonia sulcata*-Polypeptide BDSI und BDSII betrachtet (vgl. Kapitel 4.8.3.2). Experimentell konnte gezeigt werden, dass BDSII das Toxin ApA kompetitiv am neuronalen Rattenkanal verdrängen kann und außerdem negativ inotrop wirksam ist [47]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird BDSII als Antagonist der Bindungsstelle 3 betrachtet. BDSI unterscheidet sich von BDSII in lediglich zwei

Aminosäuren. Auch für dieses Polypeptid konnte ein blutdrucksenkender Effekt festgestellt werden, der allerdings im Vergleich zu BDSII schwächer ausgeprägt ist. Aus dem Vergleich von ApB mit BDSII bzw. BDSI sollten sich Gemeinsamkeiten in Bereichen ergeben, die für die Interaktion mit der Bindungsstelle 3 wichtig sind, da beide Polypeptidgruppen am Natriumkanal binden können. Darüber hinaus sollten Unterschiede deutlich werden, die Rückschlüsse auf das unterschiedliche Wirkprofil der Moleküle erlauben.

Darüber hinaus wurde ein Vergleich von ApB mit einem modifizierten Toxin durchgeführt, bei dem die Bindung zwischen Arg14 und Gly15 gespalten worden war (vgl. Kapitel 4.8.3.3). Die Untersuchung ist von Interesse, da für das Toxin ApA nach der Spaltung dieser Bindung eine nur gering reduzierte Affinität bestimmt wurde [137]. Hingegen konnte eine kardiale Aktivität bei dem modifizierten Toxin nicht mehr festgestellt werden. Aus der Untersuchung eines entsprechend veränderten ApBs sollten sich Eigenschaften ergeben, die für die Hemmung des Inaktivierungsprozesses bei den spannungsabhängigen Natriumkanälen von Bedeutung sind.

Im nächsten Schritt wurden ApB und ATXIa untersucht (vgl. Kapitel 4.8.3.4). Das Polypeptid ATXIa besitzt eine sehr geringe Toxizität für Säuger und kann weder ATXII noch das α -Skorpion-Toxin AaHII an Synaptosomen aus Rattenhirn kompetitiv verdrängen [51]. Allerdings zeigt das Toxin eine hohe Aktivität gegenüber Crustaceen. Aus dem Vergleich von ApB und ATXIa sollten sich demnach wichtige Eigenschaften ableiten lassen, die für die geringe Toxizität von ATXIa gegenüber Säugern von Bedeutung sind. Diese Eigenschaften sollten bei einem Vergleich von ATXIa mit ATXIII wiedergefunden werden, denn dieses Toxin zeigt ein zu ATXIa vergleichbares Wirkprofil (vgl. Kapitel 4.8.3.5). So ist auch ATXIII für Säuger kaum toxisch, zeigt dafür aber eine hohe Aktivität gegenüber Crustaceen (s. Tabelle 4.15). Die Unterschiede, die sich bei den Untersuchungen der für Säuger bzw. Krabben toxischen Verbindungen ergeben, sollten Rückschlüsse auf Interaktionsbereiche der Toxine mit dem Natriumkanal der Säuger ermöglichen. Außerdem war die Untersuchung des Polypeptids ATXIII von besonderem Interesse, da es zur Gruppe der kurzkettigen Seeanemonen-Toxine gehört. Bei ATXIII wird kein Bereich gefunden, der dem flexiblen Loop I der langkettigen Toxine entspricht. Dennoch kann auch dieses Polypeptid die Inaktivierung des Natriumkanals hemmen.

Im Folgenden wird zunächst kurz auf das molekulare elektrostatische Potential der aus Seeanemonen isolierten Polypeptide eingegangen. Danach werden die

einzelnen Überlagerungen erläutert (vgl. Kapitel 4.8.3). Im abschließenden Kapitel 4.8.4 werden die Ergebnisse für die Interaktion mit dem neuronalen Natriumkanal zusammengefasst.

4.8.2 Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials

4.8.2.1 Durchführung

Die Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP) der Polypeptide wurde mit dem Programm DELPHI [100] durchgeführt. Zur Verkürzung der Rechenzeit wurde eine *focussing*-Methode verwendet. Durch eine Fokussierung werden außerdem Ungenauigkeiten der Werte in den Randbereichen des Gitters verringert, das bei der *finite difference*-Methode zur Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung um das Molekül gelegt wird. Bei einer *focussing*-Methode wird zunächst ein im Verhältnis zur Größe des untersuchten Moleküls sehr großes Punktgitter mit relativ großen Abständen zwischen den einzelnen Gitterpunkten verwendet. Im zweiten Schritt wird dieses Gitter verkleinert und die Auflösung erhöht. Bei den durchgeführten Untersuchungen nahmen die Polypeptide in ihrer größten linearen Ausdehnung zuerst 40% und anschließend 70% der Gitterkantenlänge ein. Der Abstand der Gitterpunkte betrug 0,8 Å in der ersten und 0,5 Å in der zweiten Rechnung. Eine weitere Erhöhung der Auflösung auf 0,3 Å brachte bei den visuell durchgeführten Strukturüberlagerungen keine signifikante Veränderung der molekularen elektrostatischen Potentiale. Deshalb wurde hierauf verzichtet.

Bei allen Berechnungen wurden die Dielektrizitätskonstanten $\epsilon = 4$ für das Polypeptid und $\epsilon = 80$ für das umgebende Lösungsmittel verwendet [108]. Die Ionenstärke des Lösungsmittels betrug entsprechend den physiologischen Bedingungen 0,145 mol/L und der Lösungsmittel-Radius zur Bestimmung der zugänglichen Oberfläche¹ 1,4 Å (Radius eines Wassermoleküls). Der Ionenradius zur Definition der Sternschicht lag bei 2 Å [141]. Diese Schicht, in der bei einer Dielektrizitätskonstante entsprechend dem Lösungsmittel keine Ionen auftreten, umgibt die Lösungsmittel zugängliche Oberfläche des Moleküls. Dieses Protokoll wurde für alle Polypeptide verwendet. Die Konturierung der molekularen elektrostatischen Potentiale erfolgte zum Vergleich einheitlich bei $\pm 0,2$ kT/e.

¹ *solvent-accessible surface*

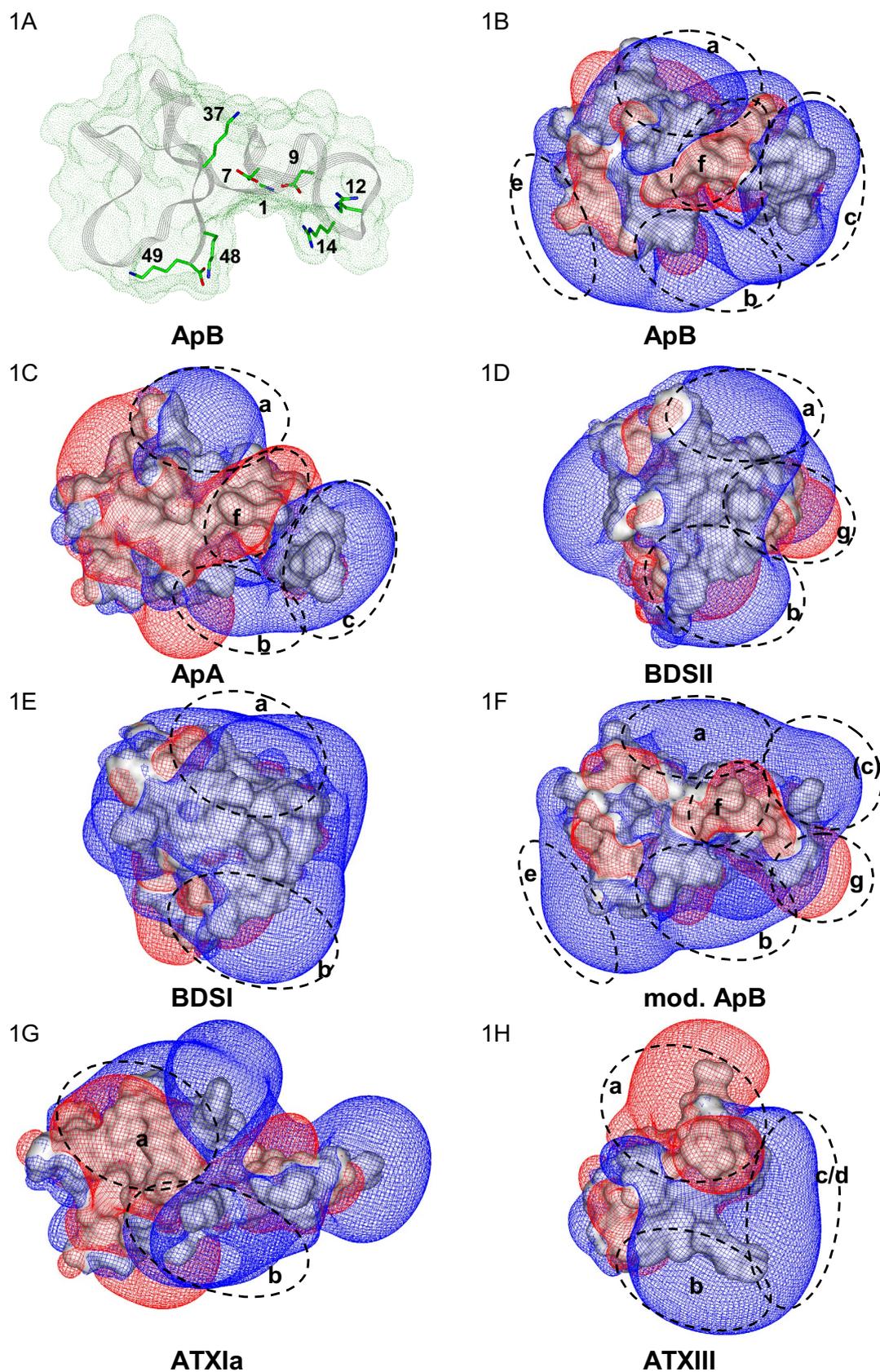


Bild 4.17: Darstellung der molekularen elektrostatischen Potentiale in der Vorderansicht; Konturierung: rot $-0,2$ kT/e, blau $+0,2$ kT/e; Erläuterungen s. Kapitel 4.8.2.2

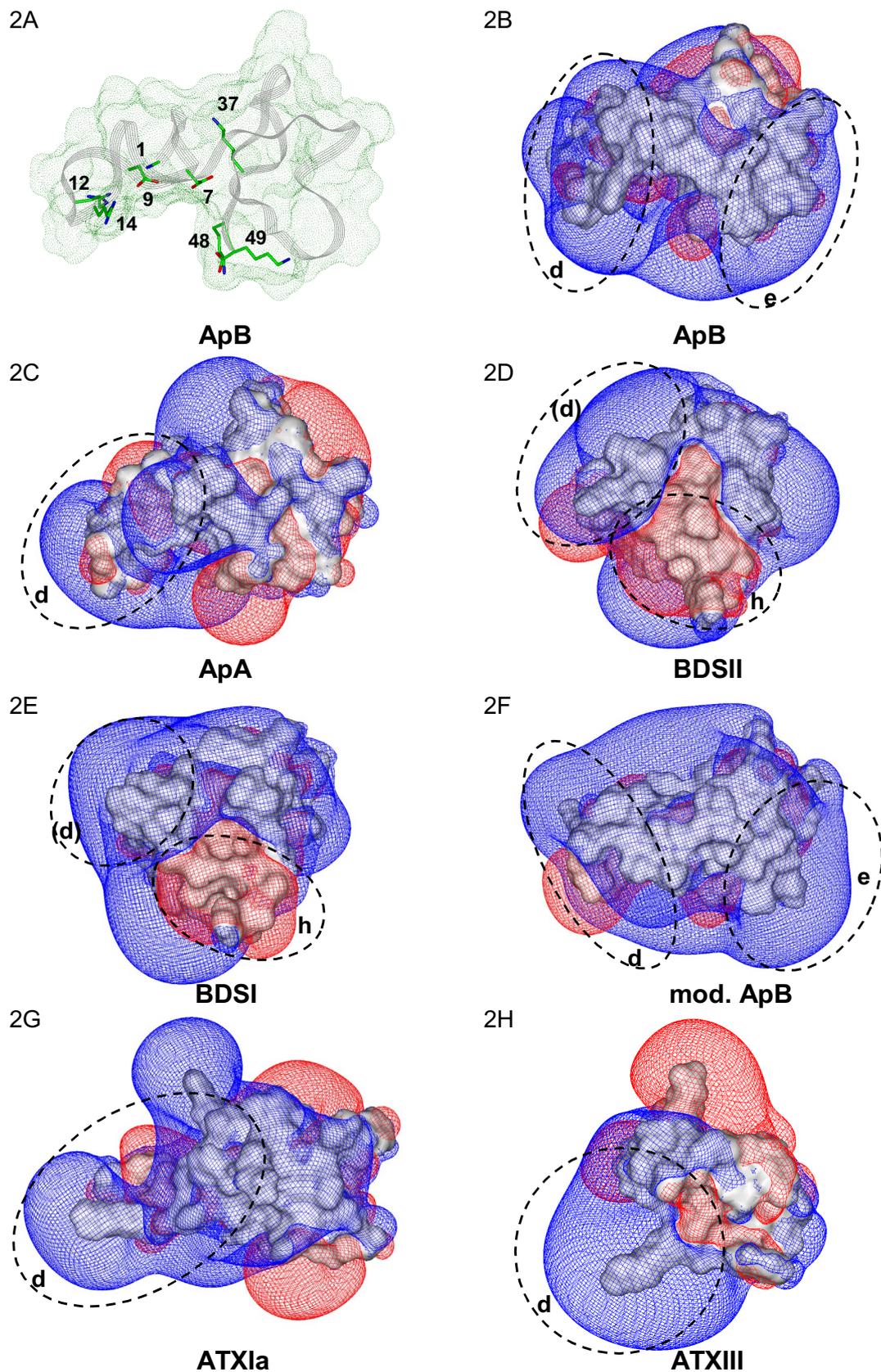


Bild 4.18: Darstellung der molekularen elektrostatischen Potentiale in der Rückansicht; Konturierung: rot $-0,2 \text{ kT/e}$, blau $+0,2 \text{ kT/e}$; Erläuterungen s. Kapitel 4.8.2.2

4.8.2.2 Ergebnisse

Die molekularen elektrostatischen Potentiale von ApB (B), ApA (C), BDSII (D), BDSI (E), ATXIa (G), ATXIII (H) und des modifizierten ApBs (Spaltung der Bindung zwischen Arg14 und Gly15, F) sind in Bild 4.17 und Bild 4.18 dargestellt. Die Orientierung der Polypeptide in Bild 4.17 entspricht der Vorderansicht, in Bild 4.18 der Rückansicht. Zur Übersicht ist außerdem jeweils das Toxin ApB in vergleichbarer räumlicher Lage als Bändermodell mit Connolly-Oberfläche abgebildet (A). Blau gefärbt sind positive, rot negative bei $\pm 0,2$ kT/e konturierte Potentiale. Die Bezeichnungen werden in der Arbeit durchgängig verwendet, und in den folgenden Überlagerungen der einzelnen Toxine wird auf diese Abbildungen im Detail eingegangen.

4.8.3 Untersuchung der Polypeptide

4.8.3.1 Überlagerung von ApB und ApA

Die Überlagerung der für Säuger und Crustaceen toxischen Polypeptide ApB und ApA ist in Bild 4.19 dargestellt. Mit Ausnahme der Aminosäuren Arg14 und Lys49 von ApB ergaben sich gute Übereinstimmungen.

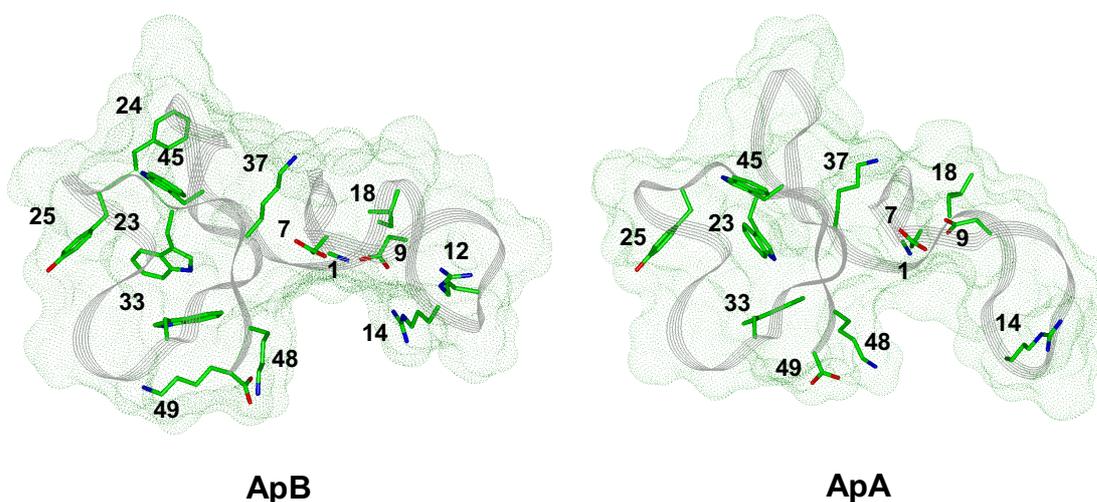


Bild 4.19: Bändermodelle der Toxine ApB und ApA mit Connolly-Oberflächen. Die Konformation von ApA stammt aus der MD-Simulation mit der NMR-Konformation 1 als Startstruktur (vgl. Kapitel 4.4). Die Aminosäuren sind nach Atomtypen gefärbt: Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot, Kohlenstoffe grün. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.16.

Tabelle 4.16: Überlagerung von ApB mit ApA

ApB	α -NH ₂ ^a	Arg12	Lys37	Lys48	Asp7	Asp9	Leu18	Trp23	Trp33	Trp45
ApA	α -NH ₂ ^a	Arg14	Lys37	Lys48	Asp7	Asp9	Leu18	Trp23	Trp33	Trp45

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Bei der Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials wurden bei ApB (s. Bild 4.17, 1B; Bild 4.18, 2B) und ApA (1C, 2C) vergleichbare positive Bereiche um Lys37 (a), Lys48 (b), Arg12 (c) sowie die N-terminale α -Aminogruppe (d) (ApB) gefunden. Auch die negativen Bereiche um Asp7 und Asp9 (f) konnten bei beiden Molekülen gut überlagert werden.

Bei ApB fiel zudem auf, dass Arg14 und die α -Aminogruppe aufgrund ihrer unmittelbaren Nähe gemeinsam zu dem stark ausgeprägten positiven Potential in diesem Bereich (s. Bild 4.18, 2B, d) beitragen. Insofern könnte eine der beiden Gruppen durch ihr Potential den Verlust der anderen kompensieren, was den geringen Effekt einer einzelnen Modifikation erklären könnte. Das positive molekulare elektrostatische Potential in diesem Bereich ist vermutlich für die Aktivität der Toxine von Bedeutung, da hier die funktionell wichtige Aminosäure Leu18 gefunden wird.

Durch Lys49 trat bei ApB, dem wirkstärksten Toxin, ein zusätzliches stark ausgeprägtes positives Potential auf (1B/2B, e), das bei ApA aufgrund der Substitution durch Gln49 nicht gefunden wurde. Allerdings kommt Lys49 in der Gruppe der Typ 1-Toxinen lediglich bei ApB vor. Bei anderen Toxinen der Gruppe findet man an dieser Stelle Gln, und bei ATXV fehlt diese Aminosäure ganz. In Mutationsstudien mit ApB hat sich außerdem nur eine geringe Bedeutung von Lys49 für die Bindungsaffinität ergeben [131].

Für die weiteren Untersuchungen wurden bei ApB Lys37, Lys48 und Arg12 sowie Leu18 und Trp33 als Aminosäuren berücksichtigt, die eine direkte Interaktion mit dem Natriumkanal eingehen könnten. Zusätzlich wurde das positive molekulare elektrostatische Potential (s. Bild 4.17/ Bild 4.18) in den Bereichen a (Lys37), b (Lys48), c (Arg12) und d (α -Aminogruppe) betrachtet. Die negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 wurden bei den Überlagerungen zusätzlich berücksichtigt, denn auch bei anderen Toxinen könnten sie eine stabilisierende Funktion besitzen. Eine wichtige direkte Interaktion mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger wird bei beiden Asparaginsäuren nicht angenommen (vgl. Zusammenfassung, Kapitel 4.8.4).

4.8.3.2 Vergleich von ApB mit dem Antagonisten BDSII

Das Polypeptid BDSII wird als Antagonist der Bindungsstelle 3 bezeichnet, da es kompetitiv zu ApA am neuronalen Rattenkanal bindet und negativ inotrop wirksam ist [47]. Es wird vermutet, dass der blutdrucksenkende Effekt des Toxins auf eine Interaktion mit dem Natriumkanal zurückzuführen ist.

Die Überlagerung von ApB mit BDSII ist in Bild 4.20 dargestellt. Hierbei konnten die bei ApB vermutlich wichtigen Aminosäuren Arg14, Lys37, Lys48, Leu18, Trp23, Trp33 und die α -Aminogruppe berücksichtigt werden. Allerdings ergaben sich für Asp7, Asp9, Arg12 und Lys49 von ApB keine äquivalenten Aminosäuren bei BDSII. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wird dem Fehlen von Asp7, Asp9 und Lys49 bei BDSII keine große Bedeutung beigegeben (vgl. Zusammenfassung, Kapitel 4.8.4).

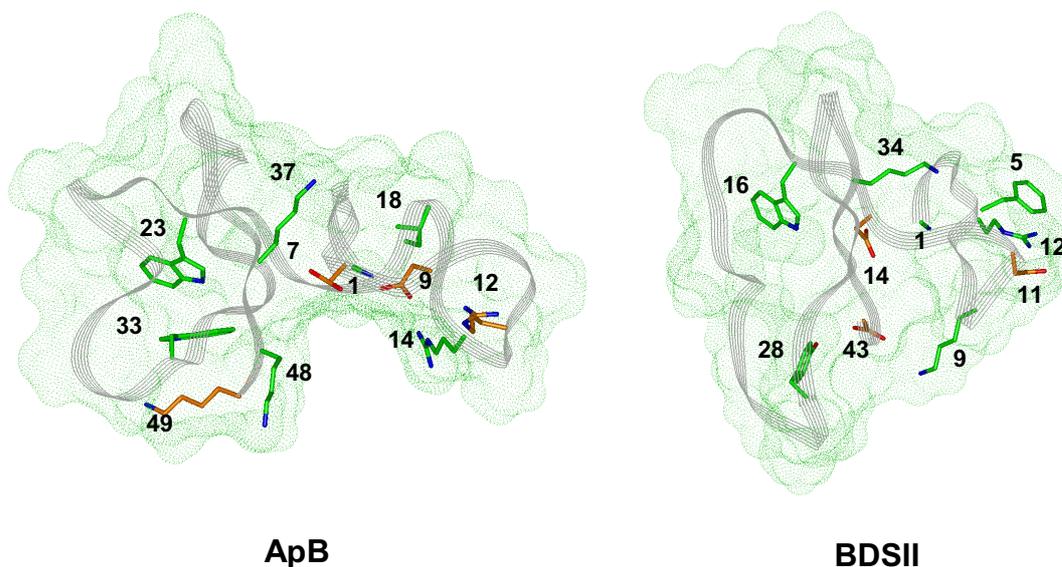


Bild 4.20: Bändermodelle der Polypeptide ApB und BDSII mit Connolly-Oberflächen. Die Aminosäuren sind nach Atomtypen gefärbt: Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot, Kohlenstoffe der überlagerten Aminosäuren grün, Kohlenstoffe von Aminosäuren, die nicht berücksichtigt werden konnten, orange. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.17.

Tabelle 4.17: Überlagerung von ApB mit BDSII

ApB	Arg14/ α -NH ₂ ^a	Lys37	Lys48	Leu18	Trp23	Trp33
BDSII	Arg12/ α -NH ₂ ^a	Lys34	Lys9	Phe5	Trp16	Tyr28

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Beim Strukturvergleich von BDSII mit ApB fiel zusätzlich der deutlich verkürzte Loop I auf. Das Fehlen des Loops an sich wird allerdings nach der Untersuchung des kurzkettigen Seeanemonen-Toxins ATXIII (vgl. Kapitel 4.8.3.5) als

Ursache für die unterschiedlichen Wirkungen von ApB und BDSII ausgeschlossen.

Im Loopbereich zeigte sich ein weiterer Unterschied zwischen den Polypeptiden bei der Betrachtung des molekularen elektrostatischen Potentials (s. Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f). Hier wurde bei BDSII durch Asp11 ein negatives Potential (1D, g) in einer Position gefunden, in der bei ApB ein ausgeprägtes positives liegt (c/d). Allerdings besitzt BDSI, das sich von BDSII lediglich in zwei Aminosäuren unterscheidet und ebenfalls einen blutdrucksenkenden Effekt auslösen kann, in dieser Position statt Asp die Aminosäure Gly (s. Bild 4.21). Man findet dadurch bei BDSI kein negatives Potential g im Loopbereich (1E, 2E). Insofern kann dieses Potential bei BDSII nicht entscheidend für die negativ inotrope Wirkung sein.

```
BDSI : (1) AAPCFCSGKP GRGDLWILRG TCPGGYGYTS NCYKWPNICC YPH (43)
BDSII : (1) AAPCFCPGKP DRGDLWILRG TCPGGYGYTS NCYKWPNICC YPH (43)
```

Bild 4.21: Sequenzen der Polypeptide BDSI und BDSII

Dennoch könnte in diesem Bereich eine Ursache für den Unterschied in den Wirkungen der Polypeptide zu finden sein. So konnten zwar bei BDSI (1E, 2E) und BDSII (1D, 2D) ausgeprägte positive molekulare elektrostatische Potentiale gefunden werden, die den Bereichen a und b bei ApB (1B, 2B) entsprechen würden. Hingegen wurde für das Potential c, das bei ApB in erster Linie durch die funktionell sehr wichtige Aminosäure Arg12 gebildet wird, bei BDSI und BDSII kein vergleichbarer Bereich bestimmt. Auch das positive Potential d ist bei den beiden *Anemonia sulcata*-Polypeptiden deutlich geringer ausgeprägt. Das negative Potential f bei ApB wird zwar durch positive Bereiche überlagert, doch wird dieser Beobachtung aufgrund der Untersuchungen von Asp7 und Asp9 bei ApB und ApA keine große Bedeutung beigemessen (vgl. Kapitel 4.8.4).

Bei BDSII und BDSI zeigt sich weiterhin ein ausgeprägtes negatives molekulares elektrostatisches Potential im Bereich h. Dieses Potential erstreckt sich bei BDSII über Asp14 und die C-terminale Carboxylatgruppe (His43) bis zum Bereich g (Asp11). In der Überlagerung mit ApB würden in unmittelbarer Nähe zu diesem negativen Bereich Leu18 sowie Trp23 und Trp33 liegen. Die Aminosäuren Leu18 und Trp33 tragen bei ApB sehr stark zur Affinität des Toxins bei und liegen so vermutlich im direkten Interaktionsfeld mit dem Natriumkanal. Insofern ist es durchaus denkbar, dass ein negatives Potential in

diesem Bereich einen Einfluss auf die Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals besitzen könnte. Einen Hinweis auf die Bedeutung des negativen Potentials für den Wirkunterschied zwischen ApB und BDSI bzw. BDSII ergibt sich zudem aus den Sequenzen der beiden *Anemonia sulcata*-Polypeptide. BDSI und BDSII unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäuren, wobei BDSI Ser7 und Gly11 anstelle von Pro und Asp besitzt (s. Bild 4.21). Da BDSI eine schwächere blutdrucksenkende Wirkung zeigt, ist dies ein Hinweis auf die Bedeutung des negativen Potentials für den Effekt der beiden Moleküle. Genauere experimentelle Daten über den Einfluss von BDSI und BDSII auf den Natriumkanal wären hier von besonderem Interesse.

4.8.3.3 Spaltung der Bindung zwischen Arg14 und Gly15 bei ApB

Gould et al. konnten bei dem Toxin ApA nach Spaltung der Bindung zwischen Arg14 und Gly15 im Loop I eine nur gering reduzierte Affinität messen [137]. Im Gegensatz dazu war eine kardiale Aktivität des Toxins nicht mehr feststellbar. Bei NMR-Untersuchungen wurde keine drastische Veränderung der Struktur von ApA nach der Spaltung des Loops gefunden. Allerdings traten in der chemischen Verschiebung der Aminosäuren 36-42 begrenzte Veränderungen auf.

Da auch bei ShI, einem Typ 2-Toxin, nach der Spaltung des Loops I keine Aktivität mehr festgestellt wurde [142], scheint die Integrität des Loops bei den Seeanemonen-Toxinen generell von Bedeutung zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Polypeptid ApB sehr ausführlich untersucht. Deshalb wurde der Einfluss einer Loopsplaltung auf die Konformation einzelner Aminosäuren sowie des gesamten Moleküls durch eine MD-Simulation mit dem modifizierten ApB ermittelt. Hieraus sollten sich Eigenschaften von ApB ableiten lassen, die für die Hemmung der Inaktivierung von Bedeutung sind.

Bei der Sekundärstruktur-Analyse für die MD-Konformationen von ApB konnte festgestellt werden, dass das Auftreten von Strand 3 (Aminosäuren 34-37) im Vergleich zu ApB (98%) deutlich reduziert wurde (25%). Insofern scheint die Simulation durchaus die leichten Strukturveränderungen infolge der Loopsplaltung, die durch NMR-Untersuchungen bei ApA gefunden wurden, wiedergeben zu können. Auffallend war außerdem die relativ hohe Stabilität des gespaltenen Loops im Verlauf der Dynamik. Hierbei waren vor allem Wasserstoffbrücken-Bindungen von Bedeutung, die zwischen Asp9 und Arg14 sowie der Amidgruppe der Seitenkette von Asn16 und den Rückgratatomen der Aminosäuren Gly10, Arg12 und Arg14 gebildet wurden (s. Bild 4.22).

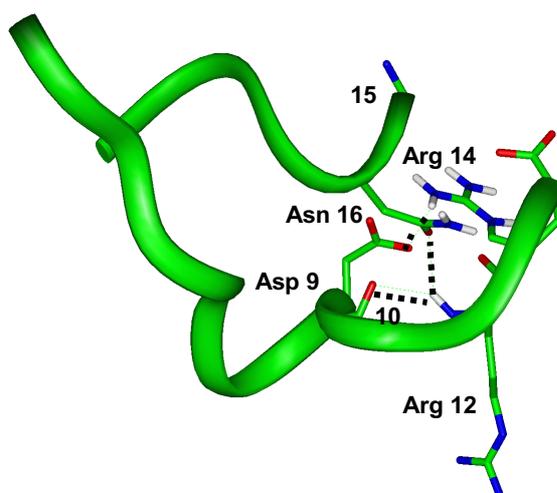


Bild 4.22: Loop I der minimierten Durchschnittsstruktur der MD-Simulation von ApB nach der Spaltung zwischen Arg14 und Gly15. Dargestellt ist das Netzwerk der Wasserstoffbrücken-Bindungen.

Bei dieser Dynamik wurde als repräsentativer Vertreter für weitere Untersuchungen die minimierte Durchschnittsstruktur der letzten 40 Konformationen der freien Dynamik verwendet, da die Programme NMRCORE und NMRCLUST wegen der Spaltung der Moleküle nicht benutzt werden konnten.

Beim Vergleich dieser minimierten Durchschnittsstruktur mit ApB wurden zunächst die aromatischen Aminosäuren sowie Arg12, Lys37, Lys48, Lys49, Asp7 und die N-terminale α -Aminogruppe überlagert (s. Bild 4.23 und Tabelle 4.18). Unterschiede ergaben sich für die Konformation von Leu18, denn hier war keine optimale Überlagerung möglich. Allerdings ist eine gewisse Flexibilität in diesem Bereich vorhanden, die offensichtlich die Interaktion von Leu18 mit dem Natriumkanal ermöglicht, denn für diese Aminosäure wurde eine große Bedeutung für die Affinität von ApB gezeigt. Insofern spielt dieser geringe Unterschied in der Konformation von Leu18 keine entscheidende Rolle.

Die Aminosäure Arg14 von ApB konnte nicht mit der Durchschnittsstruktur überlagert werden, doch besitzt diese Aminosäure bei ApB nur eine geringe Bedeutung. In dem gespaltenen Toxin hat sich weiterhin die Position von Arg12 deutlich verändert. Aber auch dies sollte nicht entscheidend sein, denn Arg14 übernimmt die ursprüngliche Position von Arg12 bei ApB. Die Aminosäure Asp9 wurde ebenfalls in einer anderen Position gefunden, da sie durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zu Arg14 in der MD-Simulation eine stabile Konformation einnahm. Aufgrund der Untersuchungen der Bedeutung von Asp9 für die Stabilisierung der Sekundärstruktur von ApB (vgl. Kapitel 4.6) wird vermutet, dass

die veränderte Position von Asp9 bei den MD-Konformationen die Ursache für das verringerte Auftreten von Strand 3 nach der Spaltung der Bindung im Loop darstellt. Die konformatorische Veränderung der Aminosäure Asp9 nach der Spaltung des Loops sollte keine große Bedeutung für den völligen Verlust der kardialen Aktivität besitzen, da auch nach einer Substitution dieser Aminosäure eine gewisse kardiale Aktivität der Mutante immer noch vorhanden ist [132].

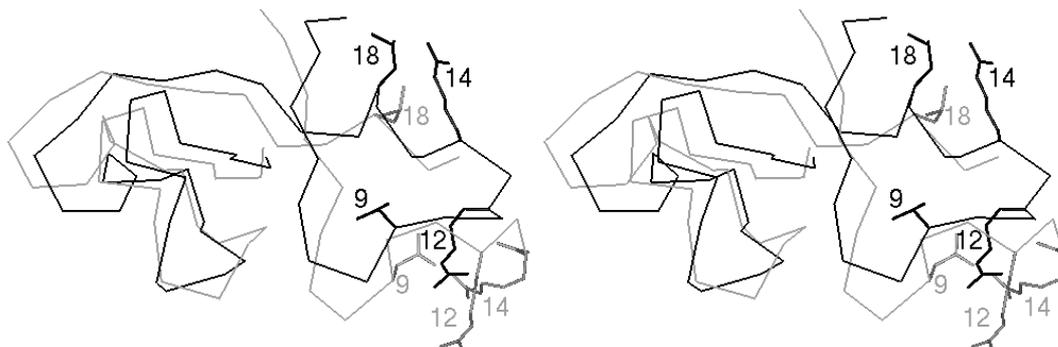


Bild 4.23: Überlagerung von ApB (*schwarz*) mit der minimierten Durchschnittsstruktur (*grau*) des modifizierten ApBs nach der Spaltung des Loops I zwischen Arg14 und Gly15 in Stereoansicht. Lediglich die funktionell wichtigen Aminosäuren des Loops I sind dargestellt.

Tabelle 4.18: Überlagerung von ApB mit dem modifizierten ApB

ApB	$\alpha\text{-NH}_2^a$	Arg12	Lys37	Lys48	Lys49	Asp7	Leu18	Trp23	Trp33	Trp45
mod. ApB^b	$\alpha\text{-NH}_2^a$	Arg14	Lys37	Lys48	Lys49	Asp7	(Leu18)	Trp23	Trp33	Trp45

^a $\alpha\text{-NH}_2$ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

^b durch Spaltung der Bindung zwischen Arg14 und Gly15 modifiziertes Toxin

Bei der Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials (s. Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f) ergaben sich Übereinstimmungen in den Bereichen a (Lys37), b (Lys48), c (Arg12), d (α -Aminogruppe), e (Lys49) und f (Asp7). Allerdings wurde bei dem gespaltenen Toxin durch die Carboxylatgruppe von Arg14 ein negatives Potential im Loopbereich gefunden (g). Diese Beobachtung konnte auch bei BDSII gemacht werden, das ebenfalls keine positiv inotrope Wirkung zeigt. Deshalb wird vermutet, dass vor allem das negative Potential g des modifizierten ApBs im Loopbereich eine Ursache für die fehlende Aktivität von ApA nach der Spaltung des Loops I ist.

Die Hemmung der Inaktivierung beim Natriumkanal erfolgt möglicherweise auch durch die Stabilisierung des Loops IVS3-S4. Infolge der erhöhten Instabilität

nach der Spaltung des Loops I könnte diese Interaktion zusätzlich reduziert sein.

4.8.3.4 Vergleich von ApB mit ATXla

ATXla kann an Synaptosomen aus Rattenhirn weder das Seeanemonen-Toxin ATXII noch das α -Skorpion-Toxin AaIII kompetitiv verdrängen, und die Toxizität für Mäuse ist im Vergleich zu ApB sehr gering (s. Tabelle 4.15, S. 105). Hingegen besitzt ATXla einen geringen LD₁₀₀-Wert für Krabben. Aus den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden langkettigen Typ 1-Toxine ATXla und ApB sollten sich daher für die Interaktion mit dem Säugerkanal wichtige Bereiche von ApB ableiten lassen. Außerdem sollten Gemeinsamkeiten der Toxine Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus ermöglichen, denn beide Polypeptide können die Inaktivierung der Natriumkanäle hemmen.

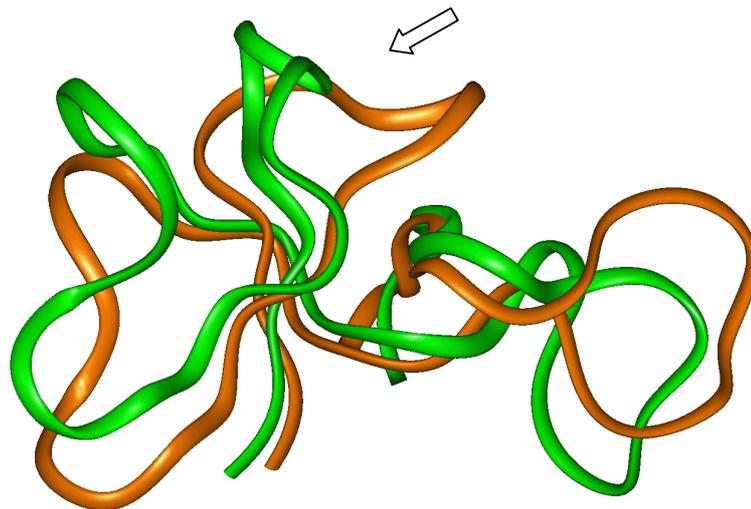


Bild 4.24: Bändermodelle der Toxine ApB (*grün*) und ATXla (*orange*) entsprechend der Lage im Bild 4.25. Mit dem Pfeil ist der Bereich der Aminosäuren 36-44 bei ApB gekennzeichnet.

Bei der Überlagerung von ATXla mit ApB, die in Bild 4.24 dargestellt ist, wurden deutliche strukturelle Unterschiede im Bereich der Aminosäuren 36-44 (ApB) gefunden. Bei ATXla wird als Ursache für die Konformation dieses Loops (Aminosäuren 35-41) die elektrostatische Interaktion von Arg37 mit Asp9 vermutet (s. Bild 4.25). Dieser Beobachtung wird aus mehreren Gründen eine besondere Bedeutung beigemessen: In der Untersuchung von ATXla und ATXIII, einem kurzkettigen, ebenfalls nur für Krabben toxischen Polypeptid, ließ sich dieser Bereich relativ gut überlagern (vgl. Kapitel 4.8.3.5). Interessant ist diese Region, da man hier bei ApB die funktionell wichtigen Aminosäuren Lys37 und

Asp7 findet. Außerdem wurde bei der Überlagerung von ApB mit dem α -Skorpion-Toxin AaHII dieser Loop in guter Übereinstimmung mit dem unmittelbaren Bereich am Ende der α -Helix gefunden (vgl. Kapitel 4.10.5.1). Eine Veränderung der Struktur könnte so über einen sterischen Effekt die Bindung am Natriumkanal beeinflussen.

Die Überlagerung von ApB mit ATXIa ist in Bild 4.25 dargestellt. Dabei konnten die N-terminale α -Aminogruppe, Lys48, Leu18, Trp23 sowie Trp33 von ApB berücksichtigt werden. Die sehr flexible Aminosäure Arg14 von ATXIa konnte in einigen *frames* der MD-Simulation, die zur Generierung der Konformationen durchgeführt wurde, einen mit Arg14 bei ApB äquivalenten Bereich einnehmen. Nicht überlagert werden konnten die Aminosäuren Arg12, Lys37, Lys49, Asp7 und Asp9 von ApB. Dabei wird aufgrund der Untersuchungen von ApB und ApA vermutet, dass die Aminosäuren Lys49, Asp7 und Asp9 keine große Rolle bei der Interaktion mit dem neuronalen Säugerkanal spielen.

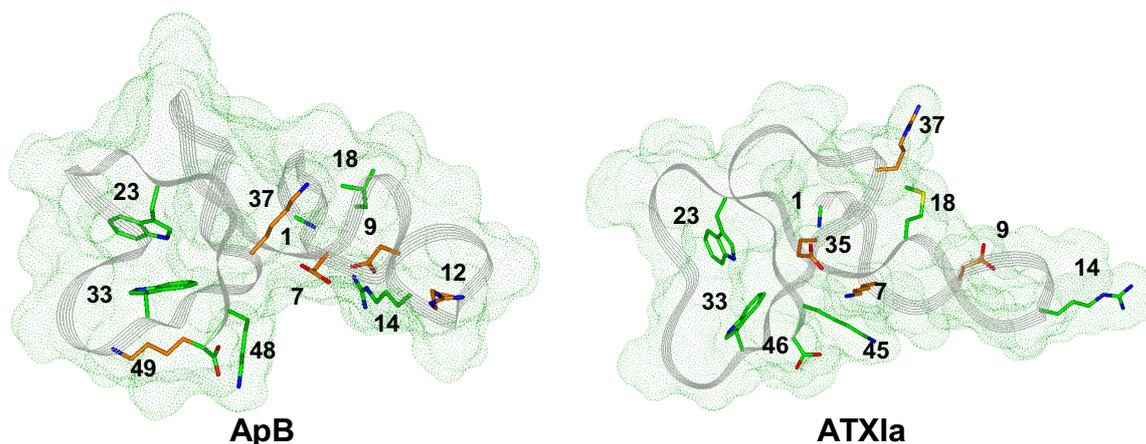


Bild 4.25: Bändermodelle der Toxine ApB und ATXIa mit Connolly-Oberflächen. Die Aminosäuren sind nach Atomtypen gefärbt: Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot, Schwefel gelb, Kohlenstoffe der überlagerten Aminosäuren grün, Kohlenstoffe von Aminosäuren, die nicht berücksichtigt werden konnten, orange. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.19.

Tabelle 4.19: Überlagerung von ApB mit ATXIa

ApB	α -NH ₂ ^a	Arg14	Lys48	Leu18	Trp23	Trp33
ATXIa	α -NH ₂ ^a	(Arg14)	Lys45	Met18	Trp23	Trp33

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Eine Überlagerung von Arg12 bei ApB durch eine entsprechende Aminosäure bei ATXIa war nicht möglich. Bei Untersuchungen von ApA, das wie ATXIa kein Arg12 besitzt, konnte gezeigt werden, dass Arg14 bei diesem Toxin durch elektrostatische Interaktionen mit Asp9 bzw. Asp7 eine zu Arg12 äquivalente Position einnehmen kann (vgl. Kapitel 4.7). Dies ist bei ATXIa hingegen nicht

möglich, denn hier wurde eine Interaktion zwischen Arg37 und Asp9 gefunden. Hierdurch verändert sich nicht nur die Position von Asp9, sondern zusätzlich wird die Interaktion von Arg14 mit Asp9 durch elektrostatischen Abstoßung zwischen Arg37 und Arg14 inhibiert. Das Fehlen von Asp7 (ApB) sowie die positive Ladung durch Lys7 bei ATXIa dürften zusätzlich eine Position von Arg14 vergleichbar mit der von Arg12 bei ApB verhindern. Hierdurch sind Unterschiede in der direkten Interaktion mit dem Natriumkanal sowie Einflüsse auf die Stabilität des Loops zu erwarten. Entsprechend ergaben sich für die *frames* der MD-Simulation bei den Aminosäuren Gly10, Pro11 und Asn12 *angular order*-Parameter $< 0,8$. Die Werte für Pro11 und Asn12 lagen zudem mit 0,2 bzw. 0,5 extrem niedrig, was eine sehr hohe Flexibilität anzeigt.

Den Aminosäuren Lys37 und Asp7 bei ApB stehen Glu35 und Lys7 bei ATXIa gegenüber. Da vor allem Lys37 für die Bindungsaffinität von ApB eine große Bedeutung hat, dürfte die Umkehrung der Ladung einen starken Einfluss auf die Interaktion mit dem Natriumkanal besitzen. Dies ergab auch eine Mutationsstudie von ApB, bei der nach Substitution von Lys37 durch Asp die Mutante am kardialen Kanal eine etwa 220fach verringerte Bindungsaffinität zeigte [138]. Der Aminosäure Asp7 bei ApB wird hingegen eine geringere Bedeutung für die Affinität beigemessen [132].

Beim Vergleich des molekularen elektrostatischen Potentials von ApB und ATXIa (s. Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f) wurden für die Bereiche b und d gute Übereinstimmungen gefunden. Im Gegensatz dazu fehlt bei ATXIa das ausgeprägte positive Potential der Aminosäure Arg12 (c) bei ApB. Darüber hinaus ergab sich im Bereich von Lys37 (a) des Toxins ApB ein stark negatives Potential bei ATXIa. Das negative Potential durch Asp7 und Asp9 (f) bei ApB wird bei ATXIa zum Teil durch das positive von Lys7 überlagert.

4.8.3.5 Überlagerung von ATXIa mit dem kurzkettigen Toxin ATXIII

Durch die Überlagerung von ApB mit ATXIa konnten strukturelle und elektrostatische Unterschiede gefunden werden, die für die ungleiche Bindung am Säugerkanal eine möglicherweise wichtige Rolle spielen. In der folgenden Untersuchung von ATXIII sollte versucht werden, diese Eigenschaften wiederzufinden, denn ATXIII und ATXIa zeigen ein vergleichbares Wirkprofil. So kann ATXIII ebenso wie ATXIa weder ATXII noch das α -Skorpion-Toxin AaHII an Synaptosomen aus Rattenhirn kompetitiv verdrängen, und die Toxizität für Säuger ist sehr gering (s. Tabelle 4.15, S. 105). Darüber hinaus müssten sich

Anhaltspunkte für die geringe Affinität zum Säugerkanal von ATXIa und ATXIII auch aus dem Vergleich mit den Sequenzen von ATXII und ATXV ergeben, denn diese beiden Toxine zeigen eine vergleichsweise hohe Toxizität für Säuger und Krabben. Außerdem müssten bei ATXII und ATXV Unterschiede beim Vergleich mit ApB zu finden sein, die eine Bedeutung für die Toxizität gegenüber Krabben besitzen, denn ATXV und besonders ATXII zeigen bei Krabben einen deutlich niedrigeren LD₁₀₀-Wert als ApB.

Die Untersuchung von ATXIII war außerdem von besonderem Interesse, da bei diesem Toxin der flexible Loop I der langkettigen Seeanemonen-Toxinen fehlt, der vermutlich bei der Interaktion mit dem Natriumkanal eine wichtige Rolle spielt. Dennoch kann ATXIII den Inaktivierungsprozess des Natriumkanals inhibieren.

In den Sequenzen der Toxine fallen bei ATXII und ATXV im Vergleich zu ApB eine (ATXII: Lys36) bzw. zwei (ATXV: Lys36, Lys38) zusätzliche, positiv geladene Aminosäuren im Bereich von Lys37 (ApB) auf (s. Bild 4.26). Aufgrund der Faltung der Polypeptide könnte ein Lysin von ATXII bzw. ATXV vergleichbar zur positiven Ladung von Lys7 bei ATXIa liegen, das andere Lysin könnte Lys37 bei ApB entsprechen. Das Vorkommen dieser positiv geladenen Aminosäuren könnte ein wichtiger Beitrag zu den relativ hohen Affinitäten von ATXII und ATXV sowohl zu den Säuger- als auch zu den Krabbenkanälen sein. Die negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 haben offensichtlich keinerlei Einfluss auf die Interaktion mit dem Crustaceenkanal.

Für Lys7 bei ATXIa wurde demnach eine wichtige Funktion für die Bindung an dem Krabbenkanal abgeleitet. Umgekehrt dürfte Glu35, das bei der Überlagerung mit ApB ein hohes negatives Potential im Bereich von Lys37 (ApB) verursacht, ein Grund für die sehr niedrige Affinität am Säugerkanal sein. Da ATXIII ein ähnliches Bindungsverhalten wie ATXIa zeigt, wurden diese beiden Aminosäuren, Lys7 und Glu35, im Alignment besonders berücksichtigt.

```

ApB      : (1)  GVPCLCDSCDDGPRBRGNTLSGILWFYPSGCPSGWHNCKKAHGPNIGWCCKK (49)
ATXII    : (1)  GVPCLCDSCDDGPSVRGNTLSGIIWL--AGCPSGWHNCKKHGPTIGWCCKQ (47)
ATXV     : (1)  GVPCLCDSCDDGPSVRGNTLSGILWL--AGCPSGWHNCKHKPTIGWCCK (46)
ATXIa    : (1)  GAACLCKSDDGPNTRGNSMSGTIWV--FGCPSGWNNCEGRA-IIGYCCKQ (46)

ATXIII   : (1)  RSCCCPCYWGGCPWGQNCYPEGCSGPKV (27)

```

Bild 4.26: Sequenzen der Seeanemonen-Toxine

Die Überlagerung von ATXIa mit ATXIII ist in Bild 4.27 dargestellt. Neben den geladenen Aminosäuren Lys45, Lys7 und Glu35 von ATXIa konnten auch mehrere hydrophobe Aminosäuren bei ATXIII in vergleichbarer Position gefunden werden. Außerdem wurde im C-terminalen Bereich von ATXIII (Aminosäuren 18-27) eine ATXIa (35-41) ähnliche Konformation gefunden. Dieser Loop war im Vergleich zwischen ApB und ATXIa durch eine deutlich andere Konformation aufgefallen.

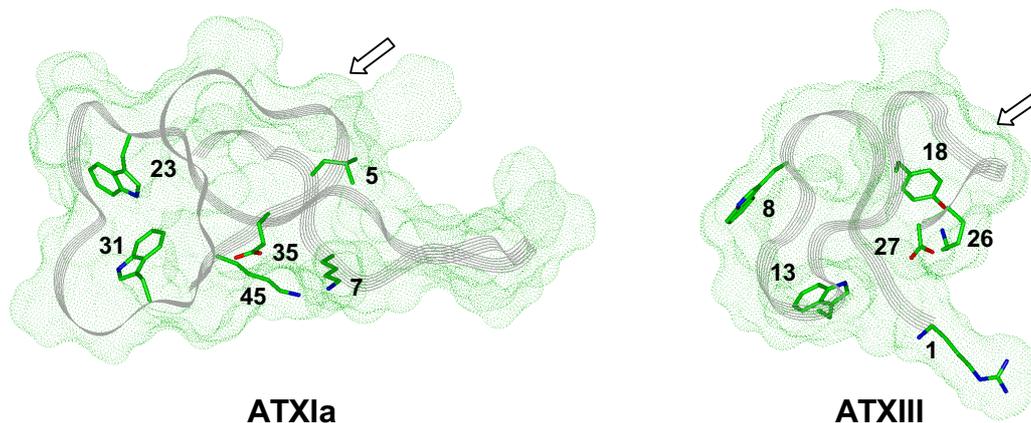


Bild 4.27: Bändermodelle der Toxine ATXIa und ATXIII mit Connolly-Oberflächen. Durch Pfeile gekennzeichnet sind die Bereiche der Aminosäuren 35-41 bei ATXIa und 18-27 bei ATXIII. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.20.

Tabelle 4.20: Überlagerung von ATXIa mit ATXIII

ATXIa	Lys7	Lys45	Glu35	Leu5	Trp23	Trp31
ATXIII	Lys26	Arg1/ α -NH ₂ ^a	COO ⁻ (Val27) ^b	Tyr18	Trp8	Trp13

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

^b C-terminale Carboxylatgruppe

Beim Vergleich der molekularen elektrostatischen Potentiale (s. Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f) von ATXIa (1G, 2G) und ATXIII (1H, 2H) wurde in vergleichbarer Position ein stark ausgeprägtes positives (b) sowie ein negatives (a) Potential gefunden. Interessant ist das stark positive, durch Arg1 und Lys26 verursachte Potential bei ATXIII, das vor allem durch die exponierte Stellung von Arg1 in den Loopbereich hineinragt. Dieses Potential liegt in einem Bereich, der in etwa dem Potential c/d bei ApB entsprechen würde.

ATXIII und ATXIa zeigen ein vergleichbares Wirkprofil. Insofern scheint der Loop I der langkettigen Toxine zumindest am Crustaceenkanal nicht für die Hemmung der Inaktivierung essentiell zu sein. Hingegen sollten Aminosäuren in bestimmten Positionen, die eine direkte Interaktion mit dem Natriumkanal ein-

gehen können, sowie ein ausgeprägtes positives molekulares elektrostatisches Potential in den Bereichen b und c/d wichtig sein. Dieses Potential spricht auch bei den Crustaceenkanälen für eine elektrostatische Interaktion mit dem Spannungssensor IVS4. Zusätzlich wäre durch den Kontakt der Toxine mit mehreren Aminosäuren des Loops IVS3-S4 oder durch zusätzliche Interaktionen mit dem Loop IVS5-SS1 eine Stabilisierung dieses Kanalbereiches möglich.

Für die Interaktion mit dem Crustaceenkanal scheinen die Aminosäuren Lys7 und Lys45 (ATXIa) wichtig zu sein. Glu35 bei ATXIa dürfte aufgrund des Vergleichs mit ATXII und ATXV nicht essentiell für die Toxizität gegenüber Krabben sein. Allerdings könnte diese Aminosäure eine Ursache für die geringe Affinität des Toxins zum Säugerkanal sein.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen könnte die geringere Aktivität von ApB gegenüber Krabben im Vergleich mit ATXII und ATXV auf die fehlende zusätzliche positiv geladene Aminosäure im Bereich Lys35, Lys36 und Lys38 (ATXV) zurückgeführt werden. Außerdem findet man nur bei diesem Toxin durch Lys49 ein ausgeprägtes positives Potential auf der zum Loop I-Bereich gegenüberliegenden Molekülseite. Deshalb wäre eine elektrostatische Abstoßung durch das Potential des Kanals denkbar.

Arg37 scheint keine essentielle Bedeutung für die Affinität von ATXIa zum Krabbenkanal zu besitzen, denn es war nicht möglich, positive Bereiche von ATXIII sinnvoll auf diese Aminosäure zu überlagern. Dabei spricht für das vorliegende Alignment von ATXIa mit ATXIII neben der guten Überlagerung der einzelnen Aminosäuren auch die Übereinstimmung im Loop 35-41 (ATXIa). Allerdings würde bei einer Überlagerung mit dem α -Skorpion-Toxin AaIII Arg37 (ATXIa) in einem Bereich um Lys2/Arg56 zu finden sein. Diese Region spielt für die Interaktion der α -Skorpion-Toxine mit dem Säugerkanal vermutlich eine wichtige Rolle. Deshalb wäre auch bei ATXIa eine Bedeutung von Arg37 nicht völlig auszuschließen. Allerdings wird Lys2 der Skorpion-Toxine von den anderen Seeanemonen-Toxinen wie ApB nicht abgedeckt (vgl. Kapitel 4.10.5.1). Interessant wären Mutationsstudien von ATXIa sowie Untersuchungen der Strukturen von ATXII und ATXV, um genauere Informationen über die Positionen der zusätzlichen positiven Aminosäuren zu erhalten.

4.8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen von ApB und ApA ergaben sich für die Interaktion mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger Übereinstimmungen in den vermutlich wichtigen Bereichen der N-terminalen α -Aminogruppe und den Aminosäuren Lys37, Lys48, Arg12, Asp7 und Asp9 sowie Leu18 und Trp33 (ApB). Dabei könnte ihre Bedeutung in einer direkten Interaktion mit dem Natriumkanal oder in einem Beitrag zu einem charakteristischen molekularen elektrostatischen Potential liegen. Möglich ist weiterhin eine Funktion für die Stabilisierung der Konformation bestimmter Aminosäuren oder des gesamten Moleküls.

Der Bereich um Lys37 spielt eine wichtige Rolle für den Effekt der Toxine, und es wird vermutet, dass Lys37 direkt mit dem Kanal interagiert [138]. Weiterhin scheint die unmittelbar benachbarte Region mit den Aminosäuren 6-12 von besonderem Interesse zu sein, denn hier findet man die funktionell wichtigen Aminosäuren Asp7, Asp9 und Arg12 (ApB). Dabei stehen Asp7 und Lys37 sowie Asp9 und Arg12 (Arg14) bei ApB (ApA) durch elektrostatische Interaktionen in engem Kontakt. Durch diese Interaktionen werden die positiv geladenen Aminosäuren Lys37 und Arg12 (Arg14) in ihrer Position stabilisiert. Zusätzlich wird die Stabilität des Loop I-Bereiches erhöht. Diesem Effekt wird eine Bedeutung beigemessen für die Fähigkeit der Toxine, die offene Konformation des Natriumkanals zu stabilisieren (vgl. Kapitel 4.7).

Die Untersuchungen von Rogers et al. haben gezeigt, dass zwei Glutamate (Glu1613 und Glu1616) des Natriumkanals im Loop IVS3-S4 bei der Bindung der Seeanemonen-Toxine eine wichtige Rolle spielen [31]. Eine positiv geladene Aminosäure, die für die Bindung der Toxine von Bedeutung war, konnte nicht identifiziert werden. Stattdessen wurde bei der Substitution von Lys1617 durch Ala in unmittelbarer Nähe zu Glu1616 eine Steigerung der Bindungsaffinität des untersuchten ATXII festgestellt [31]. Dies spricht für eine elektrostatische Abstoßung zwischen dem ausgeprägten positiven molekularen elektrostatischen Potential der Toxine und dem Potential des Natriumkanals an dieser Stelle. Eine direkte Interaktion der negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 der Polypeptide mit dem Kanal erscheint deshalb wenig wahrscheinlich. Die Untersuchungen der Skorpion-Toxine zeigten zusätzlich, dass diese Aminosäuren nicht essentiell für die Interaktion mit dem Kanal sein sollten (vgl. Kapitel 4.10.4, S. 140). Deshalb wird vermutet, dass die Bedeutung von Asp7 und Asp9 in der Stabilisierung von positiv geladenen Aminosäuren sowie

des Loop I-Bereiches liegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur der Toxine vor allem durch Asp9 stabilisiert wird (vgl. Kapitel 4.6).

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wird die höhere Bindungsaffinität und der stärkere Effekt von ApB verglichen mit ApA unter anderem auf das Vorhandensein der zwei Arginine, Arg12 und Arg14, im Loop I zurückgeführt. ApA besitzt lediglich Arg14, das dennoch die Funktion von Arg12 bei ApB übernehmen kann, dabei ist Arg12 im Vergleich zu Arg14 allerdings effektiver. Erklärbar wäre dies durch eine Beteiligung von Arg12 an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen, denn für diese Wechselwirkung ist die Entfernung und die Geometrie der beteiligten Atome entscheidend. Hierfür würde auch die Substitution von Arg12 bei ApB durch die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Lysin sprechen, denn dabei wurde eine 4fache Reduktion der Bindungsaffinität gemessen [131]. Die Fähigkeit von Lysin, Wasserstoffbrücken-Bindungen auszubilden ist im Vergleich zu Arginin deutlich begrenzter. Eine Salzbrücke, die lediglich von der Entfernung der positiven und der negativen Ladung abhängt, wäre bei beiden Aminosäuren möglich. Arg12 könnte intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Aminosäuren des Natriumkanals eingehen. Denkbar wäre aber auch die Stabilisierung der Konformation des Loops I durch die intramolekulare Interaktion mit Asp9.

Weiterhin könnte auch Arg14 eine Rolle für die höhere Aktivität von ApB gegenüber Säugern spielen, denn diese Aminosäure trägt zusammen mit der α -Aminogruppe zu einem stärkeren positiven Potential im Bereich von Leu18 bei. Lys49, das lediglich bei diesem Typ 1-Toxin gefunden wird, könnte ebenfalls von Bedeutung sein. Allerdings sollte das positive Potential dieser Aminosäure an sich für die Hemmung der Inaktivierung des Natriumkanals eine untergeordnete Rolle spielen, denn bei den anderen Toxinen findet man hier Gln und bei ATXV fehlt die Aminosäure in Position 49 gänzlich.

Außerdem wird vermutet, dass die höhere Rigidität von ApB im Vergleich zu ApA von Bedeutung ist (vgl. auch Kapitel 4.7). Hierbei spielt zudem die Aminosäure Pro13, die bei ApA durch Val13 ersetzt ist, eine wichtige Rolle, da sie die konformatorische Flexibilität des Loops I einschränkt. Neben einer Bedeutung für den Effekt der Toxine könnte hierdurch auch die Bindungsaffinität günstig beeinflusst werden, denn bei rigideren Molekülen ist der Entropieverlust bei einer Bindung an den Rezeptor geringer.

Beim Vergleich von ApB mit den Antagonisten BDSI bzw. BDSII konnten für eine mögliche Interaktion mit der Bindungsstelle 3 des Natriumkanals bei BDSII äquivalente Aminosäuren für Lys37, Lys48, die α -Aminogruppe/Arg14 sowie Trp23, Trp33 und Leu18 von ApB gefunden werden. Das Fehlen äquivalenter Aminosäuren zu Arg12 sowie Asp7 und Asp9 bei BDSII zeigt, dass diese Aminosäuren zumindest für die Bindung am neuronalen Säugerkanal nicht essentiell sind. Hierbei sind vor allem Leu18 und Trp33, die eine sehr große Rolle für die Bindungsaffinität bei ApB spielen, sowie Lys37 von besonderem Interesse. Weiterhin hat offensichtlich auch das negative Potential im Bereich h keinen Einfluss auf die Bindung am Kanal.

Mögliche Ursachen für den Wirkunterschied zwischen ApB und BDSII bzw. BDSI könnten im Fehlen der wichtigen Aminosäure Arg12 und in den unterschiedlichen molekularen elektrostatischen Potentialen liegen. Bei BDSI bzw. BDSII könnte das ausgeprägte negative molekulare elektrostatische Potential im Bereich von Leu18 sowie Trp33 (h) und das geringere positive bzw. negative in der Loop I-Region (ApB: c und d) von Bedeutung sein.

Ein negatives Potential g im Loop I-Bereich wurde auch bei dem durch Spaltung der Bindung zwischen Arg14 und Gly15 modifizierten ApB gefunden. Bei diesem Toxin konnte eine kardiale Aktivität trotz weitestgehend unveränderter Affinität nicht mehr festgestellt werden. Demnach wird das negative Potential g bei dem modifizierten ApB und auch bei BDSII gefunden wurde, die beide die Inaktivierung nicht hemmen können. Deshalb wird dem ausgeprägten positiven Potential, das bei den aktiven Toxinen in diesem Bereich gefunden wird, eine wichtige Funktion beigemessen. Weiterhin erlangt das durch Spaltung der Bindung im Loop I-Bereich modifizierte Toxin eine im Vergleich zu ApB höhere Flexibilität im Loop I. Deshalb wäre denkbar, dass bei der Hemmung der Inaktivierung durch Behinderung der Konformationsveränderung des Loops IVS3-S4 zusätzlich die erhöhte Flexibilität im Loopbereich die Aktivität des modifizierten Toxins reduziert.

Beim Vergleich von ApB mit ATXIa, das nicht mit dem neuronalen Säugerkanal interagiert, ergaben sich strukturelle und elektrostatische Unterschiede. Diese Eigenschaften konnten in der Untersuchung des kurzkettigen Toxins ATXIII, das ein zu ATXIa vergleichbares Wirkprofil zeigt, wiedergefunden werden. Die strukturellen Unterschiede betrafen den Bereich um Lys37 und Asp7 (ApB), wodurch die Bindung am Kanal sterisch behindert werden könnte. Bei ATXIa fehlen weiterhin äquivalente Aminosäuren für Arg12 und Lys37 (ApB), wodurch

mögliche direkte Interaktionen eingeschränkt werden. Durch die Umkehrung der Ladungen im Bereich von Lys37 und Asp7 durch Glu35 und Lys7 bei ATXIa zeigten sich weiterhin ausgeprägte Unterschiede im molekularen elektrostatischen Potential in den Bereichen a (Lys37) und f (Asp7 und Asp9). Das positive Potential um Arg12 (c) fehlt bei ATXIa ganz. Aufgrund der Untersuchungen von BDSI und BDSII wird das Fehlen äquivalenter Aminosäuren zu Asp7, Asp9 und Arg12 (ApB) als alleinige Ursache für das Nichtbinden von ATXIa am Säugerkanal ausgeschlossen. Demnach wird dem strukturellen Unterschied im Bereich der Aminosäuren 36-44 (ApB) sowie dem negativen Potential um Lys37 eine sehr große Bedeutung beigemessen.

4.9 Lipophiles Potential der drei Toxingruppen

Das lipophile Potential ist von Interesse, da hydrophobe Aminosäuren bei der Bindung eines Proteins an den Rezeptor einen in der Regel hohen Beitrag zur freien Bindungsenergie leisten (vgl. Kapitel 1.6). Mutationsstudien der Aminosäuren Trp33 [129] und Ile18 [130] bei dem Seeanemonen-Toxins ApB ergaben eine sehr große Bedeutung für die Bindungsaffinität.

Zur Untersuchung der hydrophoben Bereiche der drei betrachteten Toxingruppen wurde das Programm MOLCAD [122] verwendet. Die Ergebnisse für die Seeanemonen-Toxine ApB (langkettig) und ATXIII (kurzkettig), das Trichter-netzspinnen-Toxin δ -ACTX-Ar1 und das α -Skorpion-Toxin AaHII sind in Bild 4.28 dargestellt. Die Oberflächen der einzelnen Polypeptide sind dabei individuell gefärbt, damit die Abstufung des lipophilen Potentials im Molekül deutlicher wird.

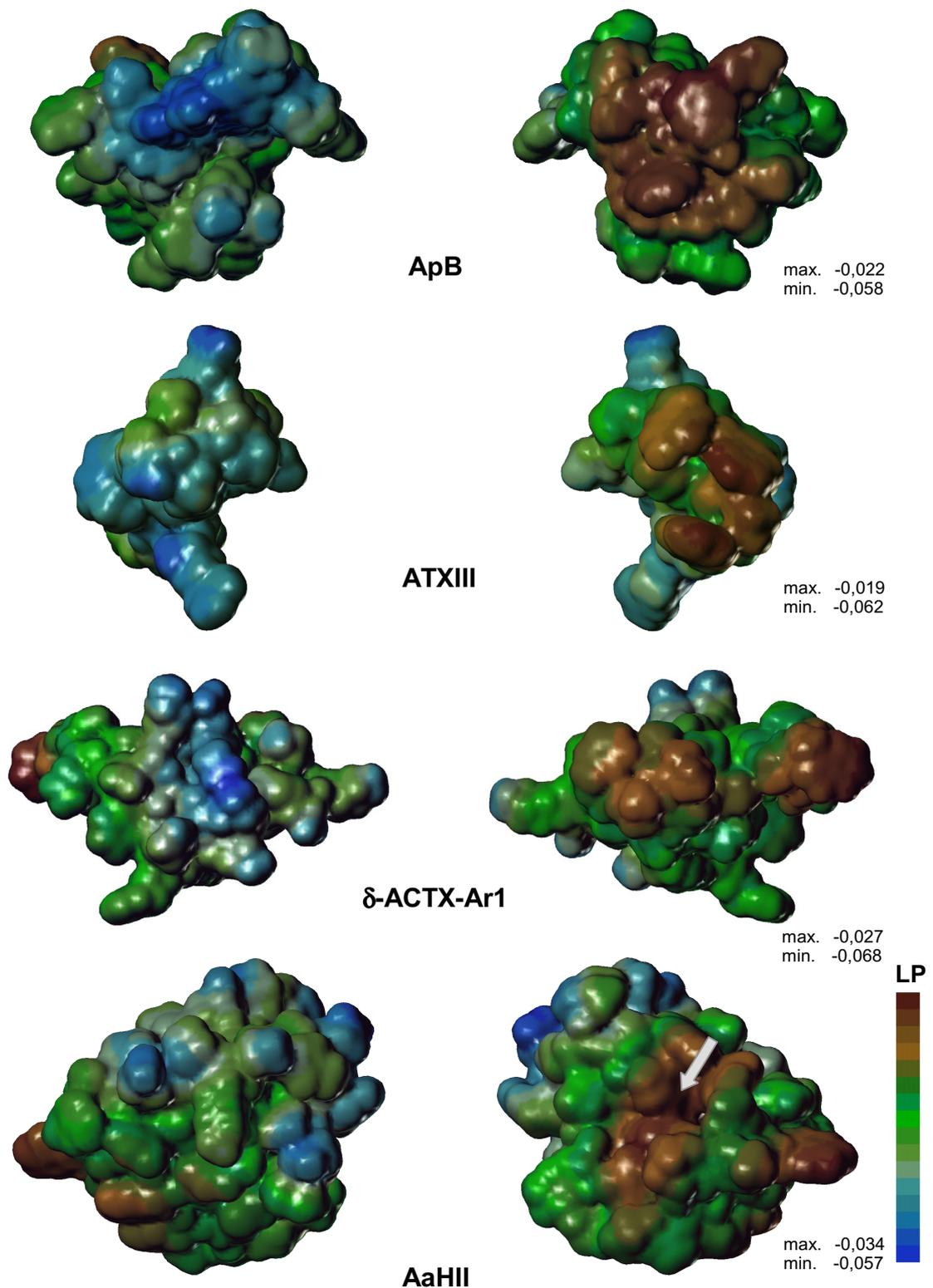


Bild 4.28: Darstellung des lipophilen Potentials (LP) für die Seeanemonen-Toxine ApB und ATXIII, das Trichternetzspinnen-Toxin δ -ACTX-Ar1 und das α -Skorpion-Toxin AaHII. Abgebildet sind jeweils Vorder- (*links*) und Rückseite (*rechts*) der Polypeptide. Die Orientierung der Toxine entspricht in etwa der Lage der Toxine in den folgenden Überlagerungen. Der Bereich der konservierten hydrophoben Oberfläche (CHS) bei AaHII ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Die maximalen bzw. minimalen Werte des LPs sind jeweils angegeben.

Bei ApB, ATXIII und δ -ACTX-Ar1 ist erkennbar, dass das hohe lipophile Potential im Wesentlichen auf einer Oberfläche der Polypeptide konzentriert ist (braun gefärbt). Auf der gegenüberliegenden Seite der Toxine findet man die hydrophileren Regionen (Antipoden). Auch bei AaHII treten ein hohes (s. Bild 4.28 rechts) und ein niedriges (*links*) lipophiles Potential auf gegenüberliegenden Oberflächen auf. Das Potential wird dabei durch die aromatischen Aminosäuren der konservierten hydrophoben Oberfläche (CHS: Tyr5, Tyr35, Tyr42, Tyr47, Tyr49) gebildet (s. Bild 4.29). Für die Bedeutung dieser Region, die bei den α - und β -Skorpion-Toxinen konserviert ist, werden in der Literatur zwei Möglichkeiten diskutiert. Die konservierte hydrophobe Oberfläche könnte eine Rolle bei der Interaktion mit dem Natriumkanal spielen [143]. Allerdings fehlt hierfür eine experimentelle Bestätigung. Gordon et al. postulieren, dass die aromatischen Aminosäuren für die Stabilisierung der Struktur von Bedeutung sind, denn beim Austausch einzelner aromatischer Aminosäuren ergaben sich Veränderungen in der Sekundärstruktur [63].

Die Bedeutung der aromatischen Aminosäuren für die Stabilität wurde auch durch eine MD-Simulation mit AaHII untersucht. Hierbei wurde lediglich Tyr5, das im zentralen Bereich der CHS liegt, durch Glu substituiert. Diese Aminosäure ermöglicht weder hydrophobe noch Kation- π -Interaktionen. Während der Simulationsdauer blieb die Sekundärstruktur nicht stabil, denn die normalerweise vorliegende α -Helix wurde lediglich in etwa 25% der *frames* gefunden. Bei der Untersuchung des unsubstituierten AaHII trat die Helix bei allen *frames* auf.

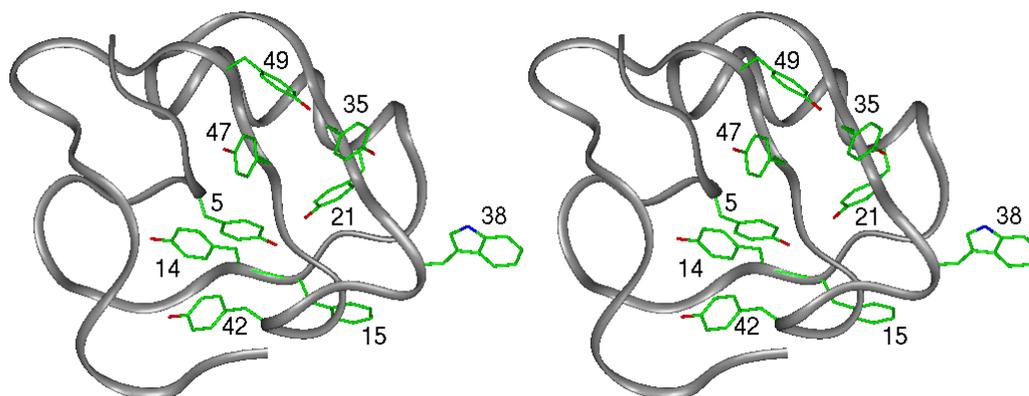


Bild 4.29: Stereoansicht eines Bändermodells des α -Skorpion-Toxins AaHII mit Darstellung der aromatischen Aminosäuren, die nach Atomtypen gefärbt sind (Kohlenstoffe grün, Sauerstoffe rot, Stickstoffe blau). Die Lage des Moleküls entspricht der Anordnung in Bild 4.28 rechts (Rückseite).

Neben der konservierten hydrophoben Oberfläche findet man bei AaHII eine weitere Region mit einem höheren lipophilen Potential (Tyr14, Phe15 und

Tyr21) (s. Bild 4.28 *links*), das allerdings deutlich geringer ausgeprägt ist. Trp38 verbindet die beiden hydrophoben Bereiche (s. Bild 4.29).

Für die Arbeit ergibt sich, dass die aromatischen Aminosäuren der Skorpion-Toxine eine Funktion für die Stabilität besitzen sollten. Darüber hinaus könnte eine Interaktion mit dem Natriumkanal sowohl bei den α - als auch den β -Skorpion-Toxinen möglich sein. Bei den α -Toxinen, die an der Bindungsstelle 3 angreifen, wäre eine hydrophobe Interaktion mit dem Natriumkanal analog zum Seeanemonen-Toxin ApB denkbar. Die geladenen und polaren Aminosäuren könnten bei den α - bzw. β -Toxinen die Selektivität für die Bindungsstelle 3 bzw. 4 beeinflussen. Eine Bedeutung für die elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Assoziation von Protein-Protein-Komplexen ist in Kapitel 1.6 beschrieben. Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Überlagerungen der Polypeptide war das lipophile Potential ein wichtiges Kriterium, da die hydrophoberen bzw. hydrophileren Bereiche der Toxine bei der Bindung an den Natriumkanal in vergleichbarer Position liegen sollten.

4.10 Überlagerung der drei Toxingruppen

4.10.1 Schwerpunkte und Vorgehensweise

4.10.1.1 Schwerpunkte

Die Untersuchungen der Seeanemonen-Toxine haben gezeigt, dass bei ApB vermutlich die Aminosäuren Lys37, Lys48 und Arg12 sowie Leu18 und Trp33 wichtige direkte Interaktionen mit dem Natriumkanal eingehen können. Zusätzlich scheint das positive molekulare elektrostatische Potential (s. Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f) in den Bereichen a (Lys37), b (Lys48), c (Arg12) und d (α -Aminogruppe) von Bedeutung zu sein. Die negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 wurden bei den folgenden Überlagerungen ebenfalls berücksichtigt, denn auch bei anderen Toxinen könnten sie wichtige positiv geladene Aminosäuren oder Molekülbereiche stabilisieren.

Bei den Betrachtungen des lipophilen Potentials (vgl. Kapitel 4.9) der Seeanemonen- und Trichternetzspinnen-Toxine wurden die hydrophoben Aminosäuren in einem Bereich gegenüber den hydrophilen gefunden. Bei den Skorpion-Toxinen gibt es neben der konservierten hydrophoben Oberfläche (CHS) eine zweite Region, in der verstärkt aromatische Aminosäuren gefunden werden. Hydrophobe Wechselwirkungen sind im Vergleich zu hydrophilen weniger ge-

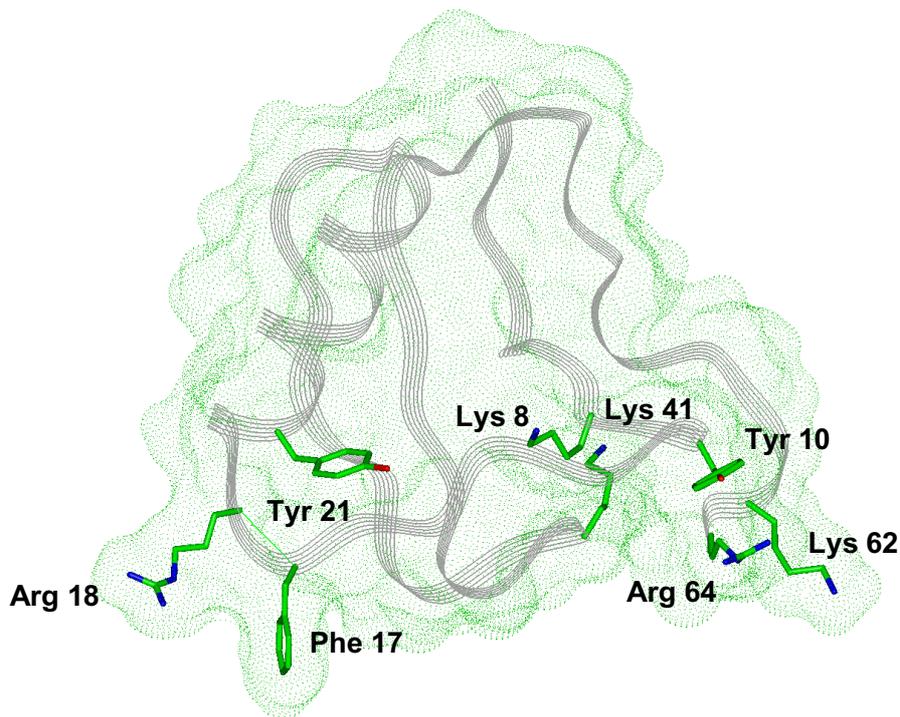
richtet und zeigen dadurch eine geringere Abhängigkeit von der Geometrie der Interaktionspartner. Deshalb wurde bei den folgenden Überlagerungen vor allem auf eine vergleichbare Orientierung der hydrophoben Oberflächen der Polypeptide geachtet.

Auch das Volumen der Toxine wurde bei der Untersuchung berücksichtigt. Allerdings können hier Einschränkungen gemacht werden, denn vermutlich binden die Polypeptide am Kanal über mindestens vier Loops von zwei verschiedenen Domänen, so dass Freiräume vorhanden sein könnten.

4.10.1.2 Ausgewählte Toxine

Bindungsstudien haben ergeben, dass das Seeanemonen-Toxin ATXII kompetitiv sowohl das aktivste klassische α -Skorpion-Toxin AaHII an Natriumkanälen aus Rattenhirn [144] als auch Lqh α IT, das aktivste α -Insektentoxin, an neuronalen Natriumkanälen der Kakerlaken verdrängen kann [25]. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die Bindungsstellen am Insekten- und Säugerkanal homolog sind. In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Überlagerung der Seeanemonen- und Skorpion-Toxine zunächst ApB und Lqh α IT betrachtet, denn Lqh α IT ist derzeit das einzige Skorpion-Toxin, von dem Mutationsstudien über wichtige Aminosäuren veröffentlicht wurden.

Bei den Mutationsstudien von Lqh α IT hatte sich für Lys8, Arg18, Lys62, Arg64 und Phe17 eine vermutlich wichtige Rolle bei der direkten Interaktion mit dem neuronalen Kanal der Kakerlaken ergeben (s. Bild 4.30) [145]. Weiterhin wird bei der Mutante G40SK41P die Aktivität im Vergleich zu Lqh α IT auf 64% reduziert. Tyr21 [146] und Tyr10 [145] sind ebenfalls von Bedeutung, die genaue Funktion von Tyr10 ist allerdings nicht bekannt. Die Aminosäure könnte eine direkte Interaktion mit dem Natriumkanal eingehen oder durch Kation- π -Interaktion die Orientierung von Lys62 oder Arg64 stabilisieren. Da bei den Trichter-netzspinnen- und Seeanemonen-Toxinen die hydrophoben Aminosäuren auf der gegenüberliegenden Seite der hydrophilen liegen (vgl. Kapitel 4.9, S. 126), ist eine wichtige direkte Interaktion von Tyr10, das innerhalb des stark polaren C-terminalen Bereichs von Lqh α IT gefunden wird, mit dem Kanal wenig wahrscheinlich. Im hydrophilen Bereich von ApB kann zudem keine vergleichbare aromatische Aminosäure gefunden werden. Demnach wird die Funktion von Tyr10 eher in der Stabilisierung einer wichtigen positiven Aminosäure gesehen und deshalb bei den Überlagerungen nicht berücksichtigt.



LqhαIT

Bild 4.30: Bändermodell des α -Insektentoxins Lqh α IT mit vermutlich wichtigen funktionellen Aminosäuren und der Connolly-Oberfläche. Die Seitenketten sind nach Atomtypen gefärbt (Kohlenstoffe grün, Stickstoffe blau, Sauerstoffe rot).

Bei der ersten Überlagerung der Skorpion- und Seeanemonen-Toxine (vgl. Kapitel 4.10.3) wurde versucht, die experimentell bestimmten wichtigen Bereiche von ApB und Lqh α IT zu überlagern, um so eine Vororientierung für die folgenden Alignments zu erhalten. In der anschließenden Untersuchung wurde zunächst die Gruppe der Skorpion-Toxine allein betrachtet (vgl. Kapitel 4.10.4). Das α -Insektentoxin Lqh α IT kann AaHII am neuronalen Natriumkanal der Ratten nicht verdrängen, doch umgekehrt bindet AaHII in höheren Konzentrationen kompetitiv zu Lqh α IT am Natriumkanal der Kakerlaken [25]. Daher wurden im nächsten Schritt AaHII und Lqh α IT untersucht, um gemeinsame Eigenschaften dieser beiden Skorpion-Toxine zu finden. Hieraus sollten Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der Toxine am Natriumkanal möglich sein. Aufgrund der homologen Bindungsstellen am Insekten- bzw. Säugerkanal sollte es möglich sein, funktionelle Bereiche von Lqh α IT zumindest teilweise auf AaHII zu übertragen. Außerdem sollten Unterschiede zwischen AaHII und Lqh α IT feststellbar sein, die für die fehlende Affinität von Lqh α IT am neuronalen Rattenkanal verantwortlich sein könnten. Aus diesen Untersuchungen müssten sich für die Interaktion mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger wichtige Bereiche der klassischen α -Skorpion-Toxine ergeben, die auch bei einem

Vergleich von AaHII mit LqqV wiedergefunden werden müssten und die folgenden Überlagerungen von AaHII und LqqV mit ApB erleichtern sollten.

Weitere Anhaltspunkte für die Identifizierung wichtiger Bereiche der klassischen α -Skorpion-Toxine gaben die Ergebnisse chemischer Modifikationen von AaHII, die eine mögliche Bedeutung für Lys2 [147], Lys58 [148], Arg56 [149] und Trp38 [150] in Bezug auf die Aktivität gezeigt haben. Allerdings ist dabei nicht bekannt, ob eine direkte Interaktion dieser Aminosäuren mit dem Kanal vorliegt oder ob sterische Effekte infolge der Modifikation die Bindung der Toxine beeinflussen. Die Aminosäure Lys58, die leicht verdeckt im Molekül liegt, könnte außerdem eine stabilisierende Funktion für das Toxin besitzen oder zum positiven molekularen elektrostatischen Potential beitragen. Auch bei Untersuchungen von AaHI [149] und AaHIII [151] konnte eine Bedeutung der positiv geladenen Aminosäure in Position 2 (Arg2) gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Mutationsstudien mit dem α -Insektentoxin Lqh α IT wurde bei AaHII weder für Arg18 noch für Arg62 eine signifikante Bedeutung in Bezug auf die Aktivität gegenüber Säugern festgestellt [149].

In der Gruppe der Skorpion-Toxine wurden zusätzlich Überlagerungen des klassischen α -Skorpion-Toxins LqqV mit AaHII und Lqh α IT durchgeführt. LqqV bindet in geringer Konzentration kompetitiv zu AaHII am neuronalen Rattenkanal und müsste demnach in wichtigen funktionellen Bereichen mit AaHII vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Am Insektenkanal erfolgt die kompetitive Verdrängung von Lqh α IT durch LqqV im Vergleich zu AaHII erst bei höherer Konzentration [25].

Von besonderem Interesse ist das Toxin LqqV, da Rogers et al. die Bindungsaffinitäten von LqqV und dem Seeanemonen-Toxin ATXII gegenüber mutierten Natriumkanälen getestet hatten [31]. Die Arbeitsgruppe konnte hierdurch Aminosäuren im Loop IVS3-S4 identifiziert, die für die Bindung von Skorpion- bzw. Seeanemonen-Toxinen eine Rolle spielen. Da derzeit keine Struktur von ATXII zur Verfügung steht, wurde stattdessen ApB, das eine hohe Sequenzhomologie zu ATXII aufweist, mit LqqV überlagert. Mit diesem Vergleich sollte versucht werden, mögliche Interaktionspartner der Toxine mit dem Kanal zu bestimmen. Durch die Überlagerung der klassischen α -Skorpion-Toxine AaHII und LqqV mit ApB (vgl. Kapitel 4.10.5) sollte außerdem das Toxiphor-Modell für die Interaktion mit dem neuronalen Säugerkanal, das sich aus den

Untersuchungen der Seeanemonen-Toxine ergeben hatte, wiedergefunden werden.

Auch das β -Skorpion-Toxin Cn2, das an der Bindungsstelle 4 des Natriumkanals angreift und den Aktivierungsprozess beeinflusst, wurde in die Untersuchungen einbezogen (vgl. Kapitel 4.10.6). Dieses Toxin wurde mit dem gut untersuchten ApB überlagert. Auch hierbei sollten Unterschiede in vermutlich funktionell wichtigen Bereichen von ApB einen Hinweis auf mögliche direkte Interaktionsfelder der *site* 3-Toxine mit dem Natriumkanal geben.

δ -ACTX-Ar1, ein Vertreter der Trichternetzspinnen-Toxine, wurde mit AaHII sowie Lqh α IT überlagert, da es sowohl AaHII an neuronalen Rattenkanälen als auch Lqh α IT an neuronalen Kanälen von Kakerlaken kompetitiv verdrängen kann [27]. Durch die Überlagerung mit AaHII sollte das Toxiphor-Modell bestätigt werden, das aus den Untersuchungen der Seeanemonen- und Skorpion-Toxine entwickelt worden war. Aufgrund des sehr komplexen Disulfidbrücken-Musters der Atracotoxine (ACTX), vor allem bedingt durch die unmittelbare Abfolge von drei Disulfidbrücken (Cys14-Cys31, Cys15-Cys1, Cys16-Cys42), ist es bisher noch nicht möglich, größere Mengen der Toxine für chemische Modifikationen oder durch Mutationen veränderte Polypeptide zu synthetisieren. Deswegen sind Struktur-Wirkungsbeziehungen derzeit nicht bekannt. Es wird vermutet, dass der Bereich um Arg5 bei den Toxinen aufgrund des eher ungewöhnlichen strukturellen Aufbaus von funktioneller Bedeutung ist, denn bei der Strukturaufklärung von δ -ACTX-Hv1a wurde ein durch die Aminosäuren Lys3-Lys4-Arg5-Asn6 gebildeter Typ II-Betaturm gefunden [83]. Dabei steht Arginin sehr selten in der i+2-Position, und auch die Position i+3 ist für Asparagin sehr ungewöhnlich. Die Überlagerungen von δ -ACTX-Ar1 mit den Skorpion-Toxinen AaHII und Lqh α IT werden in Kapitel 4.10.7 (S. 161) beschrieben.

Nach einer kurzen Darstellung der molekularen elektrostatischen Potentiale der betrachteten Polypeptide wird im Folgenden zunächst die Überlagerung des Seeanemonen-Toxins ApB mit dem α -Insektentoxin Lqh α IT beschrieben (vgl. Kapitel 4.10.3). Im anschließenden Kapitel 4.10.4 werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen der unterschiedlichen Skorpion-Toxine gezeigt. Nachfolgend wird auf die Überlagerung von ApB mit den klassischen α -Skorpion-Toxinen AaHII und LqqV eingegangen (vgl. Kapitel 4.10.5), und in Kapitel 4.10.6 werden die Eigenschaften des β -Skorpion-Toxins Cn2 erörtert.

Die Ergebnisse der Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit den Skorpiontoxinen AaHII und Lqh α IT werden anschließend in Kapitel 4.10.7 gezeigt. Bei allen durchgeführten Überlagerungen muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der Flexibilität der Lösungsmittel exponierten Aminosäuren auch andere Konformationen der einzelnen Seitenketten möglich sind.

4.10.2 Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials

Die molekularen elektrostatischen Potentiale des α -Insektentoxins Lqh α IT (J), der klassischen α -Skorpion-Toxine AaHII (K) und LqqV (L), des β -Skorpion-Toxins Cn2 (M) und des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 (N) sind in Bild 4.31 (Vorderansicht) und Bild 4.32 (Rückansicht) dargestellt. Die Orientierung der Toxine und die Kennzeichnung der Potentialbereiche stimmt mit den Polypeptiden in Bild 4.17 und Bild 4.18 (S. 108f) überein. Zur Übersicht ist außerdem jeweils das Seeanemonen-Toxin ApB in vergleichbarer räumlicher Lage als Bändermodell mit Connolly-Oberfläche abgebildet (A). Blau gefärbt sind positive, rot negative bei $\pm 0,2$ kT/e konturierte Potentiale. In den folgenden Überlagerungen der einzelnen Toxine wird auf diese Abbildungen im Detail eingegangen.

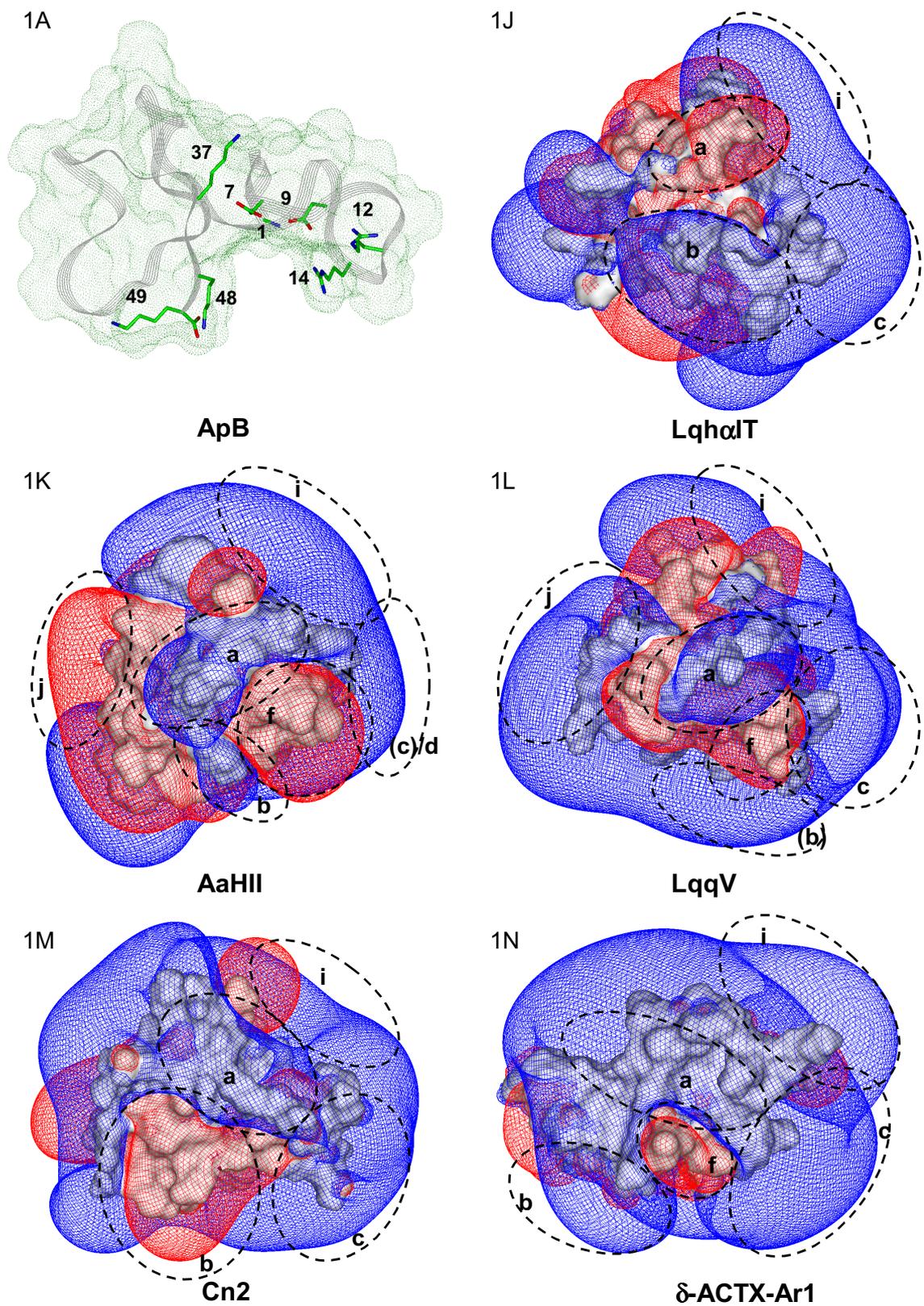


Bild 4.31: Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials in der Vorderansicht. Blau gefärbt ist das positive, rot das negative bei $\pm 0,2$ kT/e konturierte MEP. Erläuterungen s. Kapitel 4.10.2.

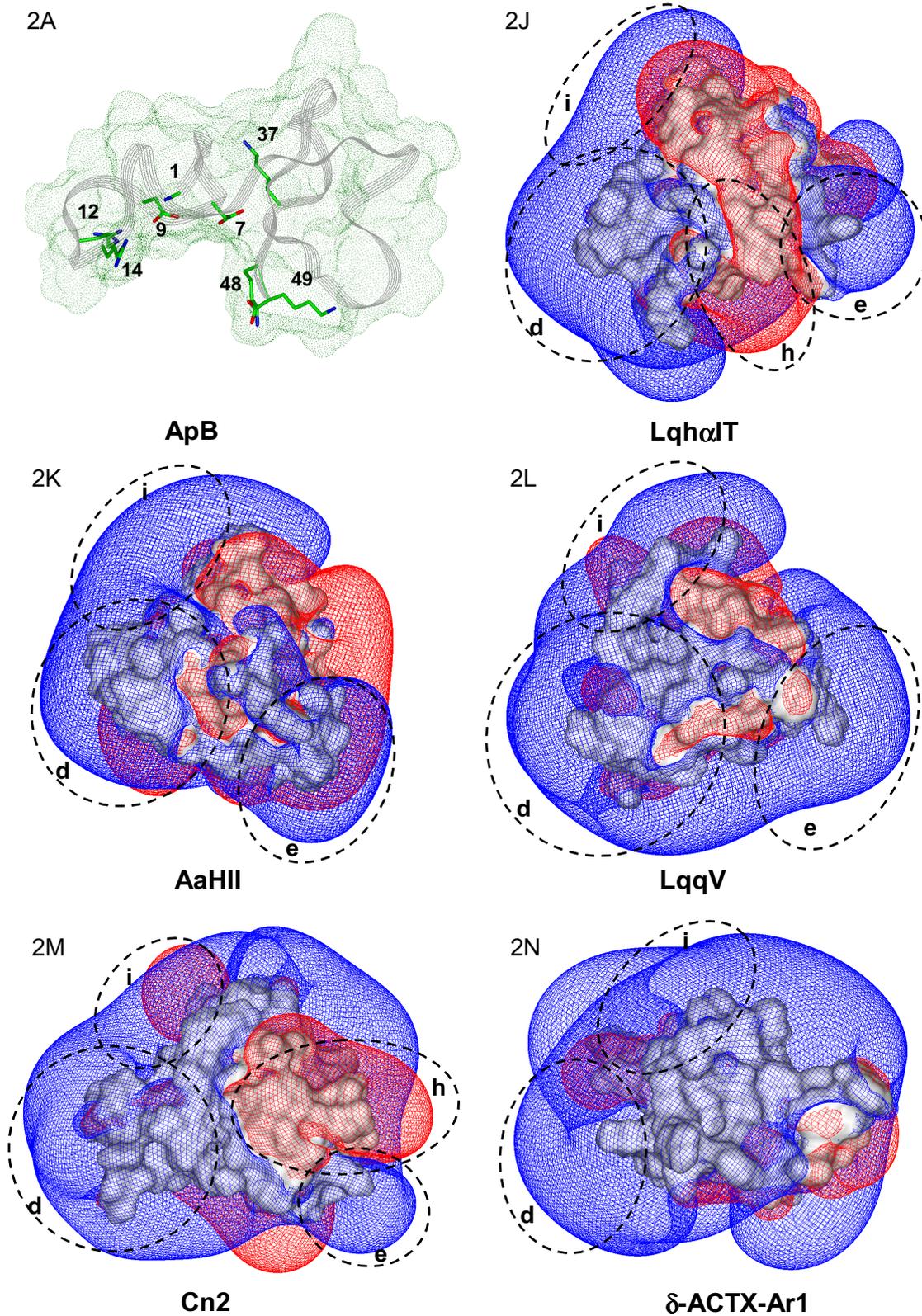


Bild 4.32: Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials in der Rückansicht. Blau gefärbt ist das positive, rot das negative bei $\pm 0,2$ kT/e konturierte MEP. Erläuterungen s. Kapitel 4.10.2.

4.10.3 Überlagerung von ApB mit dem α -Insektentoxin Lqh α IT

In der folgenden Untersuchung des Seeanemonen-Toxins ApB und des Skorpion-Toxins Lqh α IT wurde versucht, die experimentell bestimmten wichtigen Bereiche der beiden Polypeptide zu überlagern. Dies sollte als Vororientierung für die weiteren Vergleiche der drei Toxingruppen hilfreich sein. Außerdem sollte versucht werden, Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der beiden strukturell unterschiedlichen Toxine zu ziehen, denn ApB und Lqh α IT hemmen den Inaktivierungsprozess der Natriumkanals.

In den beiden mit Lqh α IT durchgeführten MD-Simulationen, Lqh α IT-MD1 und Lqh α IT-MD2 (vgl. Kapitel 4.4), ergaben sich für einige Aminosäuren Konformationsunterschiede. Dies betraf bei den geladenen Aminosäuren vor allem Lys8 und Lys41. Lys8 von Lqh α IT wurde so bei dem ausgewählten Konformer aus Lqh α IT-MD2 zwischen Lys37 und Lys48 bei ApB gefunden, bei dem Konformer aus Lqh α IT-MD1 lag diese Aminosäure äquivalent zu Lys48. Die Position von Lys8 bei Lqh α IT wird beeinflusst durch elektrostatische Interaktionen mit Glu15 (s. Bild 4.33), daher wird eine Überlagerung mit Lys48 vermutet. Auch Lys41, das eine Bedeutung für die Aktivität des Skorpion-Toxins besitzt [145], kann bedingt durch die Flexibilität der β -*hairpin*-Struktur in verschiedenen Positionen gefunden werden. Bei der Lqh α IT-MD2-Konformation war eine günstige Überlagerung mit wichtigen Aminosäuren von ApB nicht möglich. Im Gegensatz dazu konnte bei dem Konformer aus Lqh α IT-MD1 eine Überlagerung mit der N-terminalen α -Aminogruppe und Arg14 von ApB durchgeführt werden. Aufgrund der funktionellen Bedeutung dieser Bereiche wird deshalb das Alignment von Lys41 bei Lqh α IT mit Arg14 und der α -Aminogruppe angenommen.

Bei der in Bild 4.33 dargestellten Überlagerung konnten so neben der α -Aminogruppe bzw. Arg14 und Lys48 auch die hydrophoben Aminosäuren Leu18, Tyr25 und Trp33 von ApB durch äquivalente Bereiche von Lqh α IT berücksichtigt werden. Da bei Lqh α IT die wichtigen Aminosäuren Lys62 und Arg64 dicht beieinander liegen, könnte Arg12 zu beiden äquivalent sein. Allerdings wird aufgrund der vorliegenden Konformationen von ApB und Lqh α IT eher eine Überlagerung von Arg12 und Lys62 angenommen. Gestützt würde dies durch die sehr wichtige funktionelle Bedeutung von Lys62 für die Bindungsaffinität am neuronalen Kanal der Kakerlaken. Arg18 von Lqh α IT konnte nicht durch eine

äquivalente Aminosäure von ApB überlagert werden. Umgekehrt fehlen bei dem Skorpion-Toxin Asp7, Asp9 und Lys37 entsprechende Aminosäuren.

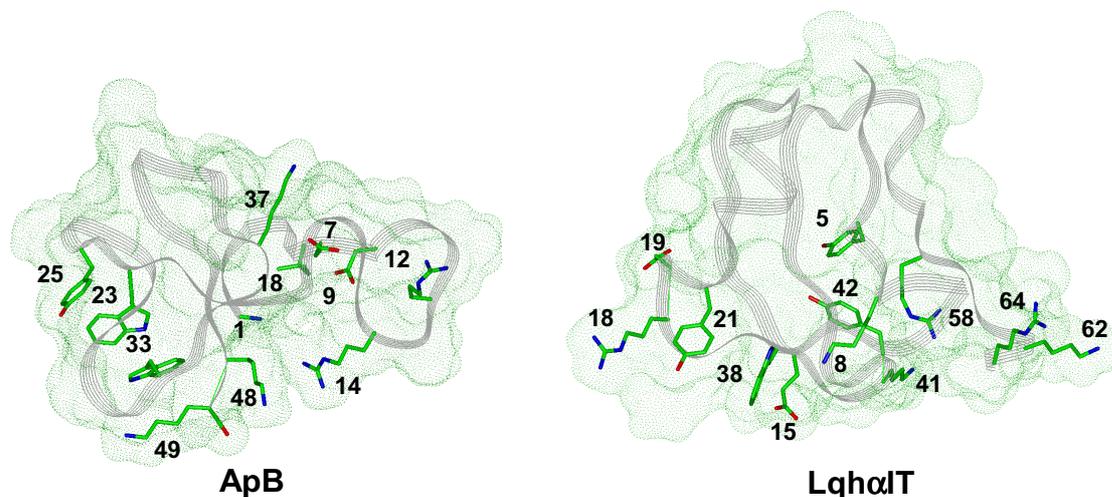


Bild 4.33: Bändermodelle der Toxine ApB und LqhαIT mit Connolly-Oberflächen. Die Konformation von LqhαIT stammt aus der MD-Simulation LqhαIT-MD1. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.21.

Tabelle 4.21: Überlagerung von ApB mit LqhαIT

ApB	α -NH ₂ ^a /Arg14	Arg12	Lys48	COO ⁻ (Lys49) ^b	Leu18	Tyr25	Trp33
LqhαIT	Lys41	Lys62	Lys8	Glu15	Tyr5/Tyr42	Tyr21	Trp38

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

^b C-terminale Carboxylatgruppe

Bei der Überlagerung der beiden Toxine ist weiterhin der deutlich parallele Verlauf des Proteinrückgrats im Bereich der Aminosäuren 4-10 (ApB) auffallend (s. Bild 4.34). Es wird vermutet, dass diese Region eine Rolle bei der Stabilisierung der offenen Konformation des Natriumkanals spielt (vgl. Kapitel 4.7).

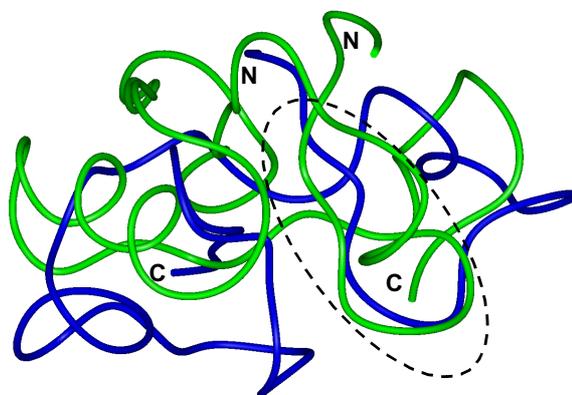


Bild 4.34: Bändermodelle der Toxine ApB (blau) und LqhαIT (grün). Der Bereich der Aminosäuren 4-10 (ApB) ist gekennzeichnet.

Bei der Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials (ApB: Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f/ Lqh α IT: Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) findet man Übereinstimmungen in den positiven Potentialen in den Bereichen b (ApB: Lys48), c (Arg12), d (α -Aminogruppe/Arg14) und e (Lys49). Das positive Potential von Lys37 (a) sowie das negative durch Asp7 und Asp9 (f) bei ApB findet keine Entsprechung bei Lqh α IT. Bei dem Skorpion-Toxin findet man stattdessen ein negatives Potential im Bereich a und ein zusätzliches im Bereich h.

4.10.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Überlagerung von ApB mit Lqh α IT konnte gezeigt werden, dass bis auf wenige Ausnahmen die funktionell wichtigen Aminosäuren beider Toxine in vergleichbarer topologischer Anordnung liegen. Dabei wurden die positiv geladenen Aminosäuren Lys8, Lys41 und Lys62 sowie Tyr21 von Lqh α IT durch Bereiche von ApB überlagert. Diese Aminosäuren spielen bei Lqh α IT für die Bindung am Insektenkanal eine wichtige Rolle. Äquivalente Aminosäuren bei dem Seeanemonen-Toxin sollten daher die kompetitive Bindung an diesem Kanal erklären.

Arg18, das bei Lqh α IT eine wichtige Bedeutung für die Affinität besitzt, konnte nicht durch Aminosäuren von ApB überlagert werden. Es wird vermutet, dass die Funktion von Arg18 bei dem α -Insektentoxin Lqh α IT vor allem in einer Begrenzung des zusätzlichen negativen molekularen elektrostatischen Potentials h liegt, das durch Glu15 und Asp19 verursacht wird. Diese Vermutung wird auf die Lage des Potentials gestützt, denn es tritt zwischen den funktionell wichtigen Aminosäuren Lys41 (d) und Arg18 (e) auf. Die hydrophoben Aminosäuren Leu18 bzw. Trp33, die für die Bindungsaffinität von ApB eine große Rolle spielen, würden entsprechend bei Lqh α IT im positiven Einflussbereich von Lys41 bzw. Arg18 liegen. Bei den Seeanemonen-Toxinen tritt ein vergleichbar stark ausgeprägtes negatives Potential h nicht auf, demnach wäre möglicherweise eine Arg18 äquivalente Aminosäure, die das negative Potential in diesem Bereich begrenzen könnte, nicht notwendig. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die geringe Bedeutung von Arg18 bei dem klassischen α -Skorpion-Toxin AaHII. Auch hier tritt kein negatives Potential auf, denn in der Sequenz wird weder Glu15 noch Asp19 gefunden. Demnach wird angenommen, dass Arg18 keine wichtige direkte Interaktion mit dem Natriumkanal eingeht. Hierfür spricht weiterhin, dass auch bei AaHI und AaHIII (klassische α -Skorpion-Toxine, vgl. Kapitel 4.10.4.2) sowie δ -ACTX-Ar1 (Trichternetzspin-

nen-Toxin, vgl. Kapitel 4.10.7) keine zu Arg18 äquivalente Aminosäure gefunden werden konnte.

Weiterhin wurde Arg64 relativ schlecht durch ApB überlagert, doch spielt diese Aminosäure keine große Rolle für die Aktivität von Lqh α IT [145]. Zudem scheint die positive Ladung in diesem Bereich nicht entscheidend für die Bindung zu sein (vgl. Kapitel 4.10.4.1).

Zu dem ausgeprägten positiven Potential (b, c, d, i) von Lqh α IT, das räumlich dem Potential im Loop I-Bereich von ApB entspricht, tragen bei dem Skorpion-Toxin die Aminosäuren Lys8, Lys62, Arg64, Lys41 sowie das leicht verdeckt liegende Lys58 bei. Da für Lys8, Lys62, Arg64, Lys41 eine wichtige funktionelle Bedeutung gezeigt werden konnte [145], spricht das Auftreten dieses starken Potentials für eine mögliche elektrostatische Interaktion mit dem Natriumkanal, die zur Hemmung des Inaktivierungsprozesses führt.

Interessant war außerdem der auffällig parallele Verlauf des Proteinrückgrats im Bereich der Aminosäuren 4-10 von ApB bei der Überlagerung mit Lqh α IT. Es wird nach den Untersuchungen der Seeanemonen-Toxine vermutet, dass diese Region für die Hemmung der Inaktivierung eine wichtige Bedeutung besitzt (vgl. Kapitel 4.7). Auch bei der Überlagerung von ApB mit AaHIII ergaben sich hier gute Übereinstimmungen (vgl. Kapitel 4.10.5.1). Deshalb wird angenommen, dass dieser Bereich (Aminosäuren 4-10) in direktem Kontakt mit dem Natriumkanal bei Insekten und auch Säugern steht.

Die Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass offensichtlich neben Lys37 und Lys49 auch die negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 (ApB) keine Rolle für die direkte Interaktion mit dem Insektenkanal spielen. Dies wäre analog zu den Seeanemonen-Toxinen, die toxisch für Crustaceen sind. Ohnehin wird weder für den Säuger- noch für den Crustaceenkanal eine direkte Interaktion durch Asp7 und Asp9 vermutet (vgl. Kapitel 4.8.2). Das negative Potential im Bereich a bei Lqh α IT könnte wie auch bei den Seeanemonen-Toxinen ATXIa und ATXIII dazu beitragen, die Bindung am Säugerkanal zu verhindern.

4.10.4 Untersuchung der Skorpion-Toxine

Im Folgenden wird zunächst die Überlagerung des α -Insektentoxins Lqh α IT mit dem klassischen α -Skorpion-Toxin AaHIII beschrieben. Hierbei sollte nach gemeinsamen bzw. unterschiedlichen Eigenschaften gesucht werden, die Rückschlüsse auf die Interaktion der Toxine mit dem Säuger- bzw. Insektenkanal

ermöglichen (vgl. Kapitel 4.10.4.1). Unterschiede zwischen den beiden Toxinen, die eine Bedeutung für die Interaktion mit dem Säugerkanal besitzen könnten, sollten auch bei anderen klassischen α -Skorpion-Toxinen wiederzufinden sein. Deshalb wurde neben den Sequenzen der Toxine AaHI-III und LqqV auch ein Homologie-Modell von LqqV untersucht (vgl. Kapitel 4.10.4.2). Darüber hinaus wurde eine Überlagerung von LqqV mit Lqh α IT durchgeführt (vgl. Kapitel 4.10.4.3). Dies war von Interesse, da das Homologie-Modell von LqqV eine Lqh α IT ähnliche Konformation im C-Terminus zeigt. In den Mutationsstudien mit Lqh α IT wurde festgestellt, dass die Konformation des C-terminalen Bereichs Einfluß auf die Bindung am Säuger- und Insektenkanal besitzt [145]. In Kapitel 4.10.4.4 werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Skorpion-Toxine zusammengefasst.

4.10.4.1 Überlagerung von Lqh α IT mit AaHII

Das klassische α -Skorpion-Toxin AaHII kann in hoher Konzentration kompetitiv zu Lqh α IT am Insektenkanal binden, umgekehrt kann allerdings Lqh α IT AaHII nicht am Säugerkanal verdrängen. Zunächst wurde versucht, gemeinsame Merkmale sowie Unterschiede bei diesen Toxinen zu finden, die Rückschlüsse auf die Interaktion mit den Säuger- bzw. Insektenkanälen und den Wirkmechanismus ermöglichen. Da bisher keine Mutationsstudien von AaHII verfügbar sind, sollte außerdem versucht werden, über gemeinsame Eigenschaften in funktionell wichtigen Bereichen von Lqh α IT ebenfalls wichtige Regionen von AaHII zu identifizieren.

Die Überlagerung von Lqh α IT mit AaHII ist in Bild 4.35 dargestellt. Dabei wurden neben geladenen Aminosäuren auch hydrophobe Aminosäuren wie Trp38 und Phe17 (Lqh α IT) in guter Übereinstimmung gefunden. Die konservierte hydrophobe Oberfläche (vgl. Kapitel 4.9), die bei AaHII durch Tyr5, Tyr35, Tyr42, Tyr47 sowie Tyr49 gebildet wird und im Vergleich zu den hydrophilen Bereichen um Lys28 und Lys30 auf der gegenüberliegenden Seite zu finden ist, lag bei beiden Toxinen ebenfalls in vergleichbarer räumlicher Position.

Lys62 und Arg64, die beide wichtige funktionelle Aminosäuren bei Lqh α IT am Insektenkanal darstellen, konnten aufgrund der deutlich anderen C-terminalen Konformation der Toxine nicht überlagert werden. Bei Lqh α IT wurde neben der Substitution von Arg64 durch Ala, die zu einer deutlich reduzierten Affinität des Toxins führt, auch der Austausch durch His (R64H), der entsprechenden

Aminosäure bei AaHII, untersucht [145]. Dabei ergab sich für diese Mutante eine höhere Bindungsaffinität am Insektenkanal. Weitere NMR-Studien mit dem Toxin R64H ergaben eine um fast 180° gedrehte Seitenkette von His64 [116]. Insofern sind sowohl die positive Ladung in der Position 64 als auch die Konformation von Arg64 in diesem Bereich nicht unbedingt für die Affinität am Insektenkanal wichtig. Deshalb könnte vor allem das Fehlen einer zu Lys62 äquivalenten Aminosäure bei AaHII eine Ursache für die relativ niedrige Bindungsaffinität von AaHII am Insektenkanal sein.

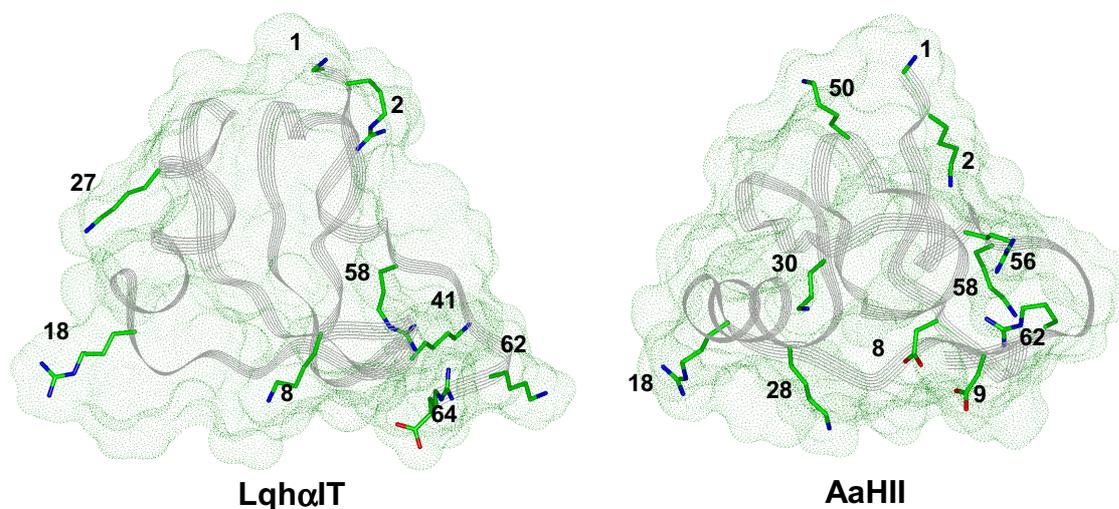


Bild 4.35: Bändermodelle der Skorpio-Toxine LqhαIT und AaHII mit Connolly-Oberflächen. Die hydrophoben Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.22.

Tabelle 4.22: Überlagerung von LqhαIT mit AaHII

LqhαIT	α -NH ₂ ^a	Arg2	Lys8	Arg18	Lys41	Arg58	COO ⁻ (Arg64) ^b	Phe17	Trp38
AaHII	α -NH ₂ ^a	Lys2	Lys28	Arg18	Arg62	Lys58	Asp9	Tyr21	Phe15

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

^b C-terminale Carboxylatgruppe

Den Aminosäuren Asp8, Lys30 und Arg56 von AaHII konnten keine äquivalenten Aminosäuren bei LqhαIT zugeordnet werden. Dabei sind vor allem Lys30 und Arg56 von Interesse, obwohl diese beiden Aminosäuren bei den klassischen α -Toxinen nur bei wenigen Polypeptiden gefunden werden. Hierauf wird bei der Überlagerung von AaHII mit LqqV eingegangen.

Beim Vergleich der molekularen elektrostatischen Potentiale (s. Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) konnten bei beiden Toxinen (LqhαIT: 1J, 2J/ AaHII: 1K, 2K) positive MEPs im Bereich i (AaHII: α -Aminogruppe/Lys2/Arg56), b (Lys28), c/d

(Lys58/Arg62) und e (Arg18) gefunden werden. Entgegengesetzte Potentiale ergaben sich in den Bereichen a (AaHII: Lys30) und f (AaHII: Asp8, Asp9). Außerdem trat bei Lqh α IT ein negatives Potential durch Glu15 und Asp19 (h) auf, das sich zusätzlich zwischen Lys8 und Lys41 erstreckt.

4.10.4.2 Untersuchung der klassischen α -Skorpion-Toxine

Bei der Untersuchung von AaHII und Lqh α IT waren die Aminosäuren Asp8, Lys30 und Arg56 (AaHII) als Unterschiede aufgefallen. Diese Aminosäuren könnten demnach eine Bedeutung für die Interaktion von AaHII mit dem Natriumkanal der Säuger besitzen. Allerdings werden speziell Lys30 und Arg56 lediglich in den Sequenzen von wenigen Toxinen wie AaHII und BotIII¹ gefunden. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob äquivalente Aminosäuren zu Asp8, Lys30 oder Arg56 auch bei anderen klassischen α -Skorpion-Toxinen auftreten.

Neben der Kristallstruktur von AaHII (PDB: 1aho [71]) wurde ein Homologie-Modell von LqqV untersucht. Bei diesem Toxin, das in niedriger Konzentration kompetitiv zu AaHII an Kanälen aus Rattenhirn bindet [25], findet man weder Lys30 noch Arg56. Zunächst wurden aber die Sequenzen der vier klassischen, am Säugerkanal aktiven α -Skorpion-Toxine AaHI–III und LqqV untersucht (s. Bild 4.36).

AaHII	(1)	VKDGYIVDDVNC	TYFCGRNAYCNEECTKLKGE	SGYCWASPYGNAC	CYCYK	(50)
LqqV	(1)	LKDGYIVDDKNC	TFFCGRNAYCNDECKKKGGE	SGYCWASPYGNAC	WCYK	(50)
AaHI	(1)	KRDGYIVYPNN	CVYHCVPP--CDGLCKKNGGSSG	SCSFLVPSGLAC	WCKD	(48)
AaHIII	(1)	VRDGYIVNSKNC	VYHCVPP--CDGLCKKNGAKSG	SCGFLIPSGLAC	WCVA	(48)
AaHII	(51)	LPD	HVRTKGP-GRCH*			(64)
LqqV	(51)	LPD	RVSIKEK-GRCN*			(64)
AaHI	(49)	LPD	NVPIKDTSRKCT			(63)
AaHIII	(49)	LPD	NVPIKDPSYKCHS			(64)

Bild 4.36: Sequenzalignment der klassischen α -Skorpion-Toxine. Durch einen Stern (*) gekennzeichnet sind die Toxine mit amidierter C-terminaler Carboxylatgruppe. Bei AaHIII gibt es in der Literatur (vgl. SWISS-PROT-Datenbank: SCX3_ANDAU) für die Position 8 zwei mögliche Aminosäuren: Asp (D) bzw. Asn (N). Dabei wird allerdings meistens Asn angegeben [63][69].

Durch chemische Modifikation wurden bei AaHII als vermutlich wichtige Aminosäuren Lys2, Arg56, Lys58 sowie Trp38 identifiziert [147]-[150]. Keine Rolle für

¹ BotIII: Toxin des Skorpions *Buthus occitanus tunetanus* (SWISS-PROT-Datenbank: SCX3_BUTOC)

die Aktivität am Säugerkanal scheinen Arg18 und Arg62 zu spielen [149]. Aufgrund von Modifikationen bei AaHI und AaHIII kann eine zusätzliche Bedeutung für die N-terminale α -Aminogruppe vermutet werden [149]. Bei allen vier betrachteten Skorpion-Toxinen werden Arg/Lys2 und Lys58 (AaHII) gefunden. Außerdem liegt in allen Sequenzen Arg/Lys62 vor, obwohl diese Aminosäure keine große Rolle für die Aktivität spielen sollte. Es fällt außerdem auf, dass im Bereich von Lys28 und Lys30 bei AaHII in der Sequenz von AaHI, AaHIII und LqqV zwar keine Lys30 äquivalente Aminosäure gefunden wird, dennoch treten hier mehrere positive Ladungen auf, speziell bei LqqV findet man Lys27, Lys28 sowie Lys29. Die Aminosäure Arg18 kommt nur bei AaHII und LqqV vor, und auch die beiden negativ geladenen Aminosäuren Asp8 und Asp9 werden in den Sequenzen von AaHI und AaHIII nicht gefunden. Aufgrund ihrer vermutlich wichtigen Bedeutung und dem Auftreten bei allen vier klassischen α -Skorpion-Toxinen wurde versucht, Lys/Arg2 und Lys58 (AaHII) sowie die lipophilen Aminosäuren der Toxine bei den folgenden Überlagerungen besonders zu berücksichtigen.

Um genauere Informationen über die Konformation der einzelnen Aminosäuren bei LqqV zu erhalten, wurde ein Homologie-Modell dieses Toxins mit AaHII verglichen. Obwohl das Modell von LqqV mit der Kristallstruktur von AaHII (1aho) aufgebaut wurde, ergab sich in der MD-Simulation eine deutlich andere Konformation im C-Terminus. Dies ist vermutlich auf die geladenen Aminosäuren Glu59 und Lys60 zurückzuführen, denn sie stehen durch elektrostatische Interaktionen in engem Kontakt (s. Bild 4.37). Ohnehin ist durch die höhere Lösungsmittel-Zugänglichkeit der Disulfidbrücke Cys12-Cys63 mehr Flexibilität in diesem Bereich möglich. Durch die Konformationsänderung im C-Terminus erhalten die Aminosäuren Arg62 der beiden Toxine gegeneinander versetzte Positionen und können so nicht gut überlagert werden. Diese fehlende Übereinstimmung ist konsistent mit Experimenten, die bei AaHII keine wichtige Rolle von Arg62 für die Aktivität gegenüber Säugern feststellen konnten [149]. Außerdem wird vermutet, dass die Toxine, die mit der Bindungsstelle 3 des Natriumkanals interagieren, an überlappenden und nicht identischen Bindungsstellen angreifen [31]. LqqV und AaHII könnten, obwohl beides klassische α -Skorpion-Toxine sind, durchaus unterschiedliche Interaktionspartner am Natriumkanal besitzen. Darüber hinaus könnten andere Aminosäuren fehlende Kontakte ersetzen.

Bei der Untersuchung der Polypeptide konnten die Aminosäuren Arg18, Lys28 und Asp8/Asp9 (AaHII) gut überlagert werden (s. Bild 4.37). Aufgrund der Flexibilität und der räumlichen Nähe lagen Lys2 und Arg56 bei AaHII in einer vergleichbaren Position wie Lys2 und Arg54 bei LqqV. Die mit Arg56 bei AaHII übereinstimmende Lage von Arg54 bei LqqV wird dabei durch die veränderte Struktur des C-Terminus begünstigt. Weiterhin liegt durch eine leichte Konformationsveränderung des Loops im Anschluss an die α -Helix von LqqV Lys29 in einem mit Lys30 bei AaHII vergleichbaren Bereich. Lys58 wurde in beiden Toxinen in ähnlicher, leicht im Molekül verdeckter Position gefunden. Die konservierte hydrophobe Oberfläche der beiden Toxine lag in vergleichbarer Position (nicht dargestellt).

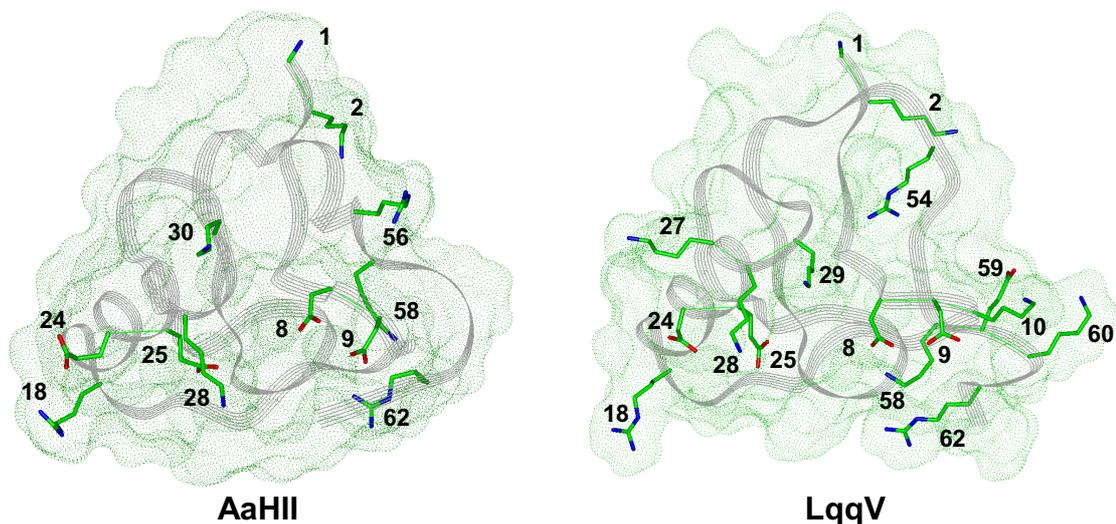


Bild 4.37: Bändermodelle der klassischen α -Skorpion-Toxine AaHII und LqqV mit Connolly-Oberflächen. Hydrophobe Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.23.

Tabelle 4.23: Überlagerung von AaHII mit LqqV

AaHII	α -NH ₂ ^a	Lys2	Arg18	Lys28	Lys30	Arg56	Lys58	Asp8/9
LqqV	α -NH ₂ ^a	Lys2	Arg18	Lys28	Lys29	Arg54	Lys58	Asp8/9

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Bei der Betrachtung des molekularen elektrostatischen Potentials (s. Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) findet man gute Übereinstimmungen in den Bereichen i (AaHII: α -Aminogruppe/Lys2/Arg56), a (Lys30), d (Lys58, Arg62), e (Arg18) und f (Asp8, Asp9). Das Potential im Bereich b (AaHII: Lys28) ist bei LqqV zwar leicht verschoben, aber dennoch durch die zusätzlichen positiv geladenen Aminosäuren in diesem Bereich (Lys58 bzw. Arg62) stark ausgeprägt. Hiermit

vergleichbar ist auch das Auftreten des Potentials im Bereich c bei AaHII, denn auch hier ist keine direkte Überlagerung gegeben; dennoch findet man leicht verschoben ein sehr ausgeprägtes Potential durch Lys58 und Arg62. Unterschiede zwischen den beiden Toxinen zeigen sich in den Bereichen um Lys27 (j) und Lys10/Lys60 (c) bei LqqV, die durch die zusätzlichen positiv geladenen Aminosäuren im Vergleich zu AaHII ein deutlich stärker ausgeprägtes positives Potential besitzen. Für die Aminosäure Arg60, die auch bei AaHI in dieser Position gefunden wird, konnte aber eine nur geringe Bedeutung für die Aktivität festgestellt werden [149]. Da AaHII außerdem die höchste Toxizität für Säuger besitzt, sollten die Unterschiede in den positiven Bereichen zwischen AaHII und LqqV keine entscheidende Bedeutung besitzen.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass Lys30 und Arg56 von AaHII durch die Aminosäuren Lys29 und Arg54 von LqqV ersetzt werden können. Bei den Toxinen AaHI und AaHIII findet man anstelle der Aminosäuren Lys28 und Lys30 von AaHII in diesem Sequenzabschnitt Lys25, Lys26 und Asn27. Die Konformationen der Aminosäuren Lys30 bei AaHII und Lys29 bei LqqV werden durch elektrostatische Interaktionen mit Asp8 und Asp9 beeinflusst. Weiterhin findet man im Bereich der α -Helix bei AaHII Glu24 und Glu25, bei LqqV Asp24 und Glu25, die die Position von Lys28 bei beiden Toxinen stabilisieren. Dies ist vergleichbar zu der Bedeutung der negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 bei den Seeanemonen-Toxinen, die ebenfalls zur Stabilisierung wichtiger positiv geladener Aminosäuren beitragen (vgl. Kapitel 4.7). Die negativen Ladungen in den Positionen 8, 9, 24 und 25 werden weder bei AaHI noch bei AaHIII gefunden. Insofern können hier andere Konformationen für die beiden Lysine Lys25 bzw. Lys26 und Asn27 möglich sein, die dennoch die vermutlich wichtigen Bereiche von Lys28 und Lys30 bei AaHII abdecken können.

Die Aminosäuren Asp8, Asp9 und Arg18 werden bei AaHI und AaHIII nicht gefunden. Da beide Toxine trotzdem kompetitiv AaHII an neuronalen Rattenkanälen verdrängen können [25], wäre es möglich, dass ihr Fehlen durch andere Interaktionen kompensiert wird. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wird aber angenommen, dass diese drei Aminosäuren eine nur untergeordnete Rolle für die Aktivität am Säugerkanal besitzen (vgl. auch Kapitel 4.8.4). Speziell für Arg18 konnte durch chemische Modifikation von AaHII gezeigt werden, dass diese Aminosäure keine Bedeutung für die Aktivität besitzt [149]. Hierfür spricht auch die Untersuchung des molekularen elektrosta-

tischen Potentials von Lqh α IT und die Überlagerung dieses Toxins mit ApB (vgl. Kapitel 4.10.3).

In unmittelbarer Nähe zu Arg56 bei AaHII liegt die konservierte, vermutlich funktionell wichtige Aminosäure Lys2. Insofern könnte bei AaHI und AaHIII, die weder in Position 54 noch 56 eine positiv geladene Aminosäure besitzen, Arg2 einen Ersatz darstellen. Außerdem trägt zu dem ausgeprägten positiven Potential i in diesem Bereich neben Arg/Lys2 auch die α -Aminogruppe bei. Eine weitere Kompensation sollte durch Asn52 möglich sein, das Wasserstoffbrücken-Bindungen zum Natriumkanal ausbilden könnte.

4.10.4.3 Überlagerung von LqqV mit Lqh α IT

Bei der MD-Simulation des klassischen α -Skorpion-Toxins LqqV ergab sich eine deutlich andere Konformation des C-terminalen Bereichs im Vergleich zu AaHII. Interessant war dabei die Beobachtung, dass sich dieser Bereich (s. Bild 4.38, C), der N-Terminus (A) und der 5-Aminosäure-Turn (B) gut mit der Struktur von Lqh α IT überlagern lassen. LqqV kann kompetitiv zum α -Insektentoxin Lqh α IT an den neuronalen Natriumkanal der Kakerlaken binden. Allerdings erfolgt die kompetitive Bindung verglichen mit AaHII erst bei deutlich höherer Konzentration [25].

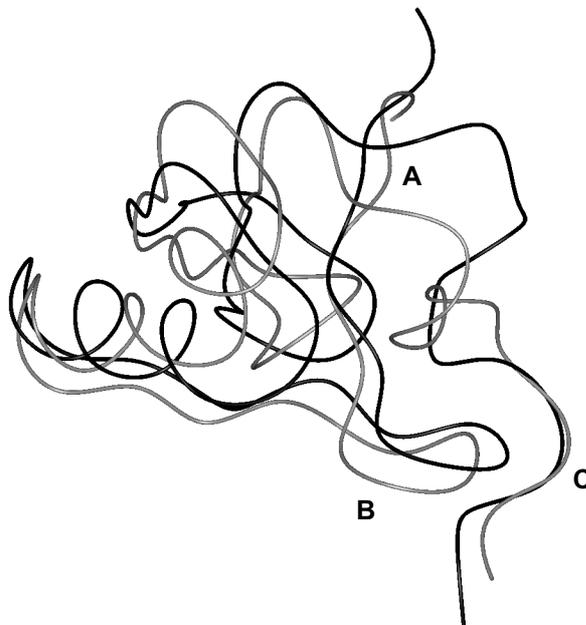


Bild 4.38: Bändermodelle von LqqV (*schwarz*) und Lqh α IT (*grau*). **A** kennzeichnet den N-Terminus, **B** den 5-Aminosäure-Turn und **C** den C-Terminus der Toxine.

Die Überlagerung der einzelnen Aminosäuren von LqqV und Lqh α IT ist in Bild 4.39 dargestellt. Zusätzlich ergab sich eine übereinstimmende Lage der konservierten hydrophoben Oberflächen (CHS), und auch die C-terminale Carboxylatgruppe (Arg64) von Lqh α IT könnte aufgrund ihrer Flexibilität Asp9 von LqqV entsprechen. Für die Aminosäuren Asp8, Lys28, Lys29 und Arg54 von LqqV konnten, ähnlich der Überlagerung des α -Insektentoxins mit AaIII, keine vergleichbaren Aminosäuren bei Lqh α IT gefunden werden.

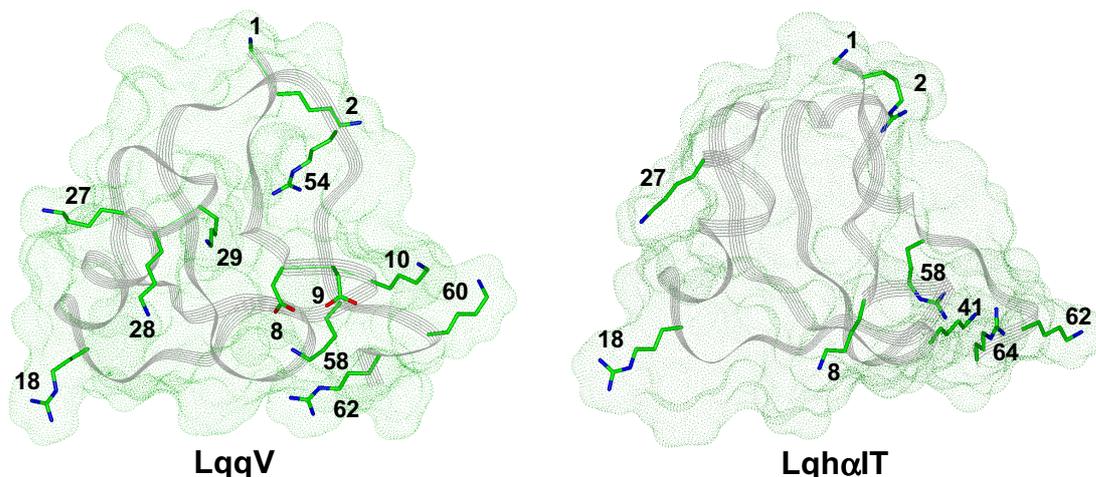


Bild 4.39: Bändermodelle der Toxine LqqV und Lqh α IT mit Connolly-Oberflächen. Hydrophobe Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.24.

Tabelle 4.24: Überlagerung von LqqV mit Lqh α IT

LqqV	α -NH ₂ ^a	Lys2	Lys10/Lys60	Arg18	Lys27	Lys58	Asp9
LqhαIT	α -NH ₂ ^a	Arg2	Arg64/Lys62	Arg18	Lys27	Arg58	Arg64, COO ^{-b}

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

^b C-terminale Carboxylatgruppe

Auf der anderen Seite konnte bei Lqh α IT keine Überlagerung von Lys41 mit einer Aminosäure von LqqV ermöglicht werden. Möglicherweise ist dies zusätzlich zur fehlenden äquivalenten Aminosäure für Lys8 eine Ursache für die schwächere Bindung von LqqV am Insektenkanal, denn Lys41 wird vor allem bei den für Insekten toxischen Verbindungen, wie Lqh α IT, LqqIII und LqqIV, gefunden. Bei AaIII, das im Vergleich zu LqqV bereits in niedrigerer Konzentration Lqh α IT kompetitiv verdrängen kann, wird Lys41 mit Arg62 und Lys8 mit Lys28 überlagert.

Die ähnliche Konformation des C-terminalen Bereichs bei LqqV und Lqh α IT wird in erster Linie für das Proteinrückgrat und nicht für die Seitenketten ge-

funden. Arg64 ragt bei Lqh α IT deutlich ins Lösungsmittel und besitzt dadurch im Vergleich zu LqqV in dieser Region einen deutlich höheren Raumbedarf. Beim Austausch von Arg64 durch Histidin konnte mit NMR-Untersuchungen festgestellt werden, dass sich die Seitenkette von His64 um fast 180° wendet [116]. Bei dieser Mutante R64H wurde außerdem eine höhere Aktivität gegenüber Säugern und Insekten festgestellt [145]. Aufgrund des Vergleichs mit LqqV kann die Konformation des C-Terminus an sich für diesen Effekt ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist stattdessen, dass aufgrund des geringeren Platzbedarfs des C-terminalen Bereichs von R64H die Interaktion mit dem Natriumkanal begünstigt wird.

4.10.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das α -Insektentoxin Lqh α IT kann das klassische α -Toxin AaHIII nicht am neuronalen Säugerkanal verdrängen. In den Untersuchungen der Skorpion-Toxine ergaben sich hierfür mehrere mögliche Erklärungen:

Bei dem Toxin Lqh α IT kann eine vermutlich für die Interaktion mit dem Säugerkanal wichtige positiv geladene Aminosäure im Bereich von Lys30 bei AaHIII nicht gefunden werden. Die Bedeutung von Lys30 könnte in einem direkten Kontakt zum Kanal liegen, außerdem trägt diese Aminosäure maßgeblich zum positiven Potential a von AaHIII bei. In diesem Bereich findet man stattdessen bei Lqh α IT ein negatives Potential.

Ein weiteres, sehr ausgeprägtes negatives Potential konnte im Bereich h von Lqh α IT gefunden werden, das durch Glu15 und Asp19 gebildet wird. Bei den *Anemonia sulcata*-Polypeptiden BDSI und BDSII, die am neuronalen Säugerkanal binden können, wurde hier ebenfalls ein negativer Bereich gefunden (vgl. Kapitel 4.8.3.2). Allerdings erstreckt sich das Potential h bei Lqh α IT zusätzlich über den Bereich zwischen den Aminosäuren Lys8 und Lys41, die vermutlich in der Bindungsregion liegen. Bei den klassischen α -Skorpion-Toxinen werden in den Positionen 15 und 19 keine negativ geladenen Aminosäuren gefunden. Deshalb wird vermutet, dass auch das negative Potential h bei Lqh α IT die Interaktion mit dem Säugerkanal behindert.

Darüber hinaus könnte auch die Konformation des C-Terminus bei Lqh α IT eine Rolle spielen. Allerdings zeigt LqqV eine ähnliche Struktur im Proteinrückgrat dieses Bereichs, so dass hier möglicherweise das Volumen der Seitenkette von

Arg64 bei Lqh α IT die Interaktion mit dem Säugerkanal sterisch behindert (vgl. Kapitel 4.10.4.3).

Das Fehlen von Asp8 und Arg56 hingegen scheint einen geringeren Einfluss auf die Bindung am Säugerkanal zu besitzen, dementsprechend sollte bei Lqh α IT das positive Potential im Bereich f (AaHII: Asp8, Asp9) keine Rolle spielen.

Es kann außerdem festgehalten werden, dass die Aminosäure Arg18 bei der Interaktion der α -Skorpion-Toxine mit dem Säuger- und Insektenkanal vermutlich keine wichtige Rolle besitzt. Hierfür sprechen neben chemischen Modifikationen von AaHII, bei denen kein Einfluss auf die Aktivität festgestellt wurde, das Fehlen dieser Aminosäure bei AaHI und AaHIII. Weiterhin spielt bei den Überlagerungen von AaHII mit δ -ACTX-Ar1 (vgl. Kapitel 4.10.7.1) sowie Lqh α IT mit ApB (vgl. Kapitel 4.10.3) und δ -ACTX-Ar1 (vgl. Kapitel 4.10.7.2) diese Aminosäure keine Rolle. Die wichtige funktionelle Bedeutung von Arg18 für die Aktivität des Skorpion-Toxins Lqh α IT am Insektenkanal wird auf das zusätzliche negative Potential im Bereich h in unmittelbarer Umgebung dieser Aminosäure zurückgeführt (vgl. Kapitel 4.10.3.1).

Auch die Aminosäure Arg62, für die keine Bedeutung bei chemischen Modifikationen gefunden wurde, spielt offensichtlich keine Rolle in Bezug auf die Toxizität für Säuger. Sie konnte bei der Überlagerung von AaHII mit LqqV nicht berücksichtigt werden. Den negativ geladenen Aminosäuren Asp8 und Asp9 wird gleichfalls keine große Bedeutung beigemessen, da sie nicht bei allen klassischen α -Skorpion-Toxinen gefunden werden. Ihre Funktion scheint analog zu den Seeanemonen-Toxinen in einer Stabilisierung wichtiger positiv geladener Aminosäuren wie Lys30 und Lys28 (AaHII) zu liegen. Eine zusätzliche Stabilisierung des Moleküls wäre grundsätzlich denkbar, allerdings sind die Skorpion-Toxine in sich stabiler als die Seeanemonen-Toxine.

Zur höheren Aktivität des klassischen α -Skorpion-Toxins AaHII gegenüber Säugern im Vergleich zu LqqV könnten mehrere Faktoren beitragen: Die Konformation des C-terminalen Bereichs besitzt möglicherweise einen sterischen Einfluss bei der Interaktion mit dem Säugerkanal. Diese Vermutung wird gestützt durch die höhere Affinität von Lqh α IT zum Säugerkanal nach Substitution der Aminosäure Arg64 durch Histidin [145], wodurch die Seitenkette um fast 180° gedreht [116] und der Raumbedarf verringert wurde. Weiterhin könnte die leicht veränderte Konformation im Bereich nach der α -Helix bei LqqV ebenfalls

einen sterischen Effekt auf die Bindung am Säugerkanal besitzen. Bei der Überlagerung von AaHII mit dem Seeanemonen-Toxin ApB konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich vermutlich in direktem Kontakt mit dem Natriumkanal steht (vgl. Kapitel 4.10.5.1).

Neben sterischen Effekten könnten bei einer direkten Interaktion von Lys30 und Arg56 bei AaHII mit dem Säugerkanal diese Aminosäuren in einer günstigeren Position liegen. Es wurde außerdem beim Vergleich von LqqV mit dem Seeanemonen-Toxin ApB keine äquivalente Aminosäure für die funktionell wichtige Aminosäure Lys48 (ApB) gefunden (vgl. Kapitel 4.10.5.2). Bei AaHII konnte diese Aminosäure gut mit Lys28 überlagert werden (vgl. Kapitel 4.10.5.1). In diesem Bereich findet man hierdurch zusätzlich Unterschiede im molekularen elektrostatischen Potential, denn bei LqqV liegt das Potential b räumlich leicht verschoben. Es kann zudem festgehalten werden, dass ein globales, stark ausgeprägtes positives Potential an sich nicht für eine hohe Aktivität entscheidend ist; stattdessen ist ein Potential in bestimmten Bereichen wichtig. So zeigt LqqV im Vergleich mit AaHII zwar ein sehr hohes Potential, dennoch ist AaHII das aktivere Polypeptid.

Für die Interaktion mit dem neuronalen Säugerkanal ergaben die Untersuchungen der klassischen α -Skorpion-Toxine AaHI-III und LqqV eine wichtige Funktion der positiven molekularen elektrostatischen Potentiale (s. Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) in den Bereichen i (AaHII: α -Aminogruppe/Lys2/Arg56), a (Lys30), b (Lys28) und c/d (Lys58/Lys62). Die Polypeptide AaHTL1 und AaHTL3 zeigen keine Aktivität am Natriumkanal [69]. Beim Sequenzvergleich (s. Bild 4.40) fällt auf, dass für Lys28, Lys30, Arg56, Lys58 und Arg18 von AaHII keine homologen Aminosäuren gefunden werden. Dadurch wird das positive Potential der Moleküle in den wichtigen Bereichen i (bei AaHII um Arg56), a (Lys30) und c/d (Lys58) deutlich reduziert. Zudem müsste analog zum 5-Aminosäure-Turn (Aminosäuren 8-12) von AaHII und LqqV bei AaHTL1 und AaHTL3 die Aminosäure Glu10 in der C-terminalen Region zu einem negativen Potential beitragen. Auch hierdurch wird die Vermutung gestützt, dass der C-terminale Bereich einschließlich des 5-Aminosäure-Turns sowie die Region um Lys30 der α -Skorpion-Toxine für die Aktivität eine wichtige Rolle spielen. Die Bedeutung der positiven molekularen elektrostatischen Potentiale bei Lqh α IT, AaHII und LqqV sowie die fehlende Aktivität von AaHTL1 und AaHTL3 weist auf eine elektrostatische Interaktion mit dem Spannungssensor IVS4 des Natriumkanals hin.

AaHII	(1)	VKDGYIVDDVNCTYFCGRNA-YCNEECTKLGESGYCQWASPYGNA	(45)
AaHTL1	(1)	VRDGYFVEPDNCVIYCMPSSVCDRGCCKHNGATSGTCKEFSKGGNV	(46)
AaHTL3	(1)	VRDGYFVEPDNCVVHCCMPSSVEMCDRGCCKHNGATSGSCKAFSKGGNV	(46)
AaHII	(46)	CYCYKLPDHVRTKGGP-RCH	(64)
AaHTL1	(47)	CWCKGLPDNAPIYDESKQCT	(66)
AaHTL3	(47)	CWCKGLPDNSPIYAESKQCT	(66)

Bild 4.40: Sequenzalignment des α -Skorpion-Toxins AaHII mit den untoxischen Polypeptiden AaHTL1 und AaHTL3. Bei AaHII sind positiv geladene Aminosäuren unterlegt, die zu den vermutlich wichtigen positiven elektrostatischen Potentialen des Toxins beitragen.

4.10.5 Vergleich der klassischen α -Skorpion-Toxine mit ApB

Im Folgenden sollte versucht werden, die klassischen α -Skorpion-Toxine AaHII und LqqV mit den wichtigen Bereichen des Seeanemonen-Toxins ApB zu überlagern. Hierdurch sollte das entwickelte Toxiphor-Modell für die Interaktion der Seeanemonen-Toxine mit dem Natriumkanal der Säuger bestätigt werden. Aufgrund der unterschiedlichen C-terminalen Konformation von AaHII und LqqV wurde erwartet, dass andere Aminosäuren von ApB mit den beiden klassischen α -Skorpion-Toxinen überlagert werden. Sofern hierbei funktionell wichtige Aminosäuren von ApB betroffen wären, könnte dies ein Hinweis auf partiell unterschiedliche Bindungsstellen von LqqV und AaHII sein.

Bei den beiden Überlagerungen wurden als Vororientierungen die Alignments ApB-Lqh α IT sowie Lqh α IT-AaHII verwendet. Der Aminosäure Lys30 und ihrer positiv geladenen Umgebung wurde außerdem bei AaHII bzw. LqqV eine wichtige Bedeutung für die Toxizität gegenüber Säugern beigemessen. Die Aminosäuren Asp7 und Asp9 wurden ebenfalls berücksichtigt, da sie bei beiden Toxingruppen offensichtlich positiv geladene Aminosäuren stabilisieren.

4.10.5.1 Überlagerung von AaHII mit ApB

Die Überlagerung des aktivsten klassischen α -Skorpion-Toxins AaHII mit dem Seeanemonen-Toxin ApB ist in Bild 4.41 dargestellt. Die funktionell wichtigen Aminosäuren Arg14, Lys48, Leu18, Trp33 und die α -Aminogruppe von ApB konnten gut durch äquivalente Bereiche von AaHII überlagert werden. Lys37 von ApB liegt im Bereich von Lys30 und Arg56 bei AaHII. Auch Arg18 (AaHII) und Lys49 (ApB) findet man nach der Überlagerung in ähnlicher Position, und

die negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 liegen vergleichbar zu Asp8 und Asp9 bei AaHII. Bei AaHII findet man neben der konservierten hydrophoben Oberfläche (CHS: Tyr5, Tyr35, Tyr42, Tyr47, Tyr49) eine zweite Region mit aromatischen Aminosäuren (vgl. Kapitel 4.9), so dass die hydrophoben Bereiche von ApB gut überlagert werden konnten. Neben dem funktionell wichtigen Trp33 von ApB, das vergleichbar zu Tyr21 bei AaHII liegt, wurde auch Leu18 zwischen Tyr5 und Tyr42 gefunden. Diese Aminosäuren wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in den Abbildungen nicht dargestellt. Lediglich den vermutlich funktionell wichtigen Aminosäuren Arg12 von ApB und Lys2 von AaHII konnten keine äquivalenten Aminosäuren des jeweils anderen Toxins zugeordnet werden.

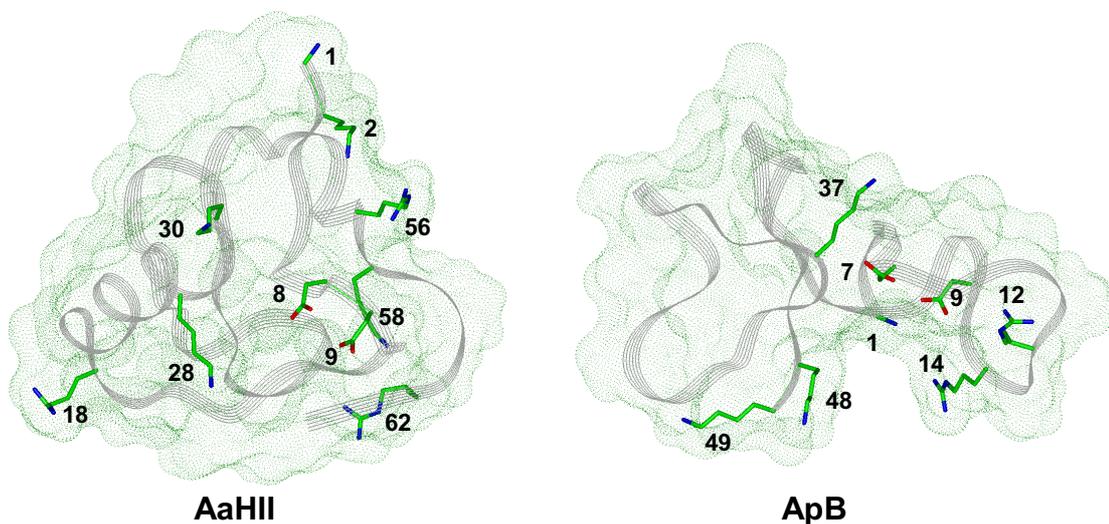


Bild 4.41: Bändermodelle der Toxine AaHII und ApB mit Connolly-Oberflächen. Die hydrophoben Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.25.

Tabelle 4.25: Überlagerung von AaHII mit ApB

AaHII	Lys58	Arg62	Lys30/Arg56	Lys28	Arg18	Asp8/9	Tyr5/Tyr42	Tyr21
ApB	α -NH ₂ ^a	Arg14	Lys37	Lys48	Lys49	Asp7/9	Leu18	Trp33

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Bei der Überlagerung der Toxine fallen zwei, in Bild 4.42 gekennzeichnete Bereiche auf, die sich im Proteinrückgrat besonders gut entsprechen. Hierzu gehört bei AaHII der vermutlich funktionell wichtige 5-Aminosäure-Turn [63], der mit der Anfangsregion des Loops I von ApB überlagert wurde. Dies ist zum einen interessant, da die Bereiche bei beiden Toxinen im Vergleich zum Gesamtmolekül eine gewisse Flexibilität besitzen, zum anderen wird vermutet,

dass bei den Seeanemonen-Toxinen dieser Region eine wichtige funktionelle Bedeutung zukommt (vgl. Kapitel 4.7). Auch die Konformation des Bereichs nach der α -Helix von AaHII entspricht dem Beginn des Loops bei ApB, der durch die Aminosäuren 36-44 gebildet wird. Dies könnte von Bedeutung sein, da sich beim Vergleich der α -Skorpion-Toxine mit den β -Skorpion-Toxinen, die an der Bindungsstelle 4 des Natriumkanals angreifen, in dieser Region konformationale Unterschiede zeigen (vgl. Kapitel 1.4.3). Außerdem war bei dem Vergleich der Seeanemonen-Toxine ApB, dem aktivsten Polypeptid am Säugerkanal, und ATX1a, das nicht am Säugerkanal binden kann, dieser Loop aufgrund seiner unterschiedlichen Konformation aufgefallen (vgl. Kapitel 4.8.3.3). Es wird vermutet, dass dieser Bereich durch sterische Effekte die Bindung am Säugerkanal beeinflussen kann. Aufgrund der guten Übereinstimmung in den beiden Regionen bei AaHII und ApB wird vermutet, dass dieser Bereich in unmittelbarem Kontakt zum Natriumkanal steht.

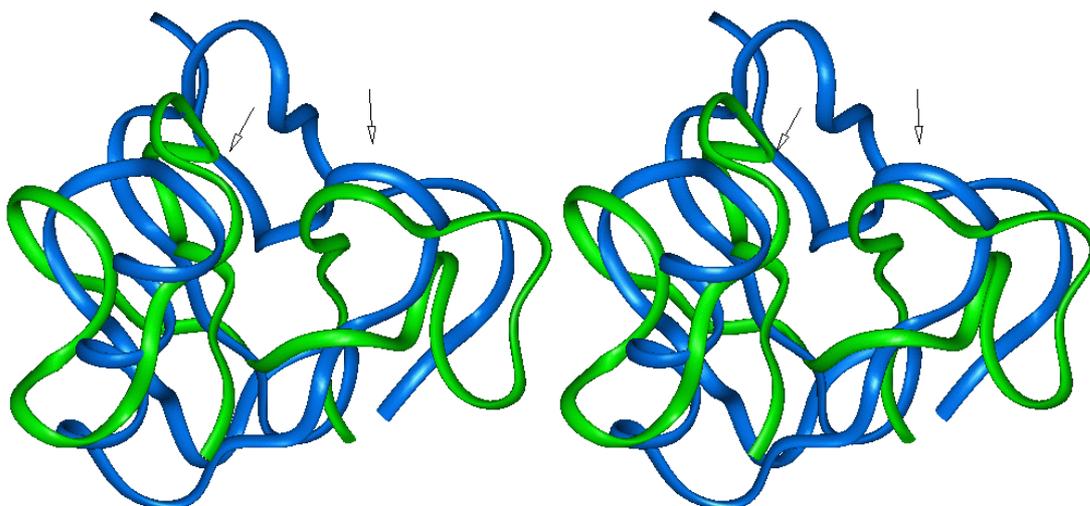


Bild 4.42: Stereoansicht von Bändermodellen der Toxine AaHII (*blau*) und ApB (*grün*). Durch Pfeile gekennzeichnet sind der 5-Aminosäure-Turn (Anfangsbereich des Loops I) und der Bereich nach der α -Helix (Loopanfang 36-44) bei AaHII (bei ApB).

Bei der Untersuchung der molekularen elektrostatischen Potentiale (ApB: Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f/ AaHII: Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) ergaben sich bei den Toxinen AaHII und ApB Übereinstimmungen in den positiven Bereichen a (ApB: Lys37), b (Lys48), d (Arg14/ α -Aminogruppe) und e (Lys49). Weiterhin kann dem negativen Potential f durch Asp7 und Asp9 bei ApB ein entsprechender Bereich bei AaHII durch Asp8 und Asp9 zugeordnet werden. Obwohl Arg12 von ApB nicht direkt durch Aminosäuren von AaHII überlagert werden konnte, findet man dennoch bei AaHII im Bereich c/d durch die Aminosäuren Lys58 und

Arg62 ein ausgeprägtes positives Potential. Lys2 trägt zusammen mit Arg56 bei AaHII zu einem positiven Potential im Bereich i bei. Auch hier kann das Fehlen von Lys2 (AaHII) bei ApB durch das Potential von Lys37 zum Teil kompensiert werden.

4.10.5.2 Überlagerung von LqqV mit ApB

Rogers et al. konnten durch Mutationsstudien im Loop IVS3-S4 des neuronalen Natriumkanals der Ratten wichtige Aminosäuren für die Bindung des Seeanemonen-Toxins ATXII bzw. des α -Skorpion-Toxins LqqV identifizieren [31]. Deshalb ist die Überlagerung von LqqV mit ApB, das kompetitiv zu ATXII an neuronalen Kanälen aus Rattenhirn bindet, von besonderem Interesse. Es sollte versucht werden, hieraus Rückschlüsse auf mögliche Interaktionspartner der Toxine mit dem Loop IVS3-S4 zu ziehen (vgl. Kapitel 5.3).

Auch bei diesem Vergleich wurde eine Vororientierung der Toxine entsprechend den bisherigen Überlagerungen vorgenommen. Zusätzlich wurden die negativ geladenen Aminosäuren Asp8 und Asp9 bei LqqV bzw. Asp7 und Asp9 bei ApB berücksichtigt, wodurch sich auch hier ein deutlich paralleler Verlauf der Rückgratatome beider Toxine im Bereich der Aminosäuren 4-10 (ApB) ergab. Das Alignment von LqqV mit ApB ist in Bild 4.43 dargestellt. Die funktionell wichtigen Bereiche von ApB um die α -Aminogruppe bzw. Arg14, Arg12, Asp9 sowie Leu18 und Trp33 konnten berücksichtigt werden. Zwischen Lys29 und Arg54 bei LqqV liegt Lys37 von ApB, und auch Arg18 nimmt eine mit Lys49 (ApB) vergleichbare Position ein. Im Gegensatz dazu kann die Aminosäure Lys48 bei ApB relativ schlecht mit Lys28 von LqqV überlagert werden. Vergleichbar zur Überlagerung von AaHII mit ApB findet man auch hier für Lys2 von LqqV keine äquivalente Aminosäure bei ApB.

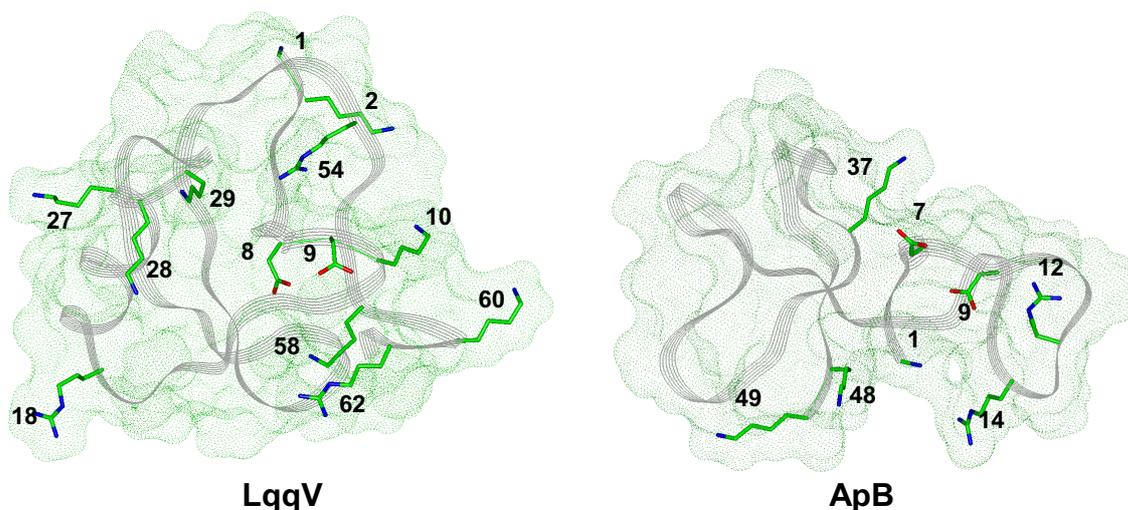


Bild 4.43: Bändermodelle der Toxine LqqV und ApB mit Connolly-Oberflächen. Die hydrophoben Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.26.

Tabelle 4.26: Überlagerung von LqqV mit ApB

LqqV	Lys58/Arg62	Lys10	Lys29/Arg54	Arg18	Asp8/9	Tyr5	Tyr21
ApB	α -NH ₂ ^a /Arg14	Arg12	Lys37	Lys49	Asp9	Leu18	Trp33

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Die molekularen elektrostatischen Potentiale der beiden Toxine (ApB: Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f/ LqqV: Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) zeigen deutliche Ähnlichkeiten, zumal bei beiden sehr ausgeprägte positive Potentiale zu finden sind. Dies betrifft bei ApB die Bereiche a (Lys37), c (Arg12), d (Arg14/ α -Aminogruppe) und e (Lys49). Ebenso liegt das negative Potential f durch Asp7/Asp9 vergleichbar zu dem durch Asp8/Asp9 bei LqqV. Das positive Potential b, das bei LqqV durch Lys58 und Arg62 verursacht wird, ist durch die fehlende direkte Überlagerung mit Lys48 von ApB leicht verschoben.

4.10.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Untersuchung der klassischen α -Skorpion- und Seeanemonen-Toxine konnte gezeigt werden, dass sich AaHII und ApB besonders gut in den Bereichen nach der α -Helix und im 5-Aminosäure-Turn von AaHII überlagern ließen. Es wird vermutet, dass diese Regionen der Seeanemonen- und α -Skorpion-Toxine in direkter Interaktion mit dem Säugerkanal steht. Gestützt wird diese Annahme durch strukturelle Unterschiede zwischen den α - und β -Skorpion-Toxinen sowie den Seeanemonen-Toxinen ApB und ATX1a, die sich in einem

Bereich ergeben haben, der der Region nach der α -Helix von AaHII entspricht. β -Skorpion-Toxine und auch ATXIa können dabei nicht mit der Bindungsstelle 3 des Säugerkanals interagieren. Weiterhin sind bei beiden Toxingruppen im Verhältnis zum Gesamtmolekül flexiblere Bereiche durch den 5-Aminosäure-Turn (Skorpion-Toxin) bzw. durch den Loop I (Seeanemonen-Toxin) beteiligt.

Beim Vergleich der Überlagerungen von ApB mit AaHII bzw. mit LqqV ergaben sich Unterschiede in Bezug auf die Aminosäuren Arg12 und Lys48 des Seeanemonen-Toxins. Für Arg12 von ApB konnte keine äquivalente Aminosäure bei AaHII gefunden werden, hingegen war eine gute Überlagerung mit Lys10 von LqqV möglich. Umgekehrt ergab sich eine gute räumliche Übereinstimmung von Lys48 bei ApB mit Lys28 von AaHII, aber nur eine schlechte Überlagerung mit Lys28 von LqqV. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass AaHII und LqqV zumindest partiell unterschiedliche Interaktionspartner am Natriumkanal besitzen. Die im Vergleich mit den Seeanemonen-Toxinen fehlende Wechselwirkung durch Arg12 bzw. Lys 48 bei den Skorpion-Toxinen könnte durch andere Aminosäuren kompensiert werden.

Die funktionell wichtige Aminosäure Lys37 von ApB, die vermutlich direkt mit dem Natriumkanal interagiert und maßgeblich zum positiven Potential a beiträgt, liegt bei den klassischen α -Skorpion-Toxinen zwischen Lys30 und Arg56 (AaHII). In diesem Bereich hatten sich entgegengesetzte Potentiale beim Vergleich der klassischen α -Skorpion-Toxine AaHII und LqqV mit dem α -Insektentoxin Lqh α IT ergeben. Auch bei der Untersuchung der Seeanemonen-Toxine ApB und ATXIa bzw. ATXIII wurde ein ähnliches Ergebnis gefunden. Da weder Lqh α IT noch ATXIa und ATXIII am Säugerkanal binden, scheint unter anderem das negative Potential dieser Toxine im Bereich Lys37 (ApB) bzw. Lys30/Arg56 (AaHII) die Interaktion mit dem Natriumkanal zu hindern.

Demnach konnte gezeigt werden, dass bei Skorpion- und Seeanemonen-Toxinen geladene und hydrophobe Aminosäuren in topologisch vergleichbarer Konformation vorliegen. Die funktionell wichtigen Aminosäuren von ApB konnten bis auf wenige Ausnahmen mit entsprechenden Aminosäuren der Skorpion-Toxine überlagert werden. In beiden Toxingruppen werden ausgeprägte positive elektrostatische Potentiale in einem Bereich gefunden, der dem Loop I der Seeanemonen-Toxine entspricht. Eine elektrostatische Interaktion mit dem Natriumkanal wäre demnach bei den Polypeptiden möglich. Das für die

Seeanemonen-Toxine entwickelte Toxiphor-Modell wird durch den Vergleich mit den Skorpion-Toxinen gestützt.

4.10.6 Untersuchung des β -Skorpion-Toxins Cn2

Das Polypeptid Cn2 gehört zur Gruppe der β -Skorpion-Toxine und interagiert mit der Bindungsstelle 4 des spannungsabhängigen Natriumkanals, wodurch das Schwellenpotential der Aktivierung hin zu einem niedrigeren Wert verschoben wird [63]. Beim Vergleich der Struktur von Cn2 mit denen der α -Toxine, fällt eine starke Ähnlichkeit auf, denn bei allen langkettigen Skorpion-Toxinen werden eine α -Helix, eine Betafaltblatt-Struktur mit 3 Strands sowie vier Disulfidbrücken gefunden. Strukturelle Unterschiede (s. Bild 4.44) ergeben sich vor allem im C-Terminus (D) sowie in den Bereichen vor (A) und nach (B) der α Helix. Zudem fehlt bei den β -Skorpion-Toxinen die β -hairpin-Struktur (C) der α -Toxine (AaHIII: Aminosäuren 38-44).

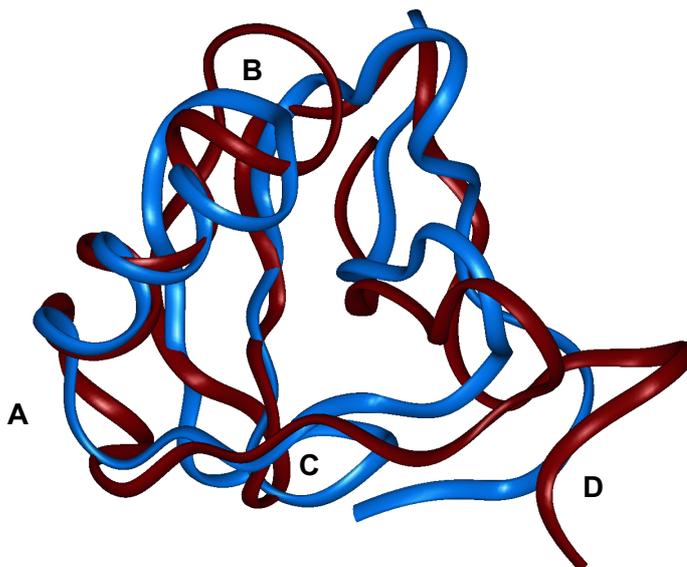


Bild 4.44: Bändermodelle des α -Skorpion-Toxins AaHIII (*blau*) und des β -Skorpion-Toxins Cn2 (*dunkelrot*). Gekennzeichnet (A-D) sind strukturell unterschiedliche Bereiche.

Da Cn2 neben den grundlegenden strukturellen Gemeinsamkeiten mit den α -Toxinen auch eine hohe Sequenzhomologie zu AaHIII (s. Bild 4.45) besitzt, war es von Interesse herauszufinden, welche Bereiche für die fehlende Interaktion mit der Bindungsstelle 3 entscheidend sein könnten. Da von AaHIII bisher nur sehr begrenzt Informationen über die Bedeutung einzelner Aminosäuren zur Verfügung stehen, wurde Cn2 mit dem gut untersuchten Seeanemonen-Toxin ApB überlagert.

```

AaHII (1) VKDGYIVDDVN-CTYFCGRNA---YCNEECTKL--KESSGYCQWASPYGNA (45)
Cn2 (1) KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYC-----YAFA (45)

AaHII (46) CYCYKLPDHVRTK-GPG-RCH (64)
Cn2 (46) CWCTHLYEQAIVWPLPNKRCS (66)

```

Bild 4.45: Sequenzalignment des α -Toxins AaHII mit dem β -Toxin Cn2

Die geladenen Aminosäuren Lys37, Lys48/Lys49, Arg12, Arg14 und Asp7 von ApB konnten gut mit Aminosäuren von Cn2 überlagert werden (s. Bild 4.46). Es war allerdings nicht möglich, zusätzlich Asp9, die N-terminale α -Aminogruppe sowie Leu18 von ApB abzudecken. Zwar besitzen die α -Aminogruppe und vor allem Leu18 eine Bedeutung für die Interaktion mit der Bindungsstelle 3 des Natriumkanals, doch sollte aufgrund einer möglichen Kompensation durch andere Kontakte ihr Fehlen nicht allein die Ursache für die drastisch anderen Eigenschaften von Cn2 sein. Zumal die Aminosäure Arg14 von ApB durch Arg64 von Cn2 überlagert wurde, wodurch vermutlich das Fehlen der α -Aminogruppe ausgeglichen werden könnte. Die hydrophoben Bereiche der Toxine liegen zudem in entsprechender Orientierung.

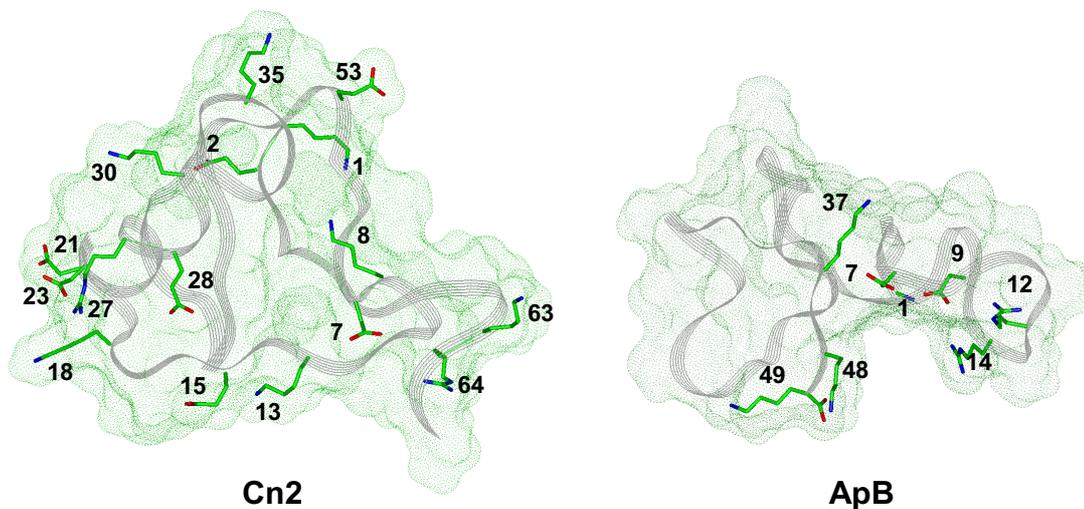
Bild 4.46: Bändermodelle des β -Skorpion-Toxins Cn2 und des Seeanemonen-Toxins ApB mit Connolly-Oberflächen. Hydrophobe Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.27.

Tabelle 4.27: Überlagerung von Cn2 mit ApB

Cn2	Lys63	Arg64	Lys8	Lys13	Asp7
ApB	Arg12	Arg14	Lys37	Lys48/49	Asp7

Im nächsten Schritt wurden die molekularen elektrostatischen Potentiale von Cn2 und ApB untersucht (ApB: Bild 4.17, Bild 4.18, S. 108f/ Cn2: Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f). Dabei ergaben sich Übereinstimmungen mit ApB in den wichtigen positiven Bereichen a (ApB: Lys37), c (Arg12) und d (Arg14/ α -Aminogruppe). Allerdings wurden auch deutliche Unterschiede gefunden, deren Ursache die im Vergleich zu AaHIII andere Verteilung der negativ geladenen Aminosäuren von Cn2 ist. Bei dem β -Skorpion-Toxin Cn2 konnte im Bereich von Lys48 bei ApB (b) ein ausgeprägtes negatives Potential, bedingt durch Glu28 und Glu15, festgestellt werden. Dabei ist vor allem Glu15 auffällig, denn diese Aminosäure tritt bei den klassischen α -Skorpion-Toxinen AaHIII und LqqV nicht auf. Hingegen wird bei dem α -Insektentoxin Lqh α IT, das nicht an dem neuronalen Säugerkanal bindet, in diesem Bereich ebenfalls ein durch Glu15 verursachtes negatives Potential gefunden. Bei dem β -Skorpion-Toxin Cn2 tritt weiterhin in unmittelbarer Nähe von Trp33 ein stark negatives Potential (h) auf, das sich über den Bereich um Trp23 bei ApB erstreckt. Es wird durch die beiden Asparaginsäuren Asp21 sowie Asp23 verursacht, welche ebenfalls nicht bei AaHIII und LqqV auftreten. Zusätzlich trägt Glu2 zu diesem Unterschied bei. Neben der unterschiedlichen Verteilung der negativen Aminosäuren im Vergleich zu AaHIII ist auffallend, dass für die in Bezug auf die Interaktion mit dem Säugerkanal vermutlich wichtigen Aminosäuren Lys28/Lys30 keine positiv geladenen Aminosäuren in vergleichbarer Position bei Cn2 gefunden werden können.

4.10.6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aufgrund der Untersuchungen wird vermutet, dass bei dem β -Skorpion-Toxin Cn2 neben den strukturellen Unterschieden zu den α -Toxinen vor allem die elektrostatischen Eigenschaften eine Bedeutung für die unterschiedlichen Wirkprofile der Skorpion-Toxine besitzen. Hierzu sollten die negativen molekularen elektrostatischen Potentiale b und h von Cn2 beitragen, denn sie liegen in Bereichen, die vermutlich für die Interaktion mit der Bindungsstelle 3 des Säugerkanals wichtig sind. Auch bei dem α -Insektentoxin Lqh α IT, das AaHIII nicht von der Bindungsstelle 3 der Säugerkanals verdrängen kann, wurden in ähnlichen Regionen negative Potentiale gefunden. Zusätzlich könnten fehlende direkte Wechselwirkungspartner wie Leu 18 (ApB) eine Rolle spielen.

4.10.7 Vergleich der Atracotoxine mit den Skorpion-Toxinen

Das Trichternetzspinnen-Toxin δ -ACTX-Ar1 kann kompetitiv sowohl das klassische α -Skorpion-Toxin AaHII an neuronalen Rattenkanälen als auch das α -Insektentoxin Lqh α IT an neuronalen Kanälen der Kakerlaken verdrängen [27]. Durch den Vergleich von δ -ACTX-Ar1 mit AaHII sollte zunächst das Toxiphor-Modell für die Interaktion mit dem Säugerkanal bestätigt werden. Außerdem sollten sich auch hier aus den Untersuchungen von δ -ACTX-Ar1, AaHII und Lqh α IT Hinweise auf den Wirkmechanismus der Toxine ergeben, denn alle können gleichermaßen den Inaktivierungsprozess des Natriumkanals inhibieren.

Für die folgenden Überlagerungen wurde ein Konformer von δ -ACTX-Ar1 verwendet, das aus einer MD-Simulation stammt, die mit einem *simulated annealing*-Protokoll¹ (vgl. Anhang F4) und NMR-Restraints (PDB: 1qdp) durchgeführt wurde. Da sich diese Struktur sinnvoll mit den Skorpion-Toxinen AaHII und Lqh α IT überlagern ließ, wurde hier auf eine erneute Berechnung nach dem für die anderen Polypeptide verwendeten Simulations-Protokoll (vgl. Kapitel 4.2) verzichtet.

4.10.7.1 Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit AaHII

Bei den Untersuchungen des Seeanemonen-Toxins ApB und der α -Skorpion-Toxine AaHII und LqqV waren sowohl positive als auch negative Bereiche gut überlagerbar. Deshalb wurden für den Vergleich des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 mit AaHII die Regionen um Asp8 bzw. Asp9 sowie die vermutlich für die Interaktion mit dem Natriumkanal der Säuger wichtigen Aminosäuren Lys2, Arg56, Lys30, Lys28 und Lys58 von AaHII berücksichtigt.

Die Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit AaHII ist in Bild 4.47 dargestellt. Dabei konnten die Aminosäuren Lys28, Arg56, Arg62 und Asp9 von AaHII gut überlagert werden. Außerdem wurden bei δ -ACTX-Ar1 Lys3, Lys19 und Glu12 in übereinstimmenden Bereichen mit Lys58, Lys30 und Asp8 von AaHII gefunden. Die Aminosäure Lys2 von AaHII konnte nicht überlagert werden. Doch liegt bei dem Skorpion-Toxin Lys2 in unmittelbarer Umgebung von Arg56 und Lys30.

¹ Bei dem *simulated annealing*-Protokoll wurde wiederholt die Temperatur der MD-Simulation kurzzeitig (2 ps) auf 600 K aufgeheizt, anschließend wurde langsam auf 310 K abgekühlt (10 ps). Jeweils der letzte *frame* vor dem erneuten Aufheizen wurde für weitere Untersuchungen (NMRCORE [98], NMRCLUST [97], PROCHECK [121]) verwendet.

Diesen beiden Aminosäuren konnten äquivalente Aminosäuren bei δ -ACTX-Ar1 zugeordnet werden, so dass hierdurch eine Kompensation erfolgen könnte. Auch die Aminosäure Arg18 (AaHII) konnte nicht überlagert werden. Sie spielt aber vermutlich für die Aktivität der klassischen α -Skorpion-Toxine keine Rolle (vgl. Kapitel 4.10.4.4).

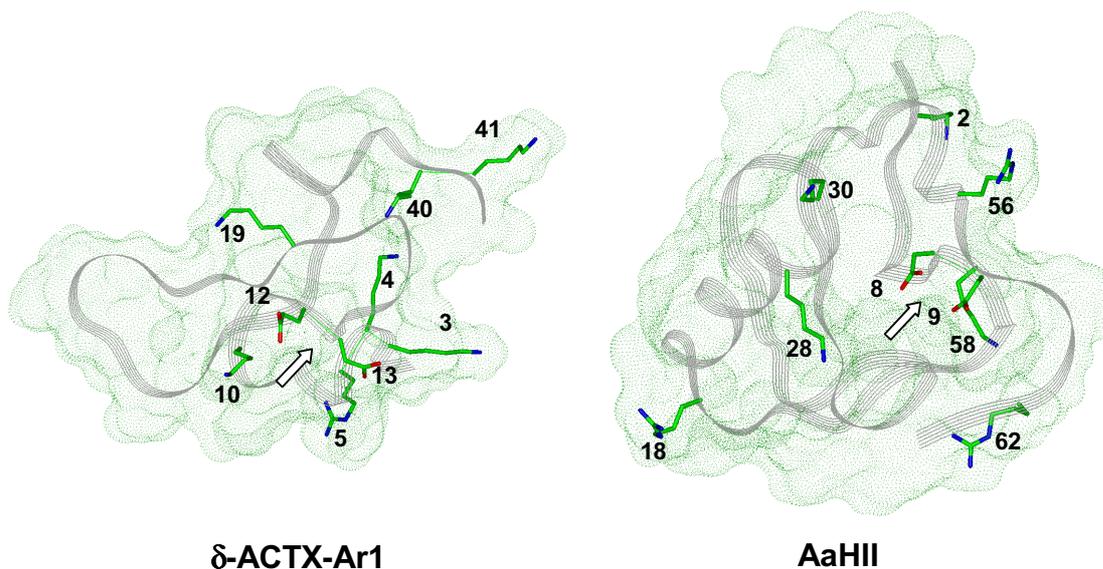


Bild 4.47: Bändermodelle des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 und des α -Skorpion-Toxins AaHII mit Connolly-Oberflächen. Durch Pfeile gekennzeichnet sind die flexibleren Bereiche der Polypeptide. Hydrophobe Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.28.

Tabelle 4.28: Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit AaHII

δ-ACTX-Ar1	Lys10	Lys19	Lys40	Lys3	Arg5	Glu12	Asp13
AaHII	Lys28	Lys30	Arg56	Lys58	Arg62	Asp8	Asp9

Die hydrophoben Aminosäuren waren im Einzelnen relativ schlecht überlagerbar. Dies könnte mit der unterschiedlichen Molekülgröße der beiden Toxine zusammenhängen (42 bzw. 64 Aminosäuren). Dispersions-Wechselwirkungen sind im Vergleich zu elektrostatischen Wechselwirkungen weniger gerichtet, so dass das Auftreten mehrerer hydrophober Aminosäuren in vergleichbarer Position für die Bindung ausreichen müsste. Eine entsprechende Orientierung des lipophilen Potentials ist bei den Toxinen gegeben (s. Bild 4.28, S. 127).

Bei der Überlagerung wurden außerdem die flexiblen Bereiche der beiden Polypeptide in vergleichbarer Position angeordnet, denn δ -ACTX-Ar1 zeigt vor allem im Loop 8-14 eine höhere Flexibilität (s. Bild 4.47). Dieser Loop wurde mit dem

5-Aminosäure-Turn (Aminosäuren 8-12) von AaHII überlagert, der ebenfalls eine flexiblere Region im Skorpion-Toxin darstellt.

Bei der Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials (Bild 4.31, S. 135; Bild 4.32, S. 136) fällt ein sehr ausgeprägtes globales, positives Potential bei δ -ACTX-Ar1 auf. Im Vergleich mit AaHII findet man gute Übereinstimmungen in den Bereichen i (AaHII: α -Aminogruppe/Lys2/Arg56), a (Lys30), b (Lys28), c/d (Lys58/Arg62) sowie f (Asp8, Asp9). Auch hier wäre eine elektrostatische Interaktion mit den positiven Ladungen im IVS4-Segments des Natriumkanals möglich, durch die der Inaktivierungsprozess gehemmt werden könnte.

4.10.7.2 Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 und Lqh α IT

Beim Vergleich von δ -ACTX-Ar1 mit dem α -Insektentoxin Lqh α IT konnten die Aminosäuren Lys8, Lys41, Lys62, Arg64, Tyr14 und Tyr35 von Lqh α IT überlagert werden (s. Bild 4.48). Weiterhin ergaben sich Übereinstimmungen in den Bereichen um die α -Aminogruppe/Lys3/Lys4 und Trp7 von δ -ACTX-Ar1 mit Arg58 und Trp38/Tyr42 von Lqh α IT.

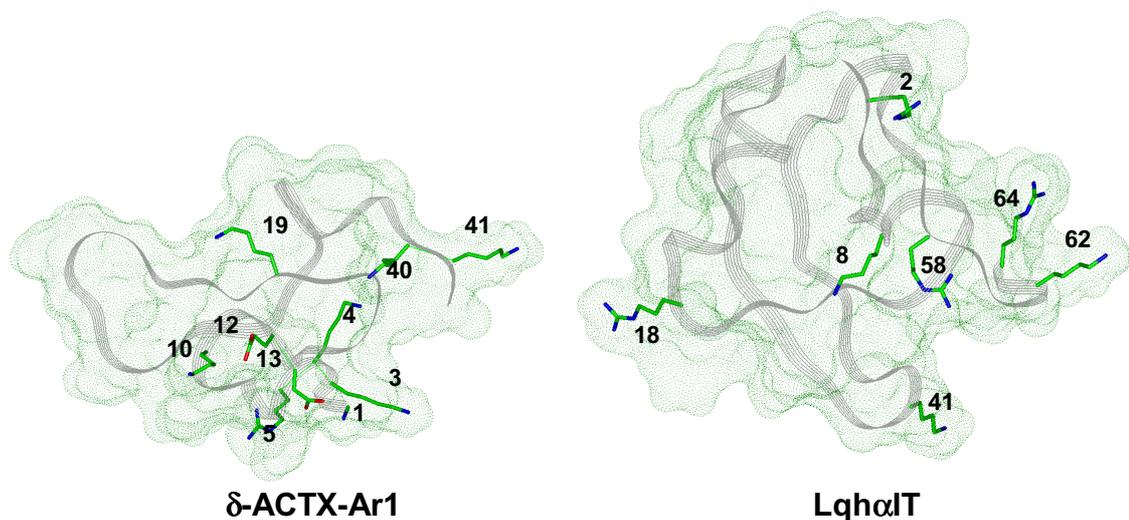


Bild 4.48: Bändermodelle der Toxine δ -ACTX-Ar1 und Lqh α IT mit Connolly-Oberflächen. Die hydrophoben Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.29.

Tabelle 4.29: Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit Lqh α IT

δ-ACTX-Ar1	Lys10	Arg5	α -NH ₂ ^a /Lys3/Lys4	Lys41	Lys40	Tyr22	Tyr25	Trp7
LqhαIT	Lys8	Lys41	Arg58	Lys62	Arg64	Tyr14	Tyr35	Trp38/Tyr42

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Die Aminosäuren Lys2 und Arg18 von Lqh α IT konnten nicht überlagert werden. Da δ -ACTX-Ar1 ein stark ausgeprägtes positives molekulares elektrostatisches Potential (Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) zeigt, wäre es denkbar, dass auch hier Arg18, das vermutlich bei Lqh α IT das negative Potential durch Glu15 und Asp19 kompensiert, keine Rolle spielt (vgl. Kapitel 4.10.3). Bei der weiteren Untersuchung des molekularen elektrostatischen Potentials ergaben sich übereinstimmende positive Potentiale in den bei Lqh α IT wichtigen Bereichen b (Lqh α IT: Lys8), c (Lys58/Lys62/Arg64) und d (Lys41).

4.10.7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Überlagerungen des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 mit den Skorpion-Toxinen AaHII und Lqh α IT haben gezeigt, dass auch bei δ -ACTX-Ar1 geladene Aminosäuren in topologisch vergleichbaren Positionen gefunden werden. Diese Aminosäuren könnten zusammen mit Übereinstimmungen im lipophilen und elektrostatischen Potential der Toxine die kompetitive Bindung von δ -ACTX-Ar1 am Säuger- (AaHII) und Insektenkanal (Lqh α IT) erklären. Interessant ist außerdem, dass bei δ -ACTX-Ar1 der flexible Loop, bestehend aus den Aminosäuren 8-14, mit dem 5-Aminosäure-Turn der Skorpion-Toxine überlagert wurde. Dieser Bereich zeigt auch bei AaHII und Lqh α IT eine im Verhältnis zum Gesamtmolekül höhere Flexibilität. Bei dem Trichternetzspinnen-Toxin konnte weiterhin ein sehr stark ausgeprägtes positives molekulares elektrostatisches Potential gefunden werden, das den vermutlich wichtigen positiven Bereichen sowohl bei AaHII als auch bei Lqh α IT entspricht. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch bei den Trichternetzspinnen-Toxinen eine elektrostatische Interaktion mit dem Spannungssensor IVS4 des Natriumkanals möglich wäre.

Für die Aminosäuren Lys28, Lys30, Arg56, Lys58, Arg62, Asp8 und Asp9 von AaHII konnten bei δ -ACTX-Ar1 äquivalente Bereiche gefunden werden. Diesen Aminosäuren wird aufgrund der Überlagerung von AaHII mit ApB eine wichtige Bedeutung bei der Interaktion der Toxine mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger beigemessen. Zusammen mit den ähnlichen elektrostatischen und lipophilen Potentialen kann demnach das für die Seeanemonen-Toxine entwickelte Toxiphor-Modell auch bei dem Trichternetzspinnen-Toxin δ -ACTX-Ar1 wiedergefunden werden. Die Aminosäure Arg18 wurde weder bei AaHII noch bei Lqh α IT durch äquivalente Bereiche von δ -ACTX-Ar1 überlagert. Auch dies

spricht für eine geringe Bedeutung von Arg18 bei einer direkten Interaktion der Toxine mit dem Natriumkanal.

Das Trichternetzspinnen-Toxin δ -ACTX-Hv1b ist im Vergleich zu δ -ACTX-Ar1 und δ -ACTX-HV1a schwächer toxisch für Säuger und zeigt außerdem keine Aktivität gegenüber Insekten. In der Sequenz von δ -ACTX-Hv1b, die in Bild 4.49 dargestellt ist, zeigen sich bei den geladenen Aminosäuren Unterschiede durch Ser4, Asp5 und Asn41.

```

 $\delta$ -ACTX-Ar1      (1)  CAKKRNWCGK NEDCCCPMKC IYAWYNQQGS CQTTITGLFK KC (42)
 $\delta$ -ACTX-Hv1a    (1)  CAKKRNWCGK TEDCCCPMKC VYAWYNEQGS CQSTISALWK KC (42)
 $\delta$ -ACTX-Hv1b    (1)  CSRSDGWCGK TEDCCCPMKC IKAWYKQNGN CQNTISAIWK NC (42)
  
```

Bild 4.49: Sequenzen der Trichternetzspinnen-Toxine

Bei der Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit AaHII liegen die relativ flexiblen Aminosäuren Lys40 und Lys41 im Bereich der wichtigen Aminosäuren Lys2 und Arg56 von AaHII. Bei δ -ACTX-Hv1b ist das positive Potential in diesem vermutlich wichtigen Bereich (i) schwächer ausgeprägt, da Lys41 durch Asn41 substituiert ist. Die negativ geladene Aminosäure Asp5 würde zudem bei δ -ACTX-Hv1b im Bereich von Arg62 bei AaHII liegen. Zwar scheint Arg62 für die Aktivität von AaHII am Säugerkanal keine wichtige Rolle zu spielen, doch könnte sich eine negative Ladung in dieser Region störend bemerkbar machen. Durch Ser4 wird das positive Potential (c/d) im Vergleich zu δ -ACTX-Ar1 (Lys4) zusätzlich verringert. Es wird vermutet, dass dieser Bereich bei AaHII in der Toxin-Kanal-Bindungsregion liegt und das positive Potential durch Lys58 und Arg62 eine Rolle für die Hemmung der Inaktivierung spielt. Die Substitutionen durch Ser4, Asp5 und Asn41 könnten so eine mögliche Erklärung für die geringere Aktivität von δ -ACTX-Hv1b gegenüber Säugern sein.

Beim Vergleich von δ -ACTX-Ar1 mit Lqh α IT liegen die Aminosäuren Lys4, Arg5 bzw. Lys41 äquivalent zu Arg58, Lys41 bzw. Lys62 bei Lqh α IT. Durch Ser4, Asp5 und Asn41 bei δ -ACTX-Hv1b, das keine Aktivität gegenüber Insekten besitzt, zeigen sich bei diesem Toxin in den vermutlich wichtigen Bereichen von Lqh α IT deutlich andere Eigenschaften. Dabei sind nicht nur mögliche direkte Interaktionen mit dem Natriumkanal betroffen, sondern auch das stark reduzierte positive molekulare elektrostatische Potential von δ -ACTX-Hv1b könnte eine Erklärung für die fehlende Toxizität gegenüber Insekten sein. Dabei dürfte die negative Ladung von Asp5 in einem Bereich, in dem normalerweise

ein positives Potential für die Bindung an den Insektenkanal wichtig ist, von besonderer Bedeutung sein.

4.10.8 Strukturüberlagerungen mit dem Programm FAME

Derzeit ist wenig darüber bekannt, welche Aminosäuren der Toxine AaHII und δ -ACTX-Ar1 für die Interaktion mit dem Natriumkanal wichtig sind. Außerdem unterscheiden sich die beiden Polypeptide in ihrer Molekülgröße relativ stark (64/ 42 Aminosäuren), so dass die Überlagerung zusätzlich erschwert wurde.

Das Programm FAME [113] ermöglicht die Optimierung der Überlagerung unterschiedlicher Moleküle auf der Basis eines Ähnlichkeitsindex. Insofern wurden zur Überprüfung der manuell durchgeführten Überlagerungen Optimierungen mit FAME für AaHII und ApB sowie AaHII und δ -ACTX-Ar1 durchgeführt. Hierbei sollten die bisherigen Ergebnisse durch Alignments mit einem möglichst hohen Hodgkin Index und durch ein häufiges Auftreten bestätigt werden.

4.10.8.1 Durchführung

Bei den Berechnungen des Hodgkin Indexes H wurden als molekulare Eigenschaften das elektrostatische Potential und das Überlappungsvolumen berücksichtigt (Eingabe s. Anhang F5). Da die elektrostatischen Eigenschaften bei den Toxinen vermutlich eine wichtige Rolle spielen, wurde eine Wichtung der Indices H^{elec} (Faktor 0,6) und H^{steric} (Faktor 0,4) zugunsten der Elektrostatik vorgenommen. Das Coulomb-Potential der Moleküle wurde entsprechend [152] über zwei Gaußfunktionen beschrieben. Für den Protonierungszustand der ionisierbaren Aminosäuren wurde ein physiologischer pH-Wert von 7,4 berücksichtigt (vgl. Kapitel 4.2.3). Die Partialladungen der Atome entsprachen den Parametern des *Amber*-Kraftfeldes [153]. Bei dem Toxin AaHII standen keine Werte für den amidierten C-Terminus (His64) zur Verfügung, daher wurden für die Atome der Amidgruppe die Partialladungen entsprechend der endständigen Gruppe von Asn bzw. Gln gesetzt. Allerdings mussten zu den Ladungen der fünf Atome jeweils 0,0172 Einheiten hinzuaddiert werden, damit die Aminosäure His64 nach außen wieder neutral geladen war (s. Bild 4.50).

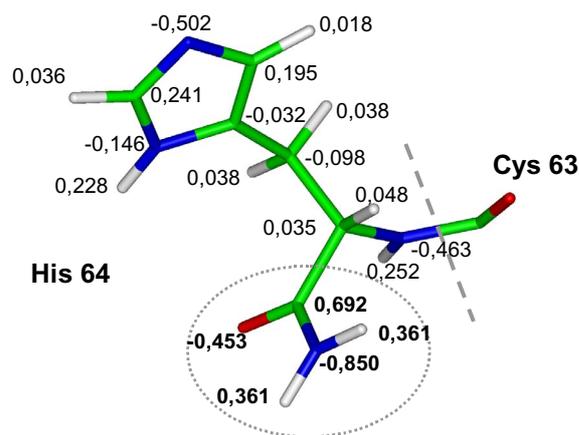


Bild 4.50: Partialladungen für das amidierte Histidin 64 von AaHII

Es wurden für jede Überlagerung von zwei Toxinen 100 Optimierungen durchgeführt, bei denen das Programm von verschiedenen, zufällig eingestellten Positionierungen der beiden Moleküle ausging. Bei den folgenden Optimierungen waren Translations- und Rotationsbewegungen erlaubt.

Als Bewertungskriterium für die Alignments wurde zunächst die Übereinstimmung der lipophilen Bereiche der Toxine betrachtet (vgl. Kapitel 4.9). Außerdem wurde eine relativ weitreichende Überlappung der Volumina erwartet, da die Polypeptide an einer gemeinsamen Bindungsstelle angreifen. Bei der Überlagerung von AaHII und ApB wurde zusätzlich darauf geachtet, dass die bekannten wichtigen Aminosäuren der Toxine überlagert sind.

4.10.8.2 Überlagerung von AaHII und ApB

Bei den Überlagerungen wurden Berechnungen für verschiedene Konformationen von AaHII und ApB durchgeführt. Bei ApB war dies ein repräsentativer Vertreter der NMR-Konformationen (Konformation 7, PDB: 1apf) sowie ein *frame* aus einer freien MD-Simulation (vgl. Kapitel 4.3). Für AaHII wurde ebenfalls eine Konformation aus einer Simulation sowie die minimierte Kristallstruktur (1aho) verwendet. Es wurden entsprechend vier verschiedene Berechnungen mit jeweils 100 Optimierungen für AaHII und ApB durchgeführt.

Überlagerungen mit der Kristallstruktur von AaHII

Beim Vergleich der MD-Konformation von ApB mit der minimierten Kristallstruktur von AaHII ergaben sich ausgehend von 100 Optimierungen 23 Alignments mit Hodgkin Indices H zwischen 0,52441 und 0,29400. Für die Überlagerung der NMR-Konformation von ApB mit AaHII wurden 15 Alignments mit Hodgkin Indices zwischen 0,57386 und 0,40059 gefunden. Beide Konformationen von

ApB ergaben dabei keine sinnvolle Überlagerung auf die Kristallstruktur. Dies lag sehr häufig an einer schlechten Übereinstimmung der lipophilen Bereiche der beiden Toxine. Weiterhin wurden geladene, funktionell wichtige Aminosäuren von ApB mit entgegengesetzt geladenen Aminosäuren überlagert, oder es wurden keine äquivalenten Bereiche bei AaHII gefunden.

Überlagerung der MD-Konformation von AaHII mit der NMR-Konformation von ApB

Bei der Untersuchung der MD-Konformation von AaHII und der NMR-Konformation von ApB ergaben sich 13 Alignments, deren Hodgkin Indices H zwischen 0,60018 und 0,44698 lagen. Allerdings waren lediglich bei der ersten Überlagerung, die mit einer Häufigkeit von 32% gefunden wurde, die lipophilen Eigenschaften der Moleküle ähnlich. Dabei wurden aber Glu32 und Asp3 von AaHII im Bereich des Loops I von ApB gefunden. Außerdem lagen Asp8 und Asp9 von AaHII in der Nähe von Lys48 von ApB. Da vermutlich in beiden Bereichen ein positives Potential eine wichtige Rolle spielt, wurde diese Überlagerung nicht weiter berücksichtigt.

Überlagerung der MD-Konformationen von AaHII und ApB

Bei der Untersuchung der MD-Konformationen beider Toxine ergaben sich Hodgkin Indices H für die 17 Alignments zwischen 0,58666 und 0,49287 (s. Tabelle 4.30). Dabei wurden in den ersten vier Überlagerungen, deren Indices H zwischen 0,58666 und 0,57418 lagen und die zusammen mit einer Häufigkeit von 47% auftraten, keine Übereinstimmung der lipophilen Eigenschaften von ApB und AaHII gefunden.

Tabelle 4.30: Überlagerungen von AaHIII und ApB^a

Alignment	Häufigkeit [%]	H	H^{elec}	H^{steric}
1	12	0,58666	0,62769	0,52510
2	7	0,58606	0,63125	0,51827
3	15	0,58538	0,63646	0,50876
4	13	0,57418	0,62519	0,49766
5	6	0,56295	0,60181	0,50466
6	12	0,56277	0,61124	0,49007
7	6	0,56003	0,59583	0,50632
8	4	0,55968	0,59498	0,50674
9	6	0,55607	0,58716	0,50943
10	4	0,54820	0,56566	0,52201
11	1	0,54726	0,58412	0,49196
12	4	0,54381	0,58901	0,47600
13	4	0,53658	0,58370	0,46590
14	2	0,52877	0,58395	0,44600
15	2	0,52627	0,60497	0,40823
16	1	0,50466	0,50300	0,50716
17	1	0,49287	0,53562	0,42875

^a angegeben sind der jeweilige Hodgkin Index H für ein Alignment und die Indices für das elektrostatische Potential H^{elec} und das Überlappungsvolumen H^{steric}

In den ähnlichen Alignments 5 und 6 ($H = 0,56295$ und $0,56277$), die mit einer Häufigkeit von zusammen 18% auftraten, wurde eine gute Überlagerung der lipophilen Eigenschaften gefunden. Außerdem konnten wichtige Aminosäuren von ApB durch Bereiche von AaHIII abgedeckt werden. Dies betrifft die α -Aminogruppe bzw. Arg14, Lys48, Lys49, Asp9, Trp33 und Leu18 von ApB (s. Bild 4.51). Die ebenfalls funktionell wichtige Aminosäure Lys37 von ApB wird zwischen Lys2, Lys30 und Lys50 bei AaHIII gefunden. Diese Überlagerung stimmt weitgehend mit der manuell durchgeführten überein (vgl. Bild 4.41, S. 153). Bei der Superpositionierung der Polypeptide AaHIII und ApB aus dem manuell und durch das Programm FAME durchgeführte Alignment auf die Konformation von ApB ergibt sich für AaHIII eine nur leicht versetzte Anordnung. In Bild 4.52 ist das Skorpion-Toxin AaHIII, das aus der manuellen bzw. aus der durch FAME durchgeführten Überlagerung stammt, entsprechend dargestellt. Beide ApB-Konformere, die übereinander liegen, sind nicht abgebildet.

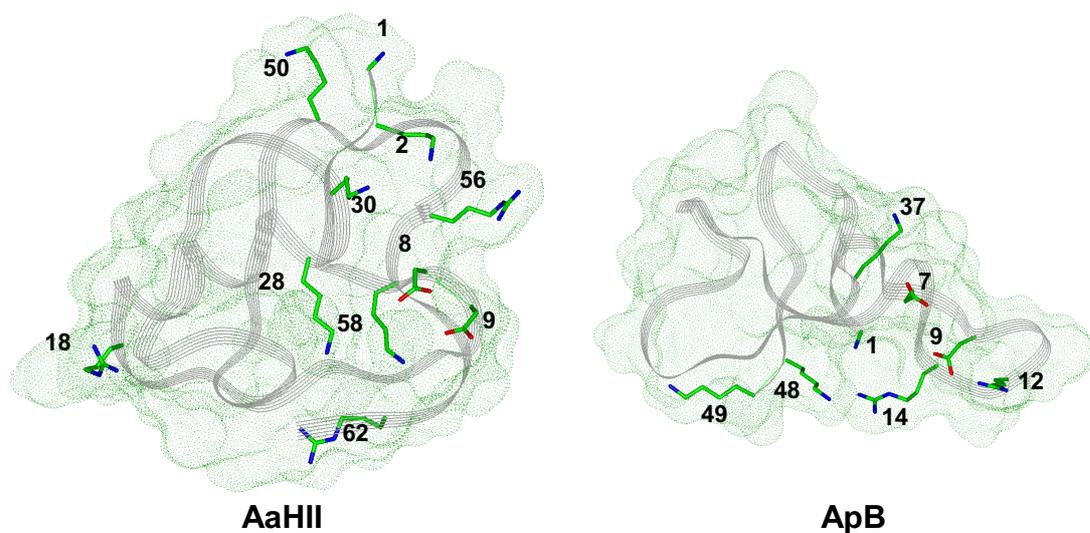


Bild 4.51: Bändermodelle des α -Skorpion-Toxins AaHII und des Seeanemonen-Toxins ApB mit Connolly-Oberflächen. Die Orientierung entspricht dem Alignment 5 (s. Tabelle 4.30). Hydrophobe Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.31.

Tabelle 4.31: Überlagerung von AaHII mit ApB

AaHII	Arg62	Lys2/Lys30/(Lys50)	Lys28	Arg18	Asp8/9	Tyr42	Tyr21
ApB	α -NH ₂ ^a /Arg14	Lys37	Lys48	Lys49	Asp9	Leu18	Trp33

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

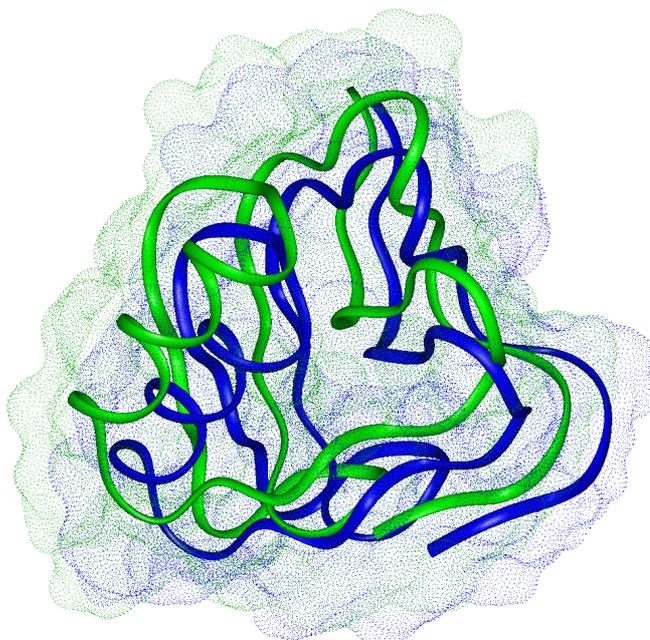


Bild 4.52: Bändermodelle von AaHII mit Connolly-Oberflächen. Überlagert wurden die Toxine AaHII und ApB aus dem manuell durchgeführten Alignment (vgl. Kapitel 4.10.5.1) und aus dem Alignment 5 (s. Tabelle 4.30) auf die Konformation von ApB (nicht dargestellt).

Die weiteren Alignments ergaben im Vergleich zu diesen Ergebnissen schlechtere Überlagerungen. Dabei zeigten vor allem die lipophilen Eigenschaften bei den Alignments 11-17 wenig Übereinstimmung.

Generell wurde ein höherer Ähnlichkeitsindex für das elektrostatische Potential H^{elec} bei den durchgeführten Überlagerungen der beiden Toxine im Vergleich zu H^{steric} gefunden. Der Index H^{elec} lag für die Alignments 1-6 bei Werten $> 0,6$. Der niedrige Index H^{steric} für das Überlappungsvolumen wird auf die unterschiedliche Molekülgröße (49/ 64 Aminosäuren) der Toxine zurückgeführt.

4.10.8.3 Überlagerung von AaIII und δ -ACTX-Ar1

Aufgrund der Untersuchungen von AaIII und ApB, bei denen sich relativ schlechte Überlagerungen bei der Verwendung der Kristallstruktur des Skorpion-Toxins ergeben haben, wurde hier auf den Vergleich dieser Struktur mit δ -ACTX-Ar1 verzichtet. Daher wurde die MD-Konformation von AaIII mit einer Konformation aus der mit Restraints durchgeführten Simulation von δ -ACTX-Ar1 überlagert.

Überlagerung von MD-Konformationen der Toxine AaIII und δ -ACTX-Ar1

Die Hodgkin Indices H der 19 Alignments lagen zwischen 0,50765 und 0,44777. In den ersten fünf Überlagerungen, die Indices H von 0,50765 bis 0,49414 ergaben, konnte nur eine geringe Übereinstimmung der lipophilen Eigenschaften festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine schlechte Überlappung der beiden Moleküle in den Überlagerungen 1, 2 und 4 gefunden. Der Wert für H^{steric} liegt entsprechend für diese Alignments mit 0,41873/ 0,42251 und 0,43662 relativ niedrig.

Tabelle 4.32: Überlagerungen von AaHII und δ -ACTX-Ar1^a

Alignment	Häufigkeit [%]	H	H^{elec}	H^{steric}
1	18	0,50765	0,56694	0,41873
2	32	0,50162	0,55436	0,42251
3	5	0,49874	0,52716	0,45612
4	3	0,49414	0,53249	0,43662
5	1	0,48848	0,51034	0,45569
6	1	0,48685	0,53345	0,41696
7	10	0,48610	0,48254	0,49144
8	5	0,48175	0,49912	0,45568
9	2	0,47812	0,53695	0,38988
10	1	0,47705	0,52247	0,40892
11	3	0,46686	0,56039	0,32656
12	7	0,46658	0,46079	0,47527
13	1	0,46574	0,52615	0,37514
14	2	0,46558	0,54238	0,35038
15	4	0,46441	0,44836	0,48848
16	1	0,46205	0,46746	0,45392
17	1	0,45416	0,44825	0,46302
18	1	0,45199	0,49458	0,38809
19	1	0,44777	0,48995	0,38451

^a angegeben sind der jeweilige Hodgkin Index H für ein Alignment und die Indices für das elektrostatische Potential H^{elec} und das Überlappungsvolumen H^{steric}

Bei Alignment 6 stimmen die lipophilen Eigenschaften der Toxine gut überein, allerdings werden die Aminosäuren Arg56, Asp7 und Asp9 von AaHII nicht abgedeckt. Zudem wird das Alignment lediglich einmal bei den Optimierungen gefunden. Es zeigt aber im C- und N-terminalen Bereich von AaHII Übereinstimmungen mit den Überlagerungen 7 und 8, die beide sehr ähnlich sind und deutlich bessere Ergebnisse liefern.

Bei den Alignments 7 bzw. 8 lag der Hodgkin Index H bei 0,48610 bzw. 0,48175 und die Häufigkeiten bei 10% bzw. 5%. Die Überlagerung der beiden Moleküle ist in Bild 4.53 dargestellt. Die Aminosäuren Arg62, Lys28, Lys2, Asp8 und Tyr21 von AaHII konnten berücksichtigt werden. Außerdem lag Lys40 von δ -ACTX-Ar1 im Einflussbereich von Arg56 (AaHII), die α -Aminogruppe und Lys3 entsprachen Lys58 bei AaHII. Trp7 von δ -ACTX-Ar1 wurde zwar zwischen Phe15 und Tyr14 bei AaHII gefunden, doch ist auch hier, wie bei der manuell

durchgeführten Untersuchung, die Überlagerung der lipophilen Aminosäuren im Einzelnen nicht optimal. Allerdings ist eine vergleichbare Orientierung der hydrophoben und hydrophilen Bereiche dennoch gegeben.

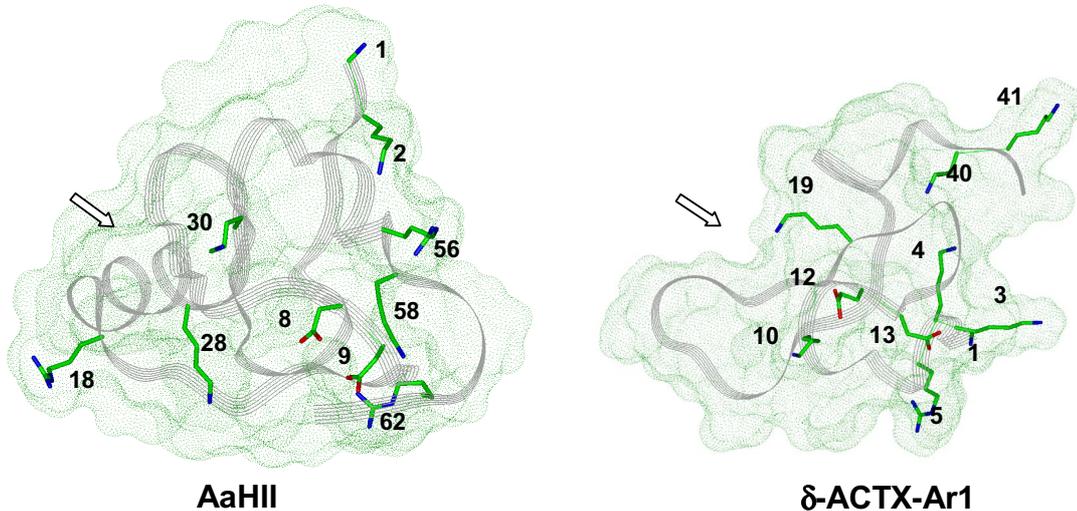


Bild 4.53: Bändermodelle des α -Skorpion-Toxins AaIII und des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 mit Connolly-Oberflächen. Die Orientierung entspricht dem Alignment 7 (s. Tabelle 4.32). Hydrophobe Aminosäuren sind nicht dargestellt. Angabe der im Einzelnen überlagerten Aminosäuren in Tabelle 4.33. Die Pfeile kennzeichnen Bereiche, die im Vergleich zur manuellen Überlagerung etwas versetzt liegen.

Tabelle 4.33: Überlagerung von δ -ACTX-Ar1 mit AaIII

δ-ACTX-Ar1	Lys10	Lys40	Lys3/ α -NH ₂ ^a	Arg5	Glu12	Tyr22
AaIII	Lys28	Lys2/Arg56	Lys58	Arg62	Asp8	Tyr21

^a α -NH₂ steht für die N-terminale α -Aminogruppe

Die beiden Toxine sind bei der Überlagerung in den Bereichen der α -Helix (AaIII) bzw. des Loops, bestehend aus den Aminosäuren 20-29 bei δ -ACTX-Ar1, leicht gegeneinander versetzt. Diese Regionen sind in Bild 4.53 durch Pfeile gekennzeichnet. Hierdurch kann die Aminosäure Lys30 von AaIII nicht direkt mit Lys19 bei δ -ACTX-Ar1 überlagert werden. In dieser Region zeigen sich so gewisse Unterschiede zu der manuell durchgeführten Überlagerung (vgl. Bild 4.47, S. 162). Dennoch wird dieser Beobachtung eine geringe Bedeutung beigemessen, denn weitreichende elektrostatischen Interaktionen zum Natriumkanal können nach wie vor in dem Lys28/Lys30/Arg56 bei AaIII entsprechenden Bereich eingegangen werden.

Der Vergleich der manuell durchgeführten Überlagerung mit dem Alignment 8 ist nach der Superpositionierung auf δ -ACTX-Ar1 in Bild 4.54 dargestellt. Dabei ist jeweils das Skorpion-Toxin AaIII der beiden Überlagerungen abgebildet.

Auch hier zeigt sich die leicht versetzte Orientierung. Auf der anderen Seite ergibt sich aber ein sehr gute Übereinstimmung im 5-Aminosäure-Turn (8-12) und im C-Terminus bei AaHII. Dies steht in Einklang mit der vermutlich wichtigen Funktion dieser Bereiche bei den Skorpion-Toxinen.

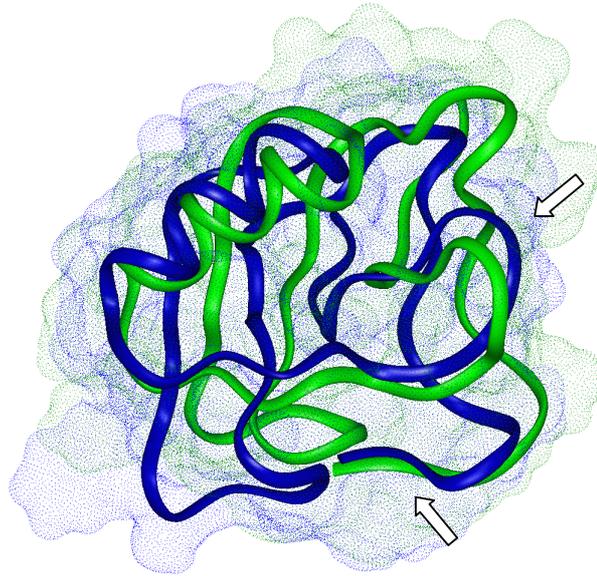


Bild 4.54: Bändermodelle von AaHII mit Connolly-Oberflächen. Abgebildet sind hier das manuell durchgeführte Alignment von AaHII mit δ -ACTX-Ar1 (vgl. Kapitel 4.10.7) und das Alignment 8 (s. Tabelle 4.32) nach der Superpositionierung auf δ -ACTX-Ar1. Dabei wurde jeweils δ -ACTX-Ar1 nicht dargestellt, die Moleküle aus beiden Überlagerungen liegen aber übereinander. Der 5-Aminosäure-Turn und der C-Terminus sind durch die Pfeile gekennzeichnet.

4.10.8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die beiden manuell durchgeführten Überlagerungen der Toxine AaHII mit ApB und AaHII mit δ -ACTX-Ar1 konnten grundsätzlich durch die Optimierung mit dem Programm FAME wiedergefunden werden. Im Vergleich zur manuellen Überlagerung ergaben die ausgewählten, optimierten Alignments von AaHII mit δ -ACTX-Ar1 eine leicht versetzte Orientierung, wodurch die Aminosäure Lys30 von AaHII nicht direkt überlagert wurde. Dennoch können nach wie vor weitreichende elektrostatische Interaktionen zum Natriumkanal in dem Lys28/Lys30/Arg56 bei AaHII entsprechenden Bereich eingegangen werden. Aus diesem Grund wird dieser versetzten Position der Toxine keine große Bedeutung beigemessen.

Für die Alignments von AaHII mit ApB wurden Kristall-, NMR- bzw. MD-Konformationen betrachtet. Bei der Verwendung der MD-Konformationen ergaben sich bessere Übereinstimmungen in Bezug auf die lipophilen Eigenschaften und die Überlagerung funktionell wichtiger Aminosäuren der Toxine.

Die Werte der Hodgkin Indices H lagen für die ausgewählten Alignments der Untersuchungen von AaHII/ApB und AaHII/ δ -ACTX-Ar1 jeweils im oberen Bereich des Gesamtergebnisses. Zwar wurden dabei Hodgkin Indices $H < 0,6$ gefunden, doch werden diese relativ niedrigen Werte auf die unterschiedliche Größe der Moleküle zurückgeführt. Die Toxine ApB bzw. δ -ACTX-Ar1 besitzen lediglich 49 bzw. 42 Aminosäuren. Hierdurch wird erklärbar, dass bei der Überlagerung mit AaHII, das aus 64 Aminosäuren besteht, nur ein relativ geringer Bereich des Potentials und des Molekülvolumens abgedeckt werden kann. Ein weiterer Punkt, der möglicherweise zu einem relativ geringen Index für das elektrostatische Potential H^{elec} führt, könnte der sehr hohe Anteil der geladenen Aminosäuren bei den Toxinen sein, wodurch nicht alle Bereiche mit gleichen Potentialen überlagert werden können.

Die Häufigkeit, mit der die jeweils ausgewählten Alignments auftraten, lag mit 18% (AaHII/ApB) bzw. 15% (AaHII/ δ -ACTX-Ar1) relativ hoch. Insofern wurden die mit FAME erzielten Überlagerungen der Toxine als sinnvoll eingeschätzt.

4.10.9 Abschließende Bemerkungen

In den Untersuchungen der Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine, die mit dem spannungsabhängigen neuronalen Natriumkanal der Säuger interagieren, ergaben sich folgende gemeinsame Eigenschaften: Geladene und hydrophobe Aminosäuren können bei den drei Toxingruppen in topologisch vergleichbaren Positionen gefunden werden, obwohl die Polypeptide deutliche strukturelle Unterschiede aufweisen. Bei den Molekülen liegt weiterhin ein ausgeprägtes lipophiles Potential auf der gegenüberliegenden Seite zu einem sehr niedrigen Potential. In den Überlagerungen konnten diese Potentiale in entsprechender Orientierung angeordnet werden. Gleichzeitig ergab sich bei allen drei Toxingruppen ein ausgeprägtes positives elektrostatisches Potential, das räumlich der Umgebung des Loops I bei Seeanemonen-Toxinen entspricht.

Interessant war darüber hinaus, dass in den Überlagerungen Molekülbereiche der Toxine in Übereinstimmung gefunden wurden, die im Verhältnis zum Gesamtmolekül eine höhere Flexibilität zeigen. Dies betrifft bei den Seeanemonen-Toxinen den Loop I, bei den Skorpion-Toxinen den 5-Aminosäure-Turn (8-12) und bei den Trichternetzspinnen-Toxinen den Loop 8-14. Bei den Seeanemonen-Toxinen findet man hier funktionell wichtige Aminosäuren.

Die manuell durchgeführten Überlagerungen von AaHII mit δ -ACTX-Ar1 und AaHII mit ApB konnten durch Alignments, die mittels Hodgkin Index optimiert wurden, wiedergefunden werden. Dabei wurden für die Berechnung der Indices das elektrostatische Potential und das Überlappungsvolumen der Toxine berücksichtigt.

5 DISKUSSION

5.1 Toxiphor-Modell für die Interaktion mit dem neuronalen Säugerkanal

Bei der Bindung der Toxine am neuronalen Natriumkanal spielen vermutlich hydrophobe Aminosäuren eine wichtige Rolle. Mutationsstudien des Seeanemonen-Toxins ApB zeigten, dass die Aminosäuren Leu18 und Trp33 eine sehr große Bedeutung für die Bindungsaffinität besitzen. Auffallend ist außerdem, dass ein hohes und ein niedriges lipophiles Potential auf gegenüberliegenden Oberflächen des Polypeptids zu finden sind. Eine ähnliche Verteilung konnte ebenfalls bei den Trichternetzspinnen- und Skorpion-Toxinen gezeigt werden, so dass vermutet wird, dass auch hier Dispersions-Wechselwirkungen zur Stabilisierung des Toxin-Natriumkanal-Komplexes beitragen. Bei den α -Skorpion-Toxinen sind hierbei vor allem Aminosäuren der konservierten hydrophoben Oberfläche beteiligt, für die aber neben der Interaktion mit dem Natriumkanal auch eine wichtige Bedeutung für die Stabilität der Toxine angenommen wird.

Neben den hydrophoben Aminosäuren spielen strukturelle und elektrostatische Eigenschaften der Toxine für die Bindung eine Rolle. Hierdurch kann die phylogenetische Selektivität in Bezug auf Säuger-/Insektenkanäle und Säuger-/Crustaceenkanäle begründet werden. Außerdem wird eine Erklärung für die Interaktionen der Skorpion-Toxine mit der Bindungsstelle 3 bzw. 4 des neuronalen Säugerkanals möglich.

Strukturelle Unterschiede konnten beim Vergleich der Seeanemonen-Toxine ApB, das eine hohe Affinität zum Säugerkanal besitzt, und ATXIa, das nicht am Säugerkanal bindet, in dem aus den Aminosäuren 36-44 bestehenden Loop (ApB) festgestellt werden. Der Anfangsbereich dieses Loops ist in Bild 5.1 (I) mit b gekennzeichnet. Bei der Überlagerung von ApB mit dem klassischen α -Skorpion-Toxin AaHII wurde dieser Bereich b in einer guten Übereinstimmung mit der Region B (s. Bild 5.1, II), die sich an die α -Helix bei AaHII anschließt, gefunden. Dabei unterscheidet sich AaHII in diesem Bereich B strukturell von dem β -Skorpion-Toxin Cn2, das an der Bindungsstelle 4 des Natriumkanals angreift. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Region b bei ApB bzw. B bei AaHII, die sich in direktem Kontakt mit der Bindungsstelle 3 des Natriumkanals der Säuger befinden könnte.

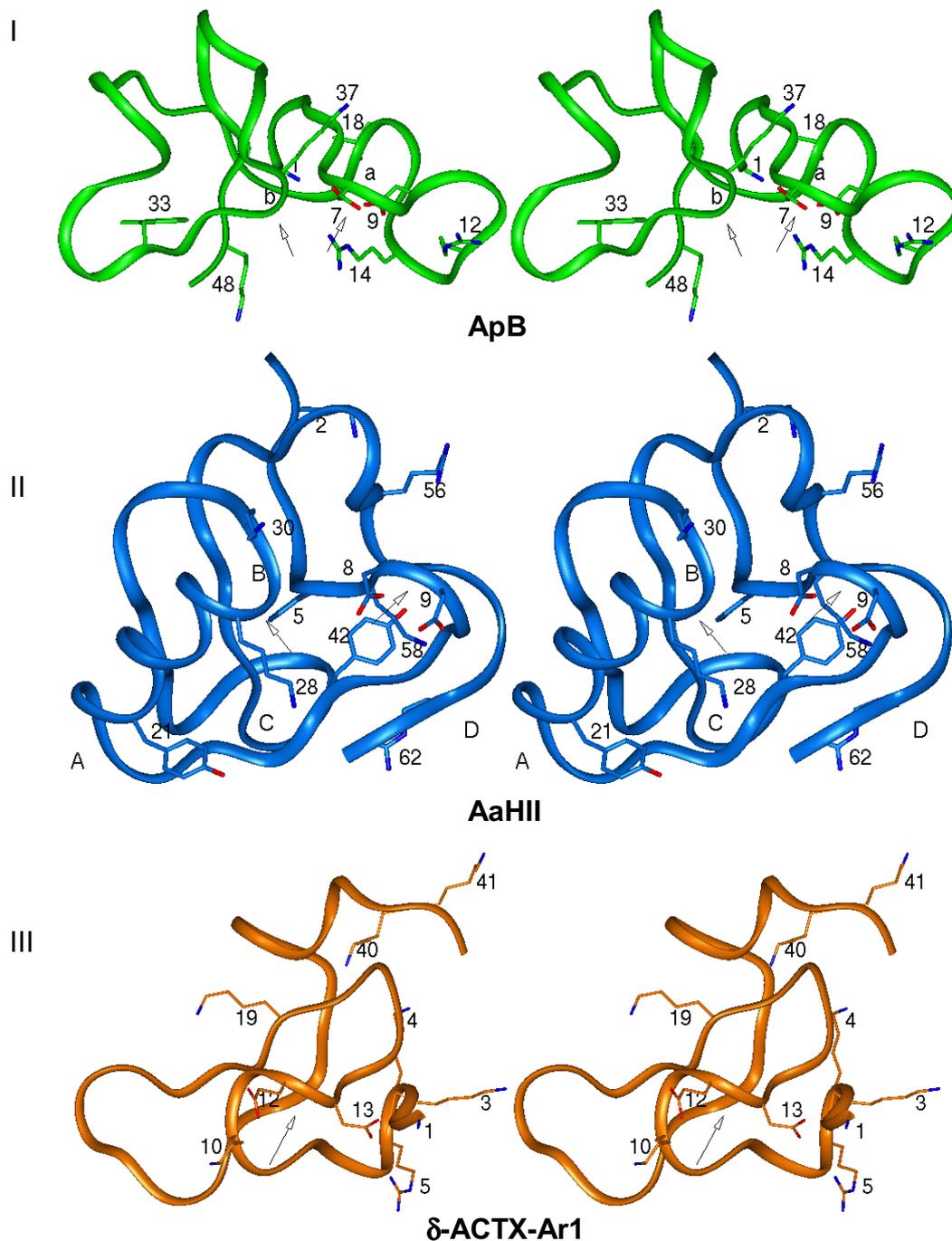


Bild 5.1: Stereoansicht von Bändermodellen des Seeanemonen-Toxins ApB (I), des klassischen α -Skorpion-Toxins AaHII (II) und des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 (III) mit wichtigen Aminosäuren. Bei δ -ACTX-Ar1 sind keine hydrophoben Aminosäuren dargestellt, da hier bei der Überlagerung mit AaHII einzelne Aminosäuren nicht zugeordnet werden konnten. Die Orientierung des lipophilen Potentials stimmt bei allen Toxinen überein. Die Pfeile kennzeichnen Bereiche der Toxine, die vermutlich in direktem Kontakt mit dem neuronalen Säugerkanal stehen. Bei ApB ist durch a bzw. b der Beginn des Loops I bzw. des Loops bestehend aus den Aminosäuren 36-44 markiert. Durch Großbuchstaben (A-D) sind die Regionen bei AaHII (II) gekennzeichnet, die sich strukturell deutlich von dem β -Skorpion-Toxin Cn2 unterscheiden (vgl. Bild 4.44).

Bei ApB ist der Bereich b (s. Bild 5.1, I) von besonderem Interesse, denn man findet hier die funktionell wichtige Aminosäure Lys37, die vermutlich eine direkte Interaktion mit dem Natriumkanal eingeht. In unmittelbarer Nähe liegt die Region a mit den ebenfalls wichtigen Aminosäuren Asp7, Asp9 und Arg12. Dieser Region a wird eine besondere Bedeutung für die Hemmung der Inaktivierung beigemessen, denn neben ihrer Nähe zum Bereich b und den funktionell wichtigen Aminosäuren ist hier zusätzlich eine gute Überlagerung mit dem 5-Aminosäure-Turn von AaIII möglich. Dabei ergab sich nicht nur eine strukturelle Gemeinsamkeit im Proteinrückgrat, sondern es konnten auch die beiden negativ geladenen Aminosäuren Asp7 und Asp9 von ApB mit Asp8 und Asp9 von AaIII überlagert werden. Für Asp7 und Asp9 wurde bei Mutationsstudien mit dem Seeanemonen-Toxin ApB eine funktionelle Bedeutung gefunden [132]. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wird aber angenommen, dass beide Aminosäuren keine direkten Interaktionen mit dem Natriumkanal eingehen. Ihre Bedeutung liegt vermutlich in der Stabilisierung wichtiger positiv geladener Aminosäuren und der Struktur des Toxins. Bei dem Trichternetzspinnen-Toxin δ -ACTX-Ar1 konnte ebenfalls ein vergleichbarer Loop, bestehend aus den Aminosäuren 8-14, mit Glu12 und Asp13 gefunden werden (s. Bild 5.1, III).

Bei allen drei Toxingruppen besitzt dieser spezielle Loop im Vergleich zum Gesamtmolekül eine erhöhte Flexibilität (ApB: Aminosäuren 8-17, AaIII: 8-12, δ -ACTX-Ar1: 8-14). Dies könnte in Bezug auf die spannungsabhängige Bindung an den Natriumkanal, die für die α -Skorpion- und Seeanemonen-Toxine gezeigt werden konnte, von Bedeutung sein. Die Bindungsaffinität der Toxine nimmt bei zunehmender Depolarisation der Membran ab, dabei ist dieser Effekt bei den Skorpion-Toxinen stärker ausgeprägt. Es wird vermutet, dass der Loop IVS3-S4 seine Konformation verändert, sobald sich der Spannungssensor IVS4 der Domäne in Richtung Extrazellulärraum bewegt. Dabei könnte auch die Konformation der Bindungsstelle 3 in diesem Bereich verändert werden, so dass eine gewisse Anpassung der Toxine bei der Bindung an den Loop erfolgen müsste. Dies wird durch einen flexiblen Bereich im Molekül ermöglicht. Da Seeanemonen-Toxine in dieser Region, bedingt durch variable Aminosäuren an Beginn und Ende des Loops I (vgl. Kapitel 4.3.1.1), eine höhere Flexibilität als Skorpion-Toxine zeigen, wäre es denkbar, dass hierdurch eine Bindung auch bei stärkerer Depolarisation der Membran erfolgen könnte.

Obwohl die Flexibilität für die Bindung bei der Depolarisation vermutlich eine Rolle spielt, ist auf der anderen Seite die Stabilität dieses Bereichs in sich für die Hemmung der Inaktivierung von Bedeutung. Bei der Untersuchung der Seeanemonen-Toxine ApB, ApA und der ApB-Mutante R12SK49Q zeigte sich, dass bei der Mutante, die im Vergleich die höchste Fähigkeit zur Stabilisierung der offenen Konformation des Natriumkanals besitzt, eine höhere Rigidität in diesem Bereich a gefunden wurde.

Für die selektive Bindung der Toxine konnte außerdem eine Bedeutung der elektrostatischen Eigenschaften gezeigt werden. Elektrostatische Wechselwirkungen sind von besonderem Interesse, da sie im Vergleich zu hydrophoben eine größere Reichweite besitzen und spezifischer interagieren können. Bei dem Seeanemonen-Toxin ATX1a und dem α -Skorpion-Toxin Lqh α IT, die beide AaHII nicht vom neuronalen Säugerkanal verdrängen können, zeigte sich ein negatives molekulares elektrostatisches Potential in dem bei ApB wichtigen Bereich um Lys37 (Bereich a, s. S. 108f, S. 135f). Dieses negative Potential scheint dabei keinen Einfluss auf die Bindung am Kanal der Crustaceen (ATX1a) bzw. der Insekten (Lqh α IT) zu besitzen, denn auch Toxine mit positivem Potential in diesem Bereich können mit den Kanälen interagieren. Weitere negative Potentiale (s. Bild 4.31, Bild 4.32, S. 135f) fielen im Bereich h bei Lqh α IT und in den Bereichen b und h bei dem β -Skorpion-Toxin Cn2 auf, die vermutlich ebenfalls die Bindung am Säugerkanal inhibieren. Bei Lqh α IT erstreckt sich dieses negative Potential zusätzlich über den Bereich zwischen Lys8 und Lys41. Dadurch unterscheidet es sich von dem Potential h bei den Seeanemonen-Polypeptiden BDSI und BDSII, die am Säugerkanal binden können.

Die Unterschiede in den strukturellen und elektrostatischen Eigenschaften von ATX1a, Lqh α IT und Cn2, die vermutlich die Interaktion mit der Bindungsstelle 3 des Säugerkanals verhindern, geben Hinweise auf die vermutlichen Bindungsbereiche der Toxine ApB, AaHII und δ -ACTX-Ar1. In Bild 5.1 ist das entwickelte Toxiphor-Modell dargestellt, das die gemeinsamen Strukturelemente, die für die Toxin-Natriumkanal-Interaktion von Bedeutung sind, in entsprechender räumlicher Anordnung wiedergibt. In der postulierten Bindungsregion liegen außerdem bei dem α -Skorpion-Toxin AaHII die Bereiche, die strukturelle Unterschiede zu dem β -Skorpion-Toxin Cn2 zeigen. Hierzu gehört der Bereich vor (A) und nach der α -Helix (B), der β -*hairpin* (C) und der C-Terminus (D).

5.2 Modell für die Hemmung der Inaktivierung

Bisher wurden neben den Loopbereichen IS5-SS1 und ISS2-S6 der Domäne I die Loops IVS5-SS1 und IVS3-S4 der Domäne IV als mögliche Bindungsbereiche für die *site 3*-Toxine identifiziert (Referenzen s. [31]). Dabei ist vor allem die Bindung am Loop IVS3-S4 von besonderem Interesse, denn dem S4-Segment der Domäne IV wird eine besondere Bedeutung bei der Kopplung des Inaktivierungsprozesses an die Aktivierung beigemessen. Bei der Aktivierung des spannungsabhängigen Natriumkanals durch die Depolarisation der Membran bewegen sich die S4-Segmente als Spannungssensoren in Richtung Extrazellulärraum. Infolge dieser vermutlich rotierenden Auswärtsbewegung des IVS4-Segments muss sich ebenfalls die Konformation des Loops IVS3-S4 verändern. Seeanemonen-, Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine hemmen die Inaktivierung, wobei vor allem die Ladungsveränderung blockiert wird, die sich aus der Bewegung des IVS4-Segments ergibt [34]. Für diesen Effekt können aufgrund der durchgeführten Untersuchungen zwei Mechanismen postuliert werden.

Bei allen Toxinen konnte ein ausgeprägtes positives molekulares elektrostatisches Potential in vergleichbarer räumlicher Position, die in etwa dem Loop I der Seeanemonen-Toxine (Potentiale b, c, d; s. S. 108f, S. 135f) entspricht, gefunden werden. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob das betrachtete Toxin am Säuger-, Crustaceen- oder Insektenkanal bindet. Es konnten lediglich Unterschiede in der Reichweite der Potentiale festgestellt werden. Die Seeanemonen-Toxine ATXIa und ATXIII, die nur am Crustaceenkanal angreifen, zeigen so ein ausgeprägtes positives Potential in den Bereichen b und d, aber nur ein geringes in c. Auch bei dem α -Skorpion-Toxin AaHIII ist das Potential im Bereich c schwächer ausgeprägt. Polypeptide wie BDSII und ein durch Loopspaltung modifiziertes ApB, die in der Position des Loops I ein negatives Potential besitzen, können die Inaktivierung nicht blockieren. Deshalb wird vermutet, dass die elektrostatische Interaktion zwischen dem positiven molekularen elektrostatischen Potential der Toxine und dem IVS4-Segment, das als Spannungssensor mehrere positiv geladene Aminosäuren besitzt, die Bewegung dieses Segments einschränkt.

Zusätzlich wird angenommen, dass die *site 3*-Toxine die Konformation des Loops IVS3-S4 stabilisieren können, wodurch die rotierende Auswärtsbewegung des S4-Segments ebenfalls eingeschränkt würde. Die Untersuchung der Flexibilität von Seeanemonen-Toxinen ergab, dass die Verbindungen, die

die offene Konformation des Natriumkanals besser stabilisieren können, vor allem im Anfangsbereich des Loops I eine höhere Rigidität besitzen. Der Effekt der Toxine ist demnach umso ausgeprägter, je rigider bestimmte Bereiche des Moleküls sind. Deshalb wird vermutet, dass die Stabilisierung des Loops IVS3-S4 durch Kontakte mehrerer Aminosäuren dieses Loops mit Aminosäuren der Toxine erfolgt. Denkbar wäre aber auch eine Überbrückung des Loops IVS3-S4 mit dem ebenfalls zum Rezeptorkomplex der Bindungsstelle 3 gehörenden Loop IVS5-SS1 durch das Toxin.

Durch diese beiden Wirkmechanismen kommt es zu einer Einschränkung der Bewegung des IVS4-Segments. Es wird erklärbar, warum die Inaktivierung durch die Interaktion mit Toxinen gehemmt werden kann, obwohl diese an unterschiedlichen, möglicherweise überlappenden Bindungsstellen angreifen. Molekulare elektrostatische Potentiale sind relativ weitreichend, und die Stabilisierung des Loops IVS3-S4 könnte über verschiedene Interaktionen zwischen Toxin und Natriumkanal erfolgen.

Eine elektrostatische Interaktion mit dem Spannungssensor IVS4 könnte auch eine Erklärung für den negativ inotropen Effekt der Antagonisten BDSI und BDSII sein, die ebenfalls an der Bindungsstelle 3 des Natriumkanals angreifen. Bei beiden Polypeptiden konnte ein ausgeprägtes negatives Potential im Bereich h gefunden werden (s. S. 109). In der Überlagerung mit ApB würden in unmittelbarer Nähe zu diesem negativen Bereich die Aminosäuren Leu18 und Trp33 liegen. Die beiden hydrophoben Aminosäuren tragen bei ApB sehr stark zur Affinität des Toxins bei und liegen vermutlich im direkten Interaktionsfeld mit dem Natriumkanal. Da vermutlich das positive molekulare elektrostatische Potential der Toxine ApB und ApA zur Inhibierung der Bewegung des Segments IVS4 durch elektrostatische Interaktionen beiträgt, ist es durchaus denkbar, dass ein starkes negatives Potential die Bewegung begünstigen könnte. Hierdurch wäre es möglich, dass der spannungsabhängige Natriumkanal schneller von der aktivierten in die inaktivierte Konformation übergehen könnte. Für dieses Modell spricht auch die im Vergleich zu BDSI stärkere blutdrucksenkende Wirkung von BDSII. Die Polypeptide unterscheiden sich in ihren Sequenzen lediglich in zwei Aminosäuren, dabei besitzt BDSII Pro7 und Asp11 anstelle von Ser7 und Gly11. Im Vergleich zu BDSI zeigt so das negative Potential h bei BDSII durch die Aminosäure Asp11 eine deutlich weitere räumliche Ausdehnung, und es erstreckt sich auch über den Bereich des Loops I der Seeanemonen-Toxine. Da BDSI die schwächere blutdrucksenkende Wirkung

zeigt, ist dies ein Hinweis auf die Bedeutung des ausgeprägten negativen Potentials für den Effekt der beiden Moleküle.

5.3 Interaktionen zwischen den Toxinen und dem Loop IVS3-S4

Rogers et al. konnten durch Mutationsstudien am neuronalen Natriumkanal der Ratten (Typ IIa) wichtige Aminosäuren für die Bindung des Seeanemonen-Toxins ATXII bzw. des α -Skorpion-Toxins LqqV im Loop IVS3-S4 identifizieren [31]. Dabei ergab sich eine wichtige Funktion der Aminosäuren Glu1613, Glu1616, Val1620 und Leu1625 für die Bindung von ATXII. Im Gegensatz dazu erhöhten Alanin-Substitutionen von Leu1614, Lys1617 und Ser1621 signifikant die Affinität. Die Aminosäure Glu1613 ist auch für die Interaktion von LqqV mit dem Natriumkanal wichtig; Alanin-Substitutionen von Lys1617 und Pro1622 führen auch in diesem Fall zu einer signifikanten Erhöhung der Affinität. Dieses Ergebnis ist wegen des ausgeprägten positiven molekularen elektrostatischen Potentials der Toxine leicht verständlich. Nach der Substitution von Lys1617, durch die das positive Potential des Kanals verringert wird, können die Polypeptide leichter an der Bindungsstelle 3 angreifen.

Rogers et al. identifizierten im Vergleich zu ATXII eine geringere Anzahl von Aminosäuren im Loop IVS3-S4, die eine Interaktion mit dem Skorpion-Toxin LqqV eingehen. Allerdings ist es nicht möglich, aus der Alanin-Substitution einer Aminosäure, bei der sich keine deutliche Veränderung der Bindungsaffinität ergeben hat, eine Interaktion im Protein-Rezeptor-Komplex völlig auszuschließen. (vgl. Kapitel 1.6).

Da lediglich die Bindung von LqqV und ATXII an den mutierten Kanälen untersucht wurde, ist es schwierig, die Aminosäuren der Toxine zu bestimmen, die mit dem Loop IVS3-S4 wechselwirken. Zudem steht von ATXII keine Kristall- oder NMR-Struktur zur Verfügung, so dass Unterschiede zu der in dieser Arbeit untersuchten Struktur von ApB möglich wären.

Benzinger et al. postulierten eine Interaktion von Lys37 bei ApB mit Asp1612 des kardialen Natriumkanals [138]. Aufgrund der Homologien der kardialen und neuronalen Isoformen könnte Lys37 entsprechend mit Glu1613 des neuronalen Kanals interagieren. Glu1613 ist für die Bindung der Toxine ATXII und LqqV von Bedeutung, und entsprechend der Überlagerung von ApB und LqqV könnten die Aminosäuren Lys29 oder Arg54 des Skorpion-Toxins mit Glu1613

eine Wechselwirkung eingehen (s. Tabelle 5.1). Die Aminosäure Glu1616 hingegen zeigte lediglich Einfluss auf die Bindung von ATXII, demnach könnte hier Lys48 von ApB für eine Interaktion in Frage kommen, denn diese Aminosäure konnte kaum mit Lys28 von LqqV überlagert werden.

Tabelle 5.1: Überlagerte Aminosäuren der untersuchten Toxine

AaHII	ApB	LqqV
	Arg12	Lys10
Lys58/Arg62	α -Aminogruppe/Arg14	Lys58/Arg62
Lys30/Arg56	Lys37	Lys29/Arg54
Lys28	Lys48	(Lys28)
Asp8/Asp9	Asp7/Asp9	Asp8/Asp9

ApB wurde in dieser Arbeit sowohl im Vergleich mit LqqV als auch mit AaHII betrachtet. Dabei ergaben sich für einige Aminosäuren von ApB, wie Arg12 und Lys48, Unterschiede in den Überlagerungen (s. Tabelle 5.1). Im Gegensatz zu LqqV wurde bei dem Toxin AaHII Lys28 in vergleichbarer Position zu Lys48 von ApB gefunden. Arg12 hingegen konnte bei diesem Skorpion-Toxin nicht durch eine äquivalente Aminosäure überlagert werden. Deshalb könnte das Bindungsverhalten von AaHII an den mutierten Kanälen möglicherweise Rückschlüsse auf die Interaktionspartner der beiden Glutamate des Natriumkanals geben.

Die Position von Glu1613 ist derzeit nicht eindeutig geklärt. Die Aminosäure könnte im Segment IVS3 liegen oder aber an der extrazellulären Oberfläche des Kanals (Referenzen s. [31]). Aufgrund der durchgeführten Überlagerungen der Toxine sollte eine Interaktion von Lys37 mit Glu1613 nur möglich sein, wenn diese Aminosäure an der Oberfläche des Kanals liegt. Lys37 wird bei ApB in einem relativ inflexiblen Bereich gefunden, so dass ein Eintauchen in eine tiefere Kanalregion unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus sollte die α -Helix der α -Skorpion-Toxine aufgrund von Untersuchungen mit Antikörpern nicht im direkten Bindungsbereich der Toxine liegen [154]: El Ayeb et al. hatten festgestellt, dass Antikörper, die Bereiche der Helix von AaHII identifizieren, auch am gebundenen Toxin angreifen konnten. In den Überlagerungen von AaHII mit ApB würde bei einer Bindung von Lys37 in einer tieferen Region des Kanals die Helix vermutlich im direkten Protein-Protein-Interaktionsbereich liegen und wäre so kaum für Antikörper zugänglich.

Die Untersuchungen von Rogers et al. bezüglich der Loops IS5-S6, IVS3-S4, IVS5-SS1 und IVSS2-S6 haben für die Skorpion-Toxine lediglich eine negativ geladene Aminosäure mit Einfluss auf die Bindungsaffinität von LqqV ergeben. Dennoch könnten in diesen Loops weitere Interaktionspartner für die Skorpion-Toxine liegen, denn bei Lqh α IT wurden mehrere positiv geladene Aminosäuren identifiziert, die vermutlich in direkter Interaktion mit dem Kanal stehen. Es wäre möglich, dass hier neben ionischen Wechselwirkungen auch Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Asn und Gln ausgebildet werden. Weiterhin wäre bei der Bindung eine Kompensation fehlender Kontakte zwischen dem Toxin und dem Kanal durch andere Wechselwirkungen möglich. Vor allem die Skorpion-Toxine können aufgrund ihrer Molekülgröße im Vergleich zu den Seeanemonen-Toxinen eine größere Anzahl von Interaktionen ausbilden. Insofern wäre es denkbar, dass der Effekt auf die experimentell bestimmten Affinitäten des Skorpion-Toxins LqqV bei einer Mutation von negativen Aminosäuren des Kanals zu gering für eine signifikante Änderung war.

5.4 Vergleich mit publizierten Überlagerungen

Fletcher et al. publizierten ein Modell für die elektrostatischen Interaktionen der *site 3*-Toxine AaHII, ApB und δ -ACTX-Hv1a mit dem Loop IVS3-S4 des neuronalen Natriumkanals (s. Tabelle 5.2) [83]. Dabei wurde eine wichtige Rolle für Lys1617 postuliert. Allerdings ist anzumerken, dass die Interaktion von Lys1617 mit den negativ geladenen Aminosäuren der Toxine eher unwahrscheinlich ist, denn die Ergebnisse von Rogers et al. ergaben eine erhöhte Affinität der Toxine nach einer Alanin-Substitution dieser Aminosäure. Ein weiterer Kritikpunkt ist die Überlagerung der Aminosäuren Lys2 von AaHII mit Lys49 von ApB. Hier wurde bei dem Skorpion-Toxin eine vermutlich wichtige Aminosäure mit einer eher unwichtigen und zudem nur bei ApB auftretenden Aminosäure überlagert.

Tabelle 5.2: Überlagerung nach Fletcher et al.

AaHII	Lys2	Lys58	Asp8
ApB	Lys49	Lys48	Asp9
δ-ACTX-Hv1a	Arg5	Lys3	Asp13
Loop IVS3-S4	Glu1613	Glu1616	Lys1617

Die von Fletcher et al. veröffentlichte Überlagerung wurde mit den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konformationen von ApB und AaHII entsprechend

den in Tabelle 5.2 angegebenen Aminosäuren nachvollzogen. Dabei lag die wichtige Aminosäure Lys37 von ApB in direkter Umgebung von Glu24 und Glu25 von AaHII (nicht dargestellt). Außerdem konnten hydrophobe Aminosäuren wie Trp23 und Trp33 von ApB nicht überlagert werden. Zudem lag die konservierte hydrophobe Oberfläche des Skorpion-Toxins im Bereich von Lys48 bei ApB. Aufgrund der Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen, die experimentell für ApB gezeigt wurden, ist dieses Alignment der beiden Toxine eher unwahrscheinlich.

Das Trichternetzspinnen-Toxin δ -ACTX-Hv1a (PDB: 1vtx [83]) wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, doch unterscheiden sich δ -ACTX-Ar1 und δ -ACTX-Hv1a lediglich in sieben Aminosäuren, und auch ihre Strukturen sind sehr ähnlich. Deshalb wurde zur Betrachtung der von Fletcher et al. postulierten Überlagerung stattdessen die Konformation von δ -ACTX-Ar1 mit ApB verglichen (s. Bild 5.2). Auch hierbei bleiben wichtige funktionelle Aminosäuren von ApB, wie Lys37, unberücksichtigt. Die Volumenüberlappung der beiden Polypeptide ist zudem sehr gering, und aus diesen Gründen wird auch diese Überlagerung als eher unwahrscheinlich eingestuft.

Little et al. überlagerten nach Untersuchung der topologischen Anordnung von positiven Ladungen die Aminosäuren Arg64, Lys62 und Lys8 von Lqh α IT mit Lys4, Arg5 und Lys19 von δ -ACTX-Hv1a [27]. Zur Betrachtung des postulierten Modells wurden auch hier die in der Arbeit verwendeten Konformationen von Lqh α IT und δ -ACTX-Ar1 entsprechend überlagert (s. Bild 5.3). Dabei ergibt sich eine ungünstige Volumenüberlappung der Toxine. Die Verteilung der wichtigen funktionellen Aminosäuren von Lqh α IT sowie die Bedeutung der C-terminalen Region sprechen eher für eine Interaktion mit dem Natriumkanal in dem Bereich, in dem bei der Überlagerung δ -ACTX-Ar1 liegt.

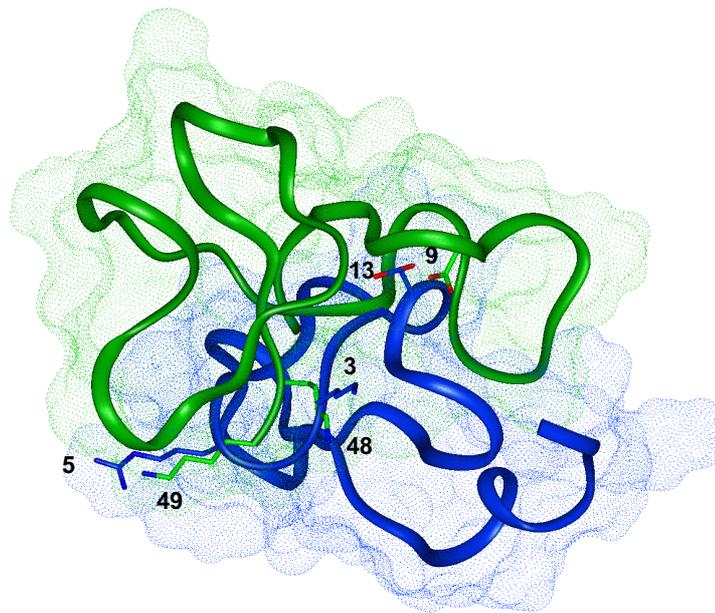


Bild 5.2: Bändermodelle des Seeanemonen-Toxins ApB (*grün*) und des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 (*blau*) mit Connolly-Oberflächen.

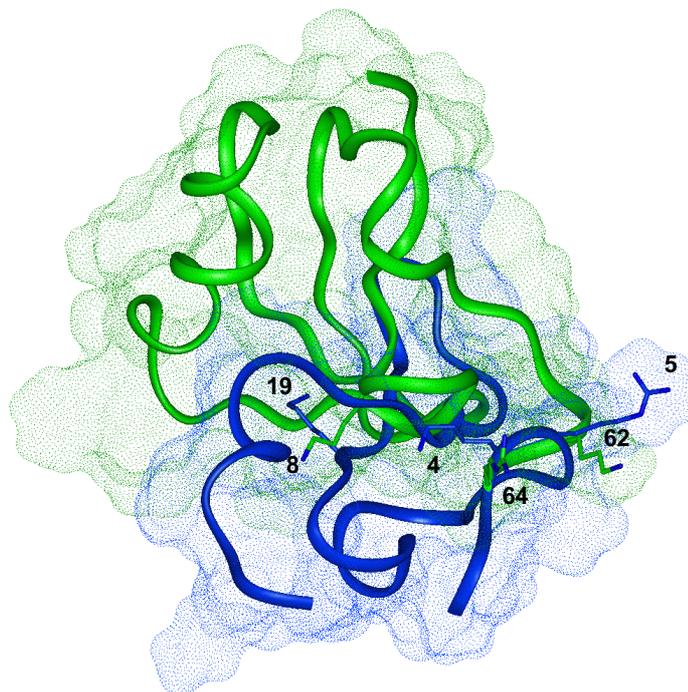


Bild 5.3: Bändermodelle des Skorpion-Toxins Lqh α IT (*grün*) und des Trichternetzspinnen-Toxins δ -ACTX-Ar1 (*blau*) mit Connolly-Oberflächen.

5.5 Ausblick

Im Rahmen der Arbeit wurden Seeanemonen-, α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxine untersucht, die den Inaktivierungsprozess des spannungsabhängigen Natriumkanals der Säuger inhibieren. Dabei binden die Vertreter der drei Toxingruppen an derselben oder zumindest partiell überlappenden Bindungsstelle 3 des Kanals. Obwohl die Toxine weder sequentielle noch strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen, konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass nicht nur geladene sondern auch hydrophobe Aminosäuren in topologisch vergleichbaren Positionen gefunden werden. Es ergaben sich außerdem Übereinstimmungen in lipophilen sowie molekularen elektrostatischen Potentialen und auch in flexiblen Bereichen der Moleküle. Durch die Überlagerung des Skorpiontoxins AaIII mit dem Seeanemonen-Toxin ApB konnten darüber hinaus zwei Regionen identifiziert werden, die deutlich strukturelle Ähnlichkeiten zeigen. Bei ApB findet man hier funktionell wichtige Aminosäuren. Aufgrund dieser gemeinsamen und charakteristischen Eigenschaften der *site* 3-Toxine wird postuliert, dass zumindest die untersuchten Toxine nicht an einer weitläufig überlappenden sondern an einer weitgehend identischen Bindungsstelle am neuronalen Natriumkanal der Säuger angreifen. Einzelne Interaktionspartner zwischen den Toxinen und dem Natriumkanal können dabei dennoch variieren.

Die bisher identifizierten Bereiche des Kanals, die für die Inaktivierung von Bedeutung sind, liegen vor allem intrazellulär oder innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht. Durch das entwickelte Modell für die Hemmung der Inaktivierung kann ein möglicher Mechanismus beschrieben werden, durch den ein Molekül, das im extrazellulären Bereich des Kanals bindet, trotzdem Einfluss auf diesen Prozess nehmen kann.

Darüber hinaus ist speziell die Untersuchung des kurzkettigen Seeanemonen-Toxins ATXIII von Interesse, denn hierdurch konnte gezeigt werden, dass auch ein relativ kleines Polypeptid, das spezielle Eigenschaften in bestimmten Bereichen des Moleküls vorweisen kann, die Inaktivierung hemmt. Möglicherweise sind grundlegende Untersuchungsergebnisse, die sich in der vorliegenden Arbeit für die neuronalen Natriumkanäle ergeben haben, auch auf die kardiale Isoform übertragbar. Dies könnte hilfreich für die Entwicklung positiv inotroper Wirkstoffe sein, denn Seeanemonen-Toxine zeigen eine hohe Affinität zum kardialen Kanal.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden peptidische Toxine aus Seeanemonen, Skorpionen und Trichternetzspinnen untersucht, die an der Bindungsstelle 3 des neuronalen, spannungsabhängigen Natriumkanals angreifen und dessen Inaktivierung hemmen. Durch einen Vergleich der Eigenschaften dieser Toxine sollten Gemeinsamkeiten erarbeitet werden.

Hierfür wurde zunächst ein Protokoll entwickelt, um energetisch günstige und unter vergleichbaren Bedingungen stabile Konformationen der einzelnen Polypeptide zu generieren. Als Basis dieser Konformationssuche wurden Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde ein Toxiphor-Modell für die Seeanemonen-Toxine entwickelt, das die für die Interaktion mit dem neuronalen Natriumkanal der Säuger wichtigen Strukturelemente wiedergeben kann. Hierfür wurden strukturelle Eigenschaften sowie molekulare elektrostatische und lipophile Potentiale betrachtet und zusätzlich veröffentlichte experimentelle Daten berücksichtigt. Neben den Toxinen wurden auch Antagonisten der Bindungsstelle 3 untersucht.

Es war möglich, dieses Modell durch Überlagerungen mit α -Skorpion- und Trichternetzspinnen-Toxinen zu bestätigen. Aus den Ergebnissen konnten funktionell wichtige Aminosäuren dieser beiden Toxingruppen abgeleitet werden. Weiterhin konnten Unterschiede zwischen den α - und β -Skorpion-Toxinen gezeigt werden, die erklären können, warum die Bindung der β -Toxine an der Bindungsstelle 3 inhibiert wird.

Aus den Eigenschaften der Toxine ergab sich außerdem eine mögliche Erklärung für die Hemmung der Inaktivierung des neuronalen Natriumkanals. Dabei könnten zwei Mechanismen für die Inhibierung der normalen Bewegung des IVS4-Segments bei der Aktivierung des Natriumkanals von Bedeutung sein. Die Ergebnisse deuten auf eine elektrostatische Interaktion zwischen dem positiven elektrostatischen Potential der Toxine und dem Potential des IVS4-Segments hin. Weiterhin scheint eine Inhibierung der Konformationsveränderung des Loops IVS3-S4 für den Effekt der Toxine von Bedeutung zu sein. Dabei könnten mehrere Kontakte zwischen den Polypeptiden und diesem Loop oder eine Überbrückung der Loops IVS3-S4 und IVS5-SS1 durch die Toxine als Ursache in Frage kommen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Ménez, M.; *Toxicon* **1998**, 36, 1557-1572
- [2] Bode, F.; Sachs, F.; Franz, M. R.; *Nature* **2001**, 409, 35
- [3] Catterall, W. A.; *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64493-531
- [4] Catterall, W. A.; *Neuron* **2000**, 26, 13-25
- [5] Goldin, A. L.; Snutch, T.; Lubbert, H.; Dowsett, A.; Marshall, J.; Auld, V.; Downey, W.; Fritz, L. C.; Lester, H. A.; Dunn, R.; Catterall, W. A.; Davidson, N.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 7503-7507
- [6] Isom, L. L.; De Jongh, K. S.; Patton, D. E.; Reber, B. F.; Offord, J.; Charbonneau, H.; Walsh, K.; Goldin, A. L.; Catterall, W. A.; *Science* **1992**, 256, 839-842
- [7] Isom, L. L.; Ragsdale, D. S.; De Jongh, K. S.; Westenbroek, R. E.; Reber, B. F.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *Cell* **1995**, 83, 433-442
- [8] Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F.; *J. Physiol.* **1952**, 117, 500-544
- [9] Doyle, D. A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R.; *Science* **1998**, 280, 69-77
- [10] Bezanilla, F.; *Physiol. Rev.* **2000**, 80, 555-592
- [11] Hirschberg, B.; Rovner, A.; Lieberman, M.; Patlak, J.; *J. Gen. Physiol.* **1995**, 106, 1053-1068
- [12] Kontis, K. J.; Rounaghi, A.; Goldin, A. L.; *J. Gen. Physiol.* **1997**, 110, 391-401
- [13] Catterall, W. A.; *Trends Neurosci.* **1986**, 9, 7-10
- [14] Guy, H. R.; Seetharamulu, P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 508-512
- [15] Cha, A.; Snyder, G. E.; Selvin, P. R.; Bezanilla, F.; *Nature* **1999**, 402, 809-813
- [16] Perozo, E.; Cortes, D. M.; Cuello, L. G.; *Science* **1999**, 285, 73-78
- [17] West, J. W.; Patton, D. E.; Scheuer, T.; Wang, Y.; Goldin, A. L.; Catterall, W. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 10910-10914
- [18] Rohl, C. A.; Boeckman, F. A.; Baker, C.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; Klevit, R. E.; *Biochemistry* **1999**, 38, 855-861
- [19] Kellenberger, S.; West, J. W.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *J. Gen. Physiol.* **1997**, 109, 589-605
- [20] Armstrong, C. M.; *Physiol. Rev.* **1981**, 61, 644-682
- [21] Kellenberger, S.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 30971-30979
- [22] Mitrovic, N.; George, L. A.; Horn, R.; *J. Gen. Physiol.* **1998**, 111, 451-462
- [23] Chahine, M.; George, A. L. Jr.; Zhou, M.; Ji, S.; Sun, W.; Barchi, R. L.; Horn, R.; *Neuron* **1994**, 12, 281-294
- [24] Cha, A.; Ruben, P. C.; George, A. L.; Fujimoto, E.; Bezanilla, F.; *Neuron* **1999**, 22, 73-87
- [25] Gordon, D.; Martin-Eauclaire, M. F.; Cestèle, S.; Kopeyan, C.; Carlier, E.; Khalifa, R. B.; Pelhate, M.; Rochat, H.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8034-8045
- [26] Cestèle, S.; Qu, Y.; Rogers, J. C.; Rochat, H.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *Neuron* **1998**, 21, 919-931
- [27] Little, M. J.; Wilson, H.; Zappia, C.; Cestèle, S.; Tyler, M. I.; Martin-Eauclaire, M. F.; Gordon, D.; Nicholson, G. M.; *FEBS Lett.* **1998**, 439, 246-252
- [28] Little, M. J.; Zappia, C.; Gilles, N.; Connor, M.; Tyler, M. I.; Martin-Eauclaire, M. F.; Gordon, D.; Nicholson, G. M.; *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27076-83

- [29] Thomsen, W. J.; Catterall, W. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 10161-10165
- [30] Tejedor, F. J.; Catterall, W. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 8742-6
- [31] Rogers, J. C.; Qu, Y.; Tanada, T. N.; Scheuer, T.; Catterall, W. A.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 15950-15962
- [32] Nonner, W.; *Adv. Cytopharmacol.* **1979**, 3, 345-52
- [33] Neumcke, B.; Schwarz, W.; Stampfli, R.; *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 814, 111-9
- [34] Sheets, M. F.; Kyle, J. W.; Kallen, R. G.; Hanck, D. A.; *Biophys. J.* **1999**, 77, 747-757
- [35] Yang, N. B.; Horn, R.; *Neuron* **1995**, 15, 213-218
- [36] Wang, G. K.; Strichartz, G.; *J. Gen. Physiol.* **1985**, 86, 739-62
- [37] Catterall, W. A.; Béress, L.; *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 7393-6
- [38] Warashina, A.; Ogura T.; Fujita S.; *Comp. Biochem. Physiol. C* **1988**, 90, 351-9
- [39] Strichartz, G. R.; Wang, G. K.; *J. Gen. Physiol.* **1986**, 88, 413-35
- [40] Norton, R. S.; *Toxicon* **1991**, 29, 1051-84
- [41] Sanchez, J.; Bruhn, T.; Aneiros, A.; Wachter, E.; Béress, L.; *Toxicon* **1996**, 34, 1361-1366
- [42] Renaud, J. F.; Fosset, M.; Schweitz, H.; Lazdunski, M.; *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, 120, 161-70
- [43] Blair, R. W.; Peterson, D. F.; Bishop, V. S.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1978**, 207, 271-6
- [44] Scriabine, A.; Van Arman, C. G.; Morgan, G.; Morris, A. A.; Bennett, C. D.; Bohidar, N. R.; *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1979**, 1, 571-83
- [45] Hoey, A.; Harrison, S. M.; Boyett, M. R.; Ravens, U.; *Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 75, 356-65
- [46] Bairoch, A.; Boeckmann, B.; *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 2247-2249
SWISS-PROT-Datenbank (<http://www.expasy.ch/sprot/sptot-top.html>)
- [47] Llewellyn, L. E.; Norton, R. S.; *Biochem. Int.* **1991**, 24, 937-946
- [48] Salgado, V. L.; Kem, W. R.; *Toxicon* **1992**, 30, 1365-81
- [49] Schweitz, H.; Bidard, J. N.; Frelin, C.; Pauron, D.; Vijverberg, H. P.; Mahasneh, D. M.; Lazdunski, M.; Vilbois, F.; Tsugita, A.; *Biochemistry* **1985**, 24, 3554-3561
- [50] Catterall, W. A.; Coppersmith, J.; *Mol. Pharmacol.* **1981**, 20, 533-42
- [51] Schweitz, H.; Vincent, J. P.; Barhanin, J.; Frelin, C.; Linden, G.; Hugues, M.; Lazdunski, M.; *Biochemistry* **1981**, 20, 5245-5252
- [52] Catterall, W. A.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, 20, 15-43
- [53] Vincent, J. P.; Balerna, M.; Barhanin, J.; Fosset, M.; Lazdunski, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1646-50
- [54] Bermann, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235-42
Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>)
- [55] Pallaghy, P. K.; Scanlon, M. J.; Monks, S. A.; Norton, R. S.; *Biochemistry* **1995**, 34, 3782-94
- [56] Monks, S. A.; Pallaghy, P. K.; Scanlon, M. J.; Norton, R. S.; *Structure* **1995**, 3, 791-803
- [57] Widmer, H.; Billeter, M.; Wüthrich K.; *Proteins* **1989**, 6, 357-71
- [58] Manoleras, N.; Norton, R. S.; *Biochemistry* **1994**, 33, 11051-61

- [59] Driscoll, P. C.; Gronenborn, A. M.; Béress, L.; Clore, G. M.; *Biochemistry* **1989**, 28, 2188-98
- [60] Lourenco, W. R.; *Biogeographica* **1994**, 70, 155-160
- [61] Possani, L. D.; Becerril, B.; Delepierre, M.; Tytgat, J.; *Eur. J. Biochem. (FEBS)* **1999**, 264, 287-300
- [62] Habermehl, G. G.; in *Gift-Tiere und ihre Waffen*, Springer-Verlag, Berlin **1994**
- [63] Gordon, D.; Savarin, P.; Gurevitz, M.; Zinn-Justin, S.; *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **1998**, 17, 131-158
- [64] CLUSTALW: Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J.; *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4673-4680 (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>)
- [65] Sautiere, P.; Cestele, S.; Kopeyan, C.; Martinage, A.; Drobecq, H.; Doljansky, Y.; Gordon, D.; *Toxicon* **1998**, 36, 1141-54
- [66] Vargas, O.; Martin, M. F.; Rochat, H.; *Eur. J. Biochem.* **1987**, 162, 589-99
- [67] Gilles, N.; Blanchet, C.; Shichor, I.; Zaninetti, M.; Lotan, I.; Bertrand, D.; Gordon, D.; *J. Neurosci.* **1999**, 19, 8730-9
- [68] Gilles, N.; Chen, H.; Wilson, H.; Le Gall, F.; Montoya, G.; Molgo, J.; Schonherr, R.; Nicholson, G.; Heinemann, S. H.; Gordon, D.; *Eur. J. Neurosci.* **2000**, 12, 2823-32
- [69] Srairi-Abid, N.; Mansuelle, P.; Mejri, T.; Karoui, H.; Rochat, H.; Sampieri, F.; El Ayeb, M.; *Eur. J. Biochem. (FEBS)* **2000**, 267, 5614-20
- [70] Burley, S. K.; Petsko, G. A.; *Adv. Protein Chem.* **1988**, 39, 125-89
- [71] Smith, G. D.; Blessing, R. H.; Ealick, S. E.; FontecillaCamps, J. C.; Hauptman, H. A.; Housset, D.; Langs, D. A.; *Acta Cryst.* **1997**, D53, 551-557
- [72] Pintar, A.; Possani, L. D.; Delepierre, M.; *J. Mol. Biol.* **1999**, 287, 359-67
- [73] Miller, M. K.; Whyte, I. M.; White, J.; Keir, P. M.; *Toxicon* **2000**, 38, 409-27
- [74] Gray, M. R.; Sutherland, S. K.; in *Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin **1978**, S. 121-148
- [75] Wang, X.; Smith, R.; Fletcher, J. I.; Wilson, H.; Wood, C. J.; Howden, M. E.; King, G. F.; *Eur. J. Biochem.* **1999**, 264, 488-94
- [76] Sheumack, D. D.; Claassens, R.; Whiteley, N. M.; Howden, M. E.; *FEBS Lett.* **1985**, 181, 154-6
- [77] Brown, M. R.; Sheumack, D. D.; Tyler, M. I.; Howden, M. E.; *Biochem. J.* **1988**, 250, 401-5
- [78] Szeto, T. H.; Birinyi Strachan, L. C.; Smith, R.; Connor, M.; Christie, M. J.; King, G. F.; Nicholson, G. M.; *FEBS Lett.* **2000**, 470, 293-299
- [79] Nicholson, G. M.; Walsh, R.; Little, M. J.; Tyler, M. I.; *Pflügers Arch.* **1998**, 436, 117-126
- [80] Nicholson, G. M.; Willow, M.; Howden, M. E.; Narahashi, T.; *Pflügers Arch.* **1994**, 428, 400-9
- [81] Hanck, D. A.; Sheets, M. F.; *J. Gen. Physiol.* **1995**, 106, 601-16
- [82] Pallaghy, P. K.; Alewood, D.; Alewood, P. F.; Norton, R. S.; *FEBS Lett.* **1997**, 419, 191-196
- [83] Fletcher, J. I.; Chapman, B. E.; Mackay, J. P.; Howden, M. E.; King, G. F.; *Structure* **1997**, 5, 1525-1535
- [84] Temple, M. D.; Hinds, M. G.; Sheumack, D. D.; Howden, M. E.; Norton, R. S.; *Toxicon* **1999**, 37, 485-506

- [85] Jones, S.; Thornton, J. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13-20
- [86] Janin, J.; Chothia, C.; *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 16027-30
- [87] de Vos, A. M.; Ultsch, M.; Kossiakoff, A. A.; *Science* **1992**, 255, 306-312
- [88] Clackson, T.; Wells, J. A.; *Science* **1995**, 267, 383-386
- [89] Cunningham, B. C.; Wells, J. A.; *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 554-563
- [90] Bogan, A. A.; Thorn, K. S.; *J. Mol. Biol.* **1998**, 280, 1-9
- [91] Sheinerman, F. B.; Norel, R.; Honig B.; *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 153-9
- [92] Cunningham, B. C.; Wells, J. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 3407-11
- [93] Schappach, A.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2000**
- [94] Gaedt, K.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**
- [95] PROCHECK-NMR: Laskowski, R. A.; Rullmannn, J. A.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R.; Thornton, J. M.; *J. Biomol. NMR* **1996**, 8, 477-486
- [96] MacArthur, M. W.; Thornton, J. M.; *Proteins* **1993**, 17, 232-251
- [97] NMRCLUST: Kelley, L. A.; Gardner, S. P.; Sutcliffe, M. J.; *Protein Eng.* **1996**, 9, 1063-1065
- [98] NMRCORE: Kelley, L. A.; Gardner, S. P.; Sutcliffe, M. J.; *Protein Eng.* **1997**, 10, 737-741
- [99] Hyberts, S. G.; Goldberg, M. S.; Havel, T. F.; Wagner G.; *Protein Sci.* **1992**, 1, 736-51
- [100] INSIGHTII / DISCOVER / HOMOLOG Y / DELPHI: Biosym Technologies, Inc./Molecular Simulations (MSI), San Diego, USA (Version 98.0 und 2000)
- [101] UHBD: Antosiewicz, J.; McCammon, J. A.; Gilson, M. K.; *J. Mol. Biol.* **1994**, 238, 415-436
- [102] HYBRID: Gilson, M. K.; *Proteins* **1993**, 15, 266-282
- [103] Warwicker, J.; Watson, H. C.; *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 671-9
- [104] Laberge, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1386, 305-330
- [105] Harvey, S. C.; *Proteins* **1989**, 5, 78-92
- [106] Klapper, I.; Hagstrom, R.; Fine, R.; Sharp, K.; Honig, B.; *Proteins* **1986**, 1, 47-59
- [107] Paulin, G.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1997**
- [108] Bashford, D.; Karplus, M.; *Biochemistry* **1990**, 29, 10219-10225
- [109] Antosiewicz, J.; Briggs, J. M.; Elcock, A. H.; Gilson, M. K.; McCammon, J. A.; *J. Comp. Chem.* **1996**, 17, 1633-1644
- [110] Bashford, D.; Karplus, M.; *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 9556-9561
- [111] Tanford, C.; Roxby, R.; *Biochemistry* **1972**, 11, 2192-2198
- [112] Beroza, P.; Fredkin, D. R.; Okamura, M. Y.; Feher, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 5804-5808
- [113] FAME: Hauswald, M.; Dissertation, Freie Universität Berlin **1998**
- [114] Hodgkin, E. E.; Richards, W. G.; *Int. J. Quant. Chem.* **1987**, 14, 105-110
- [115] Hauswald, M.; private Kommunikation
- [116] Tugarinov, V.; Kustanovich, I.; Zilberberg, N.; Gurevitz, M.; Anglister, J.; *Biochemistry* **1997**, 36, 2414-24
- [117] Billeter, M.; *Q. Rev. Biophys.* **1992**, 25, 325-77

- [118] Wagner, G.; Hyberts, S. G.; Havel, T. F.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 167-98
- [119] Brunger, A. T.; *Nat. Struct. Biol.* **1997**, Suppl. 862-5
- [120] Li, A.; Daggett, V.; *Protein Eng.* **1995**, 8, 1117-28
- [121] PROCHECK: Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M.; *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 283-291
- [122] MOLCAD: Heiden, W.; Moeckel, G.; Brickmann, J.; *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1993**, 7, 503-514
- [123] Bundi, A.; Wüthrich, K.; *Biopolymers* **1979**, 18, 285-297
- [124] Gooley, P. R.; Blunt, J. W.; Béress, L.; Norton, R. S.; *Biopolymers* **1988**, 27, 1143-1157
- [125] Housset, D.; Habersetzer-Rochat, C.; Astier, J. P.; Fontecilla-Camps, J. C.; *J. Mol. Biol.* **1994**, 238, 88-103
- [126] Ponder, J. W.; Richards, F. M.; *J. Mol. Biol.* **1987**, 193, 775-791
- [127] Gallagher, M. J.; Blumenthal, K. M.; *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 13958-13963
- [128] Khera, P. K.; Benzinger, G. R.; Lipkind, G.; Drum, C. L.; Hanck, D. A.; Blumenthal, K. M.; *Biochemistry* **1995**, 34, 8533-8541
- [129] Dias-Kadambi, B. L.; Combs, K. A.; Drum, C. L.; Hanck, D. A.; Blumenthal, K. M.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 23828-23835
- [130] Dias-Kadambi, B. L.; Drum, C. L.; Hanck, D. A.; Blumenthal, K. M.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 9422-9428
- [131] Gallagher, M. J.; Blumenthal, K. M.; *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 254-259
- [132] Khera, P. K.; Blumenthal, K. M.; *Biochemistry* **1996**, 35, 3503-3507
- [133] Kelso, G. J.; Drum, C. L.; Hanck, D. A.; Blumenthal, K. M.; *Biochemistry* **1996**, 35, 14157-14164
- [134] Khera, P. K.; Blumenthal, K. M.; *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 921-925
- [135] Barhanin, J.; Hugues, M.; Schweitz, H.; Vincent, J. P.; Lazdunski, M.; *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 5764-5769
- [136] Stengelin, S.; Rathmayer, W.; Wunderer, G.; Béress, L.; Hucho, F.; *Anal. Biochem.* **1981**, 113, 277-85
- [137] Gould, A. R.; Mabbutt, B. C.; Norton, R. S.; *Eur. J. Biochem.* **1990**, 189, 145-153
- [138] Benzinger, G. R.; Drum, C. L.; Chen, L. Q.; Kallen, R. G.; Hanck, D. A.; Hanck, D.; *Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)* **1997**, 434, 742-9
- [139] Gruen, L. C.; Norton, R. S.; *Biochem. Int.* **1985**, 11, 69-76
- [140] Norton, R. S.; Norton, T. R.; Sleigh, R. W.; Bishop, D. G.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 213, 87-97
- [141] Gilson, M. K.; Honig, B.; H.; *Proteins* **1988**, 3, 32-52
- [142] Monks, S. A.; Gould, A. R.; Lumley, P. E.; Alewood, P. F.; Kem, W. R.; Goss, N. H.; Norton, R. S.; *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1207, 93-101
- [143] Fontecilla-Camps, J. L.; Habersetzer-Rochat, C.; Rochat, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7443-7447
- [144] Couraud, F.; Jover, E.; Dubois, J. M.; Rochat, H.; *Toxicon* **1982**, 9-16
- [145] Zilberberg, N.; Froy, O.; Loret, E.; Cestèle, S.; Arad, D.; Gordon, D.; Gurevitz, M.; *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 14810-6

- [146] Gilles, N.; Krimm, I.; Bouet, F.; Froy, O.; Gurevitz, M.; Lancelin, J. M.; Gordon, D.; *J. Neurochem.* **2000**, 75, 1735-45
- [147] Darbon, H.; in *Protein Structure-Function*, TWEL Publishers, New York **1990**, S. 169-181
- [148] Darbon, H.; Jover, E.; Couraud, F.; Rochat, H.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1983**, 22, 179-86
- [149] Kharrat, R.; Darbon, H.; Granier, C.; Rochat, H.; *Toxicon* **1990**, 28, 509-23
- [150] Kharrat, R.; Darbon, H.; Rochat, H.; Granier, C.; *Eur. J. Biochem.* **1989**, 181, 381-90
- [151] El Ayeb, M.; Darbon, H.; Bahraoui, E. M.; Vargas, O.; Rochat, H.; *Eur. J. Biochem.* **1986**, 155, 289-94
- [152] Ullmann, G. M.; Hauswald, M.; Jensen, A.; Knapp, E. W.; *Proteins* **2000**, 38, 301-309
- [153] Weiner, S. J.; Kollmann, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A.; *J. Comp. Chem.* **1986**, 7, 230-252
- [154] El Ayeb, M.; Bahraoui, E. M.; Granier, C.; Rochat, H.; *Biochemistry* **1986**, 25, 6671-8

A Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

ACTX	Atracotoxin
AOP	<i>angular order-Parameter</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
CHS	<i>conserved hydrophobic surface</i>
CVFF	<i>Consistent Valence Forcefield</i>
et al.	et alii
f	die folgende Seite
FDPB	<i>finite difference-Methode zur Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung</i>
LD	Letaldosis
LSD	<i>local structural domain</i>
MD	Moleküldynamik
MEP	molekulares elektrostatisches Potential
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PDB	Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
RF	repräsentativer <i>frame</i> eines <i>clusters</i>
RMS	<i>root mean square</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
s.	siehe
S; SS	Segment; <i>short segment</i>
sp.	Art (species)
syn.	synonym
vdW	van-der-Waals
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Einheiten

Å	Ångström, 10^{-10} m
K	Kelvin (0 K = -273,15 °C)
kcal	Kilokalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
kT/e	Einheit des molekularen elektrostatischen Potentials, Tesla (T), elektrische Elementarladung ($e = 1,6022 \cdot 10^{-19}$ C) (Umrechnung (bei 298 K): 1 kT = 0,592 kcal/mol)
ps	Picosekunde (1 ps = 10^{-12} s)

B Hardware

Silicon Graphics Workstations:

IRIS INDIGO² R10000

IRIS O2 R5000

IRIS O2 R12000

Silicon Graphics Origin 2000

mit 38 R10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

C Software

DELPHI	INSIGHTII-Modul zur Untersuchung von elektrostatischen Eigenschaften
DISCOVER	Rechenmodul des Programmpakets INSIGHT II der Firma MSI, mit dem molekülmechanische und moleküldynamische Berechnungen in verschiedenen Kraftfeldern durchgeführt werden können
FAME	Programm zur Optimierung von Überlagerungen unterschiedlicher Moleküle auf der Basis des elektrostatischen Potentials und des Überlappungsvolumens
INSIGHTII	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHTII der Firma MSI zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
HOMOLOGY	INSIGHTII-Modul zur Generierung von Proteinmodellen
MOLCAD	Programm zur Untersuchung hydrophober Eigenschaften
NMRCORE	Programm zur Erfassung der <i>local structural domains</i> eines Proteinensembles
NMRCLUST	Programm zur Einteilung eines Proteinensembles in Gruppen entsprechend der strukturellen Ähnlichkeiten
PROCHECK, PROCHECK-NMR	Programme zur Überprüfung der stereochemischen Eigenschaften von Proteinstrukturen
SYBYL	Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS mit Schnittstellen zu den Programmen FAME (nicht kommerziell) und MOLCAD
UDBD, HYBRID	Programme zur Untersuchung von elektrostatischen Eigenschaften und zur Durchführung von moleküldynamischen Berechnungen (UHDB)

D Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode

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

E Kraftfeld-Terme des CVFF

Die Gesamtenergie E_{ges} eines Moleküls ergibt sich im *Consistent Valence Forcefield* aus den Standardenergietermen (ohne Berücksichtigung der Kreuzterme):

$$E_{ges} = E_B + E_W + E_T + E_{oop} + E_{vdW} + E_{ele}$$

Dabei werden folgende Terme eingesetzt (ohne Berücksichtigung des Morse-Potentials für die Bindungslängenenergie):

Bindungslängenenergie E_B	$E_B = \sum k_d (d - d_0)^2$	k_d	Bindungslängen-Kraftkonstante (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
		d	aktuelle Bindungslänge (Å)
		d_0	Referenz-Bindungslänge (Å)
Bindungswinkelenergie E_W	$E_W = k_\theta (\theta - \theta_0)^2$	k_θ	Bindungswinkel-Kraftkonstante (kcal mol ⁻¹ rad ⁻²)
		θ	aktueller Bindungswinkel (Grad)
		θ_0	Referenz-Bindungswinkel (Grad)
Torsionswinkelenergie E_T	$E_T = \sum k_T [1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)]$	k_T	halbe Torsionsbarriere (kcal mol ⁻¹)
		n	Periodizität
		φ	aktueller Torsionswinkel (Grad)
		φ_0	Referenz-Torsionswinkel (0° oder 180°)
Out-of-plane-Energie E_{oop}	$E_{oop} = \sum k_{oop} \chi^2$	k_{oop}	Kraftkonstante der out-of-plane-Energie
		χ	aktueller fiktiver Torsionswinkel
		χ_0	fiktiver Referenztorsionswinkel
van-der-Waals-Energie E_{vdW}	$E_{vdW} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$	A_{ij}	Konstante im repulsiven Term (kcal mol ⁻¹ Å ¹²)
		B_{ij}	Konstante im attraktiven Term (kcal mol ⁻¹ Å ⁶)
		r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
Elektrostatische Energie E_{ele} (Coulomb-Potential)	$E_{ele} = \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon}$	q_i, q_j	Ladungen der Atome i, j
		r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
		ϵ	Dielektrizitätskonstante

F Eingabedateien

F1 MD-Simulation zur Anpassung der Wasserbox

Zur Generierung stabiler Konformere der einzelnen Polypeptide mit Hilfe von MD-Simulationen wurden die Moleküle zunächst in die äquilibrierte Wasserbox eingebracht. Anschließend wurde den Wassermolekülen die Anpassung nach folgendem Protokoll ermöglicht:

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 15
  cutdis = 14
  swtdis = 1.5
!
  begin simulation
  *   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  reduce
!
  set dielectric = 4
!
! Wassermoleküle und Wasserstoffatome des Polypeptids (ATXIa) frei
! beweglich; Minimierung und kurze MD-Simulation
!
  Fixed atom list generation
  *   add heavy
  *   molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  Minimize
  *   no cross terms
  *   no morse
  *   for 2000 iterations
  *   using steep descents
  *   until the maximum derivative is less than 10.000000 kcal/
!
  demax = 10000
  initialize dynamics
  *   for 1000 iterations
  *   at 310.000 K
  *   steps of 1.000
  *   no cross terms
  *   no morse
  *   write history file every 500 steps
!
  resume dynamics
  *   for 20000 iterations
  *   at 310.000 K
  *   no cross terms
  *   no morse
!
  Minimize
  *   no cross terms
  *   no morse
  *   for 2000 iterations
  *   using steep descents
  *   until the maximum derivative is less than 10.000000 kcal/
!
  archive as file number 1
  end
```

F2 MD-Simulation der Polypeptide

Nach der Anpassung der Wassermoleküle (s. Anhang F1) wurde die MD-Simulation der Polypeptide nach folgendem Protokoll durchgeführt:

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 15
  cutdis = 14
  swtdis = 1.5
!
  begin simulation
  * add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  reduce
!
  set dielectric = 4
!
! Nach einer kurzen Minimierung wird die MD-Simulation des Polypeptids
! (ATXIa) durchgeführt.
!
  tethered list
  * add all
  * molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  force omega to trans using 20 kcal/mole
  * in molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  Minimize
  * template force constant of 200.0 kcal/A2
  * no cross terms
  * no morse
  * for 100 iterations
  * using steep descents
  * until the maximum derivative is less than 10.000000 kcal/
!
  Minimize
  * no cross terms
  * no morse
  * for 1000 iterations
  * using conjugate gradient
  * until the maximum derivative is less than 1.0000000 kcal/
!
  demax = 10000
  initialize dynamics
  * template force constant of 200.0 kcal/A2
  * for 2000 iterations
  * at 310.000 K
  * steps of 1.000
  * no cross terms
  * no morse
  * write history file every 2000 steps
!
  resume dynamics
  * template force constant of 200.0 kcal/A2
  * for 20000 iterations
  * at 310 K
  * steps of 1.000
  * no cross terms
  * no morse
```

```
!
  resume dynamics
  *   template force constant of 100.0 kcal/A2
  *   for 20000 iterations
  *   at 310 K
  *   steps of      1.000
  *   no cross terms
  *   no morse
!
  tethered list
  *   clear
!
  tethered list
  *   add main GLYN 1 to GLNC 46
  *   molecule 1 residue
!
  force omega to trans using 20 kcal/mole
  *   in molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  resume dynamics
  *   template force constant of 50.0 kcal/A2
  *   for 20000 iterations
  *   at 310 K
  *   steps of      1.000
  *   no cross terms
  *   no morse
!
  resume dynamics
  *   template force constant of 10.0 kcal/A2
  *   for 20000 iterations
  *   at 310 K
  *   steps of      1.000
  *   no cross terms
  *   no morse
! Freie MD-Simulation
!
  tethered list
  *   clear
!
  force omega to trans using 20 kcal/mole
  *   in molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  iloop = 1
100 resume dynamics
  *   for 20000 iterations
  *   at 310 K
  *   steps of      1.000
  *   no cross terms
  *   no morse
  iloop = iloop + 1
  if iloop .le. 6 then 100
!
  end
```

F3 Energieminimierung der repräsentativen *frames* aus der freien MD-Simulation

Die 60 *frames* aus den freien MD-Simulationen wurden in konformatorisch ähnliche Gruppen (*cluster*) eingeteilt und repräsentative Vertreter dieser cluster anschließend durch eine Energieminimierung optimiert.

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 15
  cutdis = 14
  swtdis = 1.5
!
  begin simulation
*   coordinate file="atxIa_fr8.car"
*   molecular data file="atxIa_fr8.mdf"
*   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  reduce
!
  set dielectric = 4
!
  iloop = 1
100 retrieve file number iloop "unmin_rep1_3.arc"
!
  force omega to trans using 20 kcal/mole
*   in molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  tethered list
*   add all
*   molecule 1 residue GLYN 1 to GLNC 46
!
  template force with a force constant of 500.0 kcal/A2
*   no cross terms
*   no morse
*   for 2000 iterations
*   using steep descents
*   until the maximum derivative is less than 5.000000000 kcal/A
!
  template force with a force constant of 500.0 kcal/A2
*   no cross terms
*   no morse
*   for 2000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 5.000000000 kcal/A
!
  template force with a force constant of 100.0 kcal/A2
*   no cross terms
*   no morse
*   for 2000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 5.000000000 kcal/A
!
  template force with a force constant of 50.0 kcal/A2
*   no cross terms
*   no morse
*   for 2000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A
```

```
!
  template force with a force constant of 10.0 kcal/A2
  *   no cross terms
  *   no morse
  *   for 2000 iterations
  *   using conjugate gradient
  *   until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A
!
  template force with a force constant of 0.0 kcal/A2
  *   no cross terms
  *   no morse
  *   for 5000 iterations
  *   using conjugate gradient
  *   until the maximum derivative is less than 0.100000000 kcal/A
!
  print energy/molecule
  *   add
  *   molecule 1
!
  archive as file number iloop "min_rep1_3.arc"
  iloop = iloop + 1
  if iloop .le. 3 then 100
!
!
  end
```

F4 *Simulated Annealing*-Protokoll für die MD-Simulation von δ -ACTX-Ar1

Die verwendeten 150 Restraints stammen aus der Protein Data Bank (PDB: 1qdp). Durch diese Abstands-Restraints kann die Entfernung zwischen zwei Atomen mit Hilfe einer Kraftkonstante auf einem vorgegebenen Wert gehalten werden. Bei der Simulation wurde jeweils kurzzeitig (2 ps) auf 600 K aufgeheizt, und für den nachfolgenden Abkühlungsprozess lag der TIMTMP-Faktor bei 2. Durch dieses langsame Abkühlen kann das System eine günstige Konformation einnehmen. Auch bei dieser Simulation wurde vorher den Wassermolekülen eine Anpassung an das Polypeptid nach Anhang F1 ermöglicht.

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 15
  cutdis = 14
  swtdis = 1.5
!
  begin simulation
*   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  reduce
!
  set dielectric = 4
!
  constrain using "1qdp.rstrnt"
!
  force omega to trans in molecule 1
*   in residue except CYS 16 using 20 kcal/mole
!
  Minimize
*   no cross terms
*   no morse
*   for 1000 iterations
*   using steep descents
*   until the maximum derivative is less than 1.000000 kcal/

  Minimize
*   no cross terms
*   no morse
*   for 2000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 0.100000 kcal/
!
  archive as file number 1
!
  demax = 10000
  initialize dynamics
*   for 2000 iterations
*   at 600 K
*   steps of 1.000
*   no cross terms
*   no morse
*   write history file every 2000 steps
```

```
      iloop = 1
100  resume dynamics
      *    for 2000 iterations
      *    at 600 K
      *    steps of    1.000
      *    no cross terms
      *    no morse
!
!
      TIMTMP = 2
!
      resume dynamics
      *    for 10000 iterations
      *    at 310 K
      *    steps of    1.000
      *    no cross terms
      *    no morse
!
      iloop = iloop + 1
      if iloop .le. 10 then 100
!
      end
```

F5 Eingabedatei für FAME

```
# Instruction file for FAME (created by SYBYL-Menu FAME)
#
# create by phlst at Tue Aug 1 12:52:30 2000
#
MOLECULE apbnmr7_mrep12aahii_2Aug.mdb/apb_nmr7.mol2
MOLECULE apbnmr7_mrep12aahii_2Aug.mdb/mrep12_aahii.mol2
TRIALS TOTAL 100
TRIALS CONF 1

WEIGHT STERIC 0.40
WEIGHT ELECTROSTATIC 0.60
WEIGHT HBOND 0.00

#ALPHA STERIC 0.60
#ALPHA ELECTROSTATIC 0.40
#ALPHA HBOND 0.60

gaussian elec 2

SEED 1968
SCALE 0.40

WRITESCO 4
RMS 0
PENALTY 0.001

OPT MULTISTART
FFFILE /sftw/fame/128/params/params.syb
#SELECT 1
#SAMPLING CONFORMATION
#SELECT 2
#SAMPLING ALL
```

G INSIGHTII-BCL-Macros

Die folgenden, in BCL-Programmiersprache (Biosym Command Language) geschriebenen Macros sind zum Einlesen in die Software INSIGHTII geeignet.

G1 DYN_AUSWERTUNG.bcl

Das BCL-Macro DYN_AUSWERTUNG.bcl wurde verwendet, um eine Koordinaten-Datei im PDB-Format für die *frames* aus der Trajektorie einer MD-Simulationen zu erzeugen. Das Umschreiben der Datei mit Hilfe von `nawk_BIOSYM_PDB_2000` (für INSIGHTII 2000) ist erforderlich, wenn die Datei mit den Programmen PROCHECK-NMR sowie NMRCORE und NMRCLUST bearbeitet werden soll.

Für die Anwendung von DYN_AUSWERTUNG.bcl muss die Trajektorie eingelesen werden. Durch das Macro wird ein Verzeichnis KOORDINATENFILES erzeugt, in dem die einzelnen *frames* der Trajektorie gespeichert werden. Anschließend werden alle *frames* eingelesen, in einem *assembly* (*_assemb) zusammengefasst und als solches im Biosym- (*_ass.car) und PBD-Format (*_ass.pdb.biosym) gespeichert. Das `nawk`-Skript `nawk_BIOSYM_PDB_2000` nummeriert die einzelnen *frames* der PDB-Datei (*_ass.pdb).

```
Define_Macro dyn_auswertung \
  Lstring Molekuel \
  Int frames

  Int index, index_1, index_2
  Sstring dir
  Lstring File, File2

Set_Param_Pick Molekuel MOLECULE_ASSEMBLIES
Unix ( "mkdir KOORDINATENFILES" )
print "Directory 'KOORDINATENFILES' erzeugt"

print "Abspeichern der frames"
Foreach $index from 1 to $frames
  print $index
  Conformation Trajectory Frame $index
  dir = "KOORDINATENFILES"
  Put Molecule Biosym $Molekuel \
  ($dir//"/"//"$Molekuel//"_F"//$index) \
  -Transformed -Displayed -PBC_File
End

Conformation Trajectory Original

print "Einlesen der frames"
Foreach $index_1 from 1 to $frames
  Get Molecule Archive Frame 1 \
  ($dir//"/"//"$Molekuel//"_F"//$index_1) \
  ($Molekuel//"_F"//$index_1) -Reference_Object
End
```

```

Associate Assembly ($Molekuel//"_F1") ($Molekuel//"_F2") \
  ($Molekuel//"_/"assemb")

Foreach $index_2 from 3 to $frames
  Add Assembly ($Molekuel//"_F"//$index_2) ($Molekuel//"_/"assemb")
End

Put Molecule Biosym ($Molekuel//"_/"assemb") \
  ($Molekuel//"_ass") Transformed -Displayed \
  -PBC_File -Reference_Object
Put Molecule PDB ($Molekuel//"_/"assemb") \
  ($Molekuel//"_ass.pdb.biosym") Transformed -Displayed \
  -Insight_Style

File = ($Molekuel//"_ass.pdb.biosym")
File2 = ($Molekuel//"_ass.pdb")

Unix ("nawk -f nawk_BIOSYM_PDB_2000 "$File/" > "$File2)

End_Macro

Add_To_Pulldown dyn_auswertung Custom

```

Folgendes nawk-Skript wird als nawk_BIOSYM_PDB_2000 verwendet:

```

BEGIN {zaehler = 1
  printf "%s%9s\n" , "MODEL", zaehler
  zaehler = (zaehler + 1)}

/ATOM/ {print $0}

/TER/ {
  print $0
  printf "%s\n%s%9s\n" , "ENDMDL","MODEL", zaehler
  zaehler = (zaehler + 1) }

END { printf "%s\n" , "ENDMDL" }

```

G2 SUPERPOS_TEIL.bcl

Das Macro SUPERPOS_TEIL.bcl überlagert mehrere *frames* eines Moleküls auf speziell angegebene Aminosäuren. Dabei können die Atome (*Wahl*) der zu überlagernden Aminosäuren (*AS_file*) und das Referenzmolekül (*Ziel*) frei gewählt werden.

```

Define_Macro superpositionieren \
  Lstring Molekuel \
  Int Konform_anzahl \
  Int Ziel \
  Enumer Wahl \
  Lstring AS_file

  Int index
  Lstring AS
  Float RMSD
  Lstring Ergeb_superp

Set_Param_Pick Molekuel MOLECULE_ASSEMBLIES
Def_Enum Wahl Atom
Def_Enum Wahl Backbone
Def_Enum Wahl Trace
Def_Enum Wahl Heavy

Foreach $index from 1 to $Konform_anzahl
  If ($index != $Ziel)
    While ({Read $AS_file "%s" $AS})
      Superimpose -End_Definition $Wahl -"Label Mode" \
        ($Molekuel//$index//":"//$AS) \
        ($Molekuel//$Ziel//":"//$AS)
    End
    close $AS_file
    RMSD = {Superimpose End_Definition}
  End
End

End_Macro

Add_To_Pulldown superpositionieren

```

G3 RMS_TRAJ_GRAPH.bcl

Das Macro RMS_TRAJ_GRAPH.bcl vergleicht die Ausgangskonformation einer MD-Simulation mit den *frames* der Trajektorie. Hierfür wird der RMS-Wert zwischen der Ausgangskonformation und dem jeweiligen *frame* für ausgewählte Atome (*atome*) bestimmt. Die RMS-Werte für die einzelnen Überlagerungen werden in einer Datei gespeichert (*_RMS.tbl) und als Graph dargestellt.

```

Define_Macro RMS_analyse \
  Lstring Molekuel \
  Enumer atome \
  Int frames

  Int index
  float rmsd

Set_Param_Pick Molekuel MOLECULE_NAME
Def_Enum atome Atom
Def_Enum atome Backbone
Def_Enum atome Trace
Def_Enum atome Heavy

Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "#" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "TITLE: Frame" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" \
  "MEASUREMENT TYPE: " "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" \
  "UNITS OF MEASUREMENT: " "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" \
  "FUNCTION: frame" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "#" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "TITLE: RMSD" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" \
  "MEASUREMENT TYPE: " "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" \
  "UNITS OF MEASUREMENT: " "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "FUNCTION: rmsd" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "#" "\n"
Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%s" "#" "\n"

Copy Object -To_Clipboard -Displace $Molekuel Startkonf
Foreach $index From 1 to $frames
  Conformation Trajectory Frame $index
  print $index
  Superimpose -End_Definition $atome "Label Mode" $Molekuel Startkonf
  rmsd = {Superimpose End_Definition}
  Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%13d" $index "\t"
  Write ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl") "%13f" $rmsd "\n"
End

Delete Object Startkonf
Conformation Trajectory Original
Get Graph -List -Use_Standard ($Molekuel//"_"/>atome//"_RMS.tbl")
New_Graph frame rmsd None

End_Macro

Add_To_Pulldown RMS_analyse Custom

```

G4 EXTENTS_TRAJ.bcl

Bei einer MD-Simulation in einer Wasserbox mit periodischen Randbedingungen kann bei einem zu niedrigen *cutoff* für nichtkovalente Wechselwirkungen das Polypeptid in der Nachbarbox erreicht werden. Das Macro EXTENTS_TRAJ.bcl wurde zur Kontrolle der Ausdehnung des Moleküls verwendet. Für eine eingelesene Trajektorie werden die maximalen und minimalen x-, y- und z-Koordinaten bestimmt und in eine Datei geschrieben (EXTENTS). Zusätzlich werden durch das *nawk*-Skript *nawk_EXTENTS* die jeweiligen Differenzen gebildet (EXTENTS_DIFF).

```

Define_Macro extents \

Lstring Molekuel \
Int Frames

Int index

Set_Param_Pick Molekuel MOLECULE_ASSEMBLIES

print "original"

Write INDEX "%s" ">>> ORIGINAL" "\t"
Write INDEX "%s" "<<<" "\n"
Close INDEX
Unix ("cat INDEX >> EXTENTS")
Unix ("rm INDEX")

List Molecule Extents ($Molekuel//"_1") Output_File EXTENTS_A
Unix ("cat EXTENTS_A >> EXTENTS")
Unix ("rm EXTENTS_A")

Foreach $index from 1 to $Frames

    Conformation Trajectory Frame $index

    print "frame " $index
    Write INDEX "%s" ">>> FRAME" "\t"
    Write INDEX "%d" $index "\t"
    Write INDEX "%s" "<<<" "\n"
    Close INDEX
    Unix ("cat INDEX >> EXTENTS")
    Unix ("rm INDEX")

    List Molecule Extents ($Molekuel//"_1") Output_File EXTENTS_A
    Unix ("cat EXTENTS_A >> EXTENTS")
    Unix ("rm EXTENTS_A")

End

Unix ("nawk -f nawk_EXTENTS EXTENTS > EXTENTS_DIFF")
Conformation Trajectory Original

End_Macro

Add_To_Pulldown extents Custom

```

Folgendes `nawk`-Skript wurde als `nawk_EXTENTS` eingesetzt:

```
/ORIGINAL/ {print $0}
/FRAME/ {print $0}
/MIN/ {printf "\t%s\t%s\t%s\n" , "MIN","MAX","DIFF"}
/X:/ {printf "%s\t%.2f\t%.2f\t%.2f\n" , $1,$2,$3,($3-$2)}
/Y:/ {printf "%s\t%.2f\t%.2f\t%.2f\n" , $1,$2,$3,($3-$2)}
/Z:/ {printf "%s\t%.2f\t%.2f\t%.2f\n" , $1,$2,$3,($3-$2)}
```


An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der Promotionszeit in Düsseldorf unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn A. Kuhn für die gute Einführung zu Beginn der Arbeit, die Hilfe bei der Skriptprogrammierung sowie für viele Diskussionen.

Frau Dr. F. Stoll für die kritische Durchsicht des Manuskripts, die vielen Anmerkungen und die Telefonseelsorge in der Endphase.

Herrn Dr. K.-J. Schleifer für die ständige Diskussionsbereitschaft, die Tipps für den Umgang mit Toxinen und die hartnäckigen Erinnerungen, den Mittwochsauftreff nicht zu verpassen.

Frau Dr. M. Gurrath für die Hilfe bei Fragen zur NMR-Spektroskopie.

Herrn Dr. M. Hauswald für zahlreiche Tipps und Anmerkungen, die mir eine große Hilfe waren.

Herrn P. Sippel und Herrn H. Köbert für die stete Hilfsbereitschaft im Umgang mit den Rechnern, die auch bei nächtlichen NIS-Supporteinsätzen nicht an Grenzen stieß.

Herrn E. Wolter für eine stets verlässliche Freundschaft und die seelisch-moralische Unterstützung, wann immer von Nöten.

Meinen Eltern für die ständige Unterstützung und Anteilnahme während des Studiums und der Promotion.

Name	Stefanie Bendels
Geburtstag/-ort	23. März 1972 in Andernach
Eltern	Agnes Bendels, geb. Zenz Heinzgerd Bendels
Familienstand	ledig
Schulbildung	
1978 - 1982	Cusanus-Schule, Münstermaifeld
1982 - 1991	Kurfürst-Balduin Gymnasium, Münstermaifeld Allgemeine Hochschulreife
Studium	
10/1991 – 02/1996	Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
04/1996	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08/1997	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/1997	Approbation als Apothekerin
05/1996 – 10/1996	Pharmaziepraktikum in der Cosmos-Apotheke, Koblenz
11/1996 – 04/1997	Pharmaziepraktikum am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Auslandsaufenthalt	
08/1995 – 09/1995	Praktikum am College of Pharmacy, University of Texas, Austin
Berufstätigkeit	
11/1996 – 02/1997	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/1997 – 02/2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
03/2001 – 06/2001	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Promotion	
08/1997	Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje
07/ 2000	Forschungsaufenthalt bei der Bayer AG, Wuppertal

