

Design und Untersuchung von Peptiden mit Calciumkanal-modulatorischem Potenzial
– Eine Molecular Modelling Studie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian J. Kirchhoff
aus Bergneustadt

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Korreferent: PD Dr. K.-J. Schleifer

Tag der mündlichen Prüfung 22. 05. 2002

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathematisch-naturwissenschaftliche/2002/kirchhoff.html>

Für meine Eltern, meinen Bruder
und meine Frau Annegret

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. H.-D. Höltje in der Zeit von Mai 1996 bis Januar 2001 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, seine Betreuung, die Möglichkeit des freien wissenschaftlichen Arbeitens und die Bereitstellung der außergewöhnlich guten Arbeitsbedingungen. Durch seine besonders kritische Beurteilung und Verwendung der Methoden des „Molecular Modelling“ hat er wesentlich zum wissenschaftlichen Vertrauen in die Ergebnisse dieser Methoden beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. K.-J. Schleifer für die sehr gute Einführung in das Thema, seinen unermüdlichen Einsatz bei der täglichen Begleitung und Beratung und abschließend die Anfertigung des Zweitgutachtens. Neben den vielen interessanten (fachlichen und privaten) Diskussionen soll auch besonders sein Engagement als Leiter des 6. Semesters „Arzneibuchanalytik“ hervorgehoben werden, durch das er nicht nur den Studenten, sondern auch uns Assistenten immer die analytisch wichtigen Aspekte des DAB leicht verständlich vermitteln konnte.

Bei PD Dr. R. Hoffmann und seinen Mitarbeitern vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf möchte ich mich für die freundliche Kooperation und ihren Einsatz bei den nicht immer einfachen Peptidsynthesen bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. S. Hering und Herrn Mag. Sokolov vom Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Innsbruck für die Messung der Peptide am Calciumkanal.

Schließlich danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises und angrenzender Institute für die ausgesprochen freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit und den lebhaften Meinungs austausch.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ZIEL DER ARBEIT	1
2	PHARMAKOLOGIE.....	3
2.1	IONENKANÄLE.....	3
2.2	CALCIUM IM MENSCHLICHEN KÖRPER UND DER ZELLE	6
2.3	CALCIUMKANÄLE	8
2.3.1	Rezeptor-aktivierbare Kanäle	8
2.3.2	Potenzial-abhängige Kanäle.....	8
2.4	WIRKUNGSWEISE DER POTENZIAL-ABHÄNGIGEN KANÄLE	9
2.5	FUNKTIONELLE UNTERTEILUNG POTENZIAL-ABHÄNGIGER KANÄLE.....	9
2.6	ZUSTÄNDE DES L-TYP-CALCIUMKANALS	11
2.7	CALCIUMKANAL-MODULATORISCHE SUBSTANZEN	11
2.7.1	Calciumkanal-Blocker – Chemische Klassifizierung	12
2.7.1.1	1,4-Dihydropyridine (DHP).....	12
2.7.1.2	Phenylalkylamine (PAA).....	13
2.7.1.3	Benzothiazepine (BTZ)	14
2.7.1.4	Wechselwirkungen an der Bindungsstelle.....	14
2.7.2	Calciumkanal-Öffner (Calciumagonisten).....	16
2.7.2.1	BAY K 8644.....	16
2.7.3	Peptide	17
2.7.3.1	Kurze Peptide	17
2.7.3.2	Schlangentoxine	18
2.7.3.3	Schlangentoxin FS2.....	19
3	METHODEN	21
3.1	PROTEIN-LIGAND-WECHSELWIRKUNG	21
3.2	PROTEINBINDUNG	21
3.2.1	Wasserstoffbrücken	22
3.2.2	Ionische Wechselwirkung.....	23
3.2.3	Hydrophobe Wechselwirkung	23
3.2.4	Kation- π Wechselwirkung.....	23
3.3	KONFORMATIONSANALYSE.....	23
3.3.1	Systematische Konformationsanalyse	24
3.3.2	Monte-Carlo-Verfahren	24

II

3.3.3	Moleküldynamiksimulation	24
3.4	PHARMAKOPHORHYPOTHESE	25
3.5	MOLEKULARE EIGENSCHAFTEN.....	25
3.5.1	Molekulares elektrostatisches Potenzial (MEP).....	26
3.5.1.1	Topologische Partialladungen.....	26
3.5.1.2	Quantenchemisch berechnete Partialladungen	26
3.5.2	Gridfelder	27
3.5.3	Connolly-Oberfläche.....	29
3.6	REGULÄRE STRUKTUREN IN PROTEINEN UND PEPTIDEN	29
3.6.1	Die Helix	30
3.6.2	Das β -Faltblatt.....	30
3.6.3	Der β -Turn	31
3.6.3.1	Rolle von Prolin im Protein/Turn	33
3.6.3.2	Rolle von Glycin im Turn.....	34
3.7	STRUKTUR VON KLEINEN CYCLISCHEN PEPTIDEN	35
3.8	MINIMIERALGORITHMEN IM INSIGHT	36
3.8.1	Steepest Descent.....	36
3.8.2	Conjugate Gradient	37
3.9	ENERGIEBERECHNUNG IM CVFF-KRAFTFELD.....	37
3.9.1	Intramolekulare Energie.....	38
3.9.2	Intermolekulare Energie.....	38
4	<u>MOLEKULARE GRUNDLAGEN</u>	<u>39</u>
4.1	DIHYDROPYRIDIN-PHARMAKOPHOR.....	39
4.1.1	Calcium-Antagonisten.....	39
4.1.2	Calcium-Agonisten	44
4.1.3	Zusammenfassung Pharmakophor	47
4.2	CHARAKTERISIERUNG VON TOXIN FS2.....	48
4.2.1	Sequenzalignment von Angusticeps-Typ III Toxinen	48
4.2.2	NMR Strukturen des Toxins	49
4.2.3	Überlagerung des Toxins mit dem DHP-Pharmakophor	51
4.2.3.1	Connolly-Oberfläche	51
4.2.3.2	MEP-Felder.....	53
4.2.3.3	GRID-Felder	55
5	<u>DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE.....</u>	<u>59</u>
5.1	VORHERSAGE VON PEPTIDISCHEN β-TURNS	59
5.1.1	Allgemeine, theoretische Methode.....	59
5.1.2	Experimentell bestimmte Konformation von cyclo-PAAPAA	59
5.1.3	Einfluss verschiedener MDS Parameter.....	61

5.1.3.1	Moleküldynamiksimulationen (MDS) in Vakuum.....	61
5.1.3.2	MDS in Wasser.....	62
5.1.3.3	MDS in modifiziertem Wasser.....	62
5.1.3.4	MDS in DMSO.....	63
5.1.3.5	Vergleichende Analyse der MDS-Parameter.....	63
5.1.4	Generierung zufälliger Startkonformationen.....	64
5.1.4.1	Zielstellung.....	64
5.1.4.2	Simulated Annealing Moleküldynamiksimulation.....	65
5.1.4.3	Auswertung der generierten Konformationen.....	66
5.1.4.4	Die fünf Startkonformationen.....	67
5.1.5	Unabhängigkeit der MDS von der Startkonformation.....	69
5.1.6	Vergleich der fünf Startkonformationen (Discover, 1093K).....	71
5.1.7	Vergleich 1093K und 1293K (Startkonformation 5, Discover).....	73
5.1.8	Vergleich Pro1-Ala2 und Pro4-Ala5 (Startkonformation 5, Discover, 1293K).....	74
5.1.9	Vergleich Discover und Discover3 (Startkonformation 3, 1293K).....	75
5.1.10	Vergleich mit Gromacs (Startkonformation 3, 1093K).....	75
5.1.11	Vergleich mit CHARMM (Startkonformation 3, Umbrella Sampling).....	77
5.1.12	Vergleich mit TINKER (<i>Diffusion Equation Method</i>).....	78
5.1.13	Experimentell bestimmte Konformation von cyclo-GAAAA.....	80
5.1.14	Zusammenfassung.....	80
5.2	DESIGN VON PEPTIDEN MIT CALCIUMANTAGONISTISCHEM POTENZIAL.....	81
5.2.1	Übersicht.....	81
5.2.2	P6Li (AMWPYQ).....	82
5.2.3	P6Cy (Cyclo-AMWPYQ).....	83
5.2.4	P12CyCC (Cyclo-CPTAMWPYQTEC-NH ₂).....	83
5.2.5	P7CyCC (Cyclo-CMWPYC-NH ₂).....	83
5.2.6	P5CyCC (Cyclo-CMWPC-NH ₂).....	83
5.2.7	P6CyCc (Cyclo-CMWPYc-NH ₂).....	84
5.2.8	P5CyCc (Cyclo-CMWPC-NH ₂).....	84
5.2.9	Geplante Charakterisierung der kleinen Peptide.....	84
5.3	L-CALCHIN (<u>L</u>-TYPE <u>C</u>ALCIUM <u>C</u>HANNEL <u>I</u>NHIBITOR).....	85
5.4	DURCHFÜHRUNG DER MOLEKÜLDYNAMIKSIMULATIONEN (MDS).....	86
5.4.1	Moleküldynamiksimulation in Wasserbox.....	86
5.4.2	Initialisierungsphase.....	87
5.4.3	Simulated-Annealing-Protokoll.....	88
5.4.4	Temperaturverlauf.....	88
5.4.5	Energieminimierung.....	89
5.4.6	Clusteranalyse.....	89
5.4.6.1	Superpositionierung.....	89
5.4.6.2	Bewertungskriterien für die Familieneinteilung.....	90
5.4.6.3	cis-Prolin.....	91
5.4.6.4	Visuelle Auswertung.....	91
5.4.6.5	Konformation der Seitenketten.....	91

IV

5.4.6.6	Lokale Minima.....	92
5.4.6.7	Familienvertreter.....	93
5.4.7	Vergleich von Peptid- zur Toxin-Konformation.....	94
5.5	AUSWERTUNG DER MOLEKÜLDYNAMIKSIMULATIONEN	95
5.5.1	P6Cy (Cyclo-AMWPYQ).....	95
5.5.2	P12CyCC (Cyclo-CPTAMWPYQTEC-NH ₂).....	97
5.5.3	P7CyCC (Cyclo-CMWPYC-NH ₂).....	98
5.5.4	P5CyCC (Cyclo-CMWPC-NH ₂).....	99
5.5.5	P6CyCc (Cyclo-CMWPYc-NH ₂).....	100
5.5.6	P5CyCc (Cyclo-CMWPC-NH ₂).....	101
5.5.7	Vergleich der cyclischen Peptide	101
5.6	P6CYCC ALS POTENZIELLER CALCIUMANTAGONIST	103
5.6.1	Auswertung der GRID Felder	103
5.6.2	Auswertung des MEP.....	106
5.7	DESIGN VON PEPTIDEN ALS POTENZIELLE CALCIUMAGONISTEN	107
5.7.1	Cyclo-CQWPYc-NH ₂	107
5.8	MÖGLICHKEITEN ZUR EXPERIMENTELLEN BESTÄTIGUNG DES MODELLS	109
5.8.1	Synthese der Peptide	109
5.8.2	Testung an Froscheizellen.....	110
5.8.3	NMR-Spektroskopische Untersuchung der Peptide.....	111

6 DISKUSSION..... 113

6.1	VORBEMERKUNG.....	113
6.2	STRUKTURUNTERSUCHUNG DER CYCLISCHEN PEPTIDE	113
6.3	STRUKTURVORSCHLAG PEPTIDISCHER CALCIUMANTAGONISTEN	115
6.4	STRUKTUR ENDOGENER PEPTIDISCHER CALCIUMAGONISTEN?.....	116
6.5	AUSBLICK	117
6.5.1	Suche nach endogenen Liganden	118
6.5.2	Ersatz der DHP durch andere β -Turn-Mimetika.....	118
6.5.3	Dihydropyridine als β -Turn-Mimetika.....	119

7 ZUSAMMENFASSUNG **123**

8 LITERATURVERZEICHNIS..... **125**

Abkürzungen und Einheiten

Å	Ångström = 10^{-10} m
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
AS	Aminosäure
BTZ	Benzothiazepine
CCK	Cholecystokinin
CSD	<u>C</u> ambridge <u>S</u> tructural <u>D</u> atabase des Cambridge Crystallographic Data Centre
DHP	1,4-Dihydropyridine
EGF	Epidermaler Growth Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
kDa	kilo Dalton
MALDI	„ <u>m</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption <u>i</u> onization“ Massenspektroskopie
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NPY	Neuropeptid Y
PAA	Phenylalkylamine
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank des Brookhaven National Laboratory seit 1.7.1999: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics: RCSB PDB [1, 2]
RP-HPLC	„ <u>r</u> everse <u>p</u> hase- <u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatographie“ Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
TFA	Trifluoressigsäure
Programme:	
GRIN/GRID	Molecular Discovery Ltd. [3]
GROMACS	BIOSON Research Institute [4]
INSIGHT/DISCOVER	Molecular Simulations (MSI) heute Accelrys [5]
SPARTAN	Wavefunction, Inc. [6]
TINKER	Prof. J. W. Ponder [7]

Die Nomenklatur der Aminosäuren folgt der IUPAC-Nomenklatur [8, 9].

1 Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Calciumantagonisten werden zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen wie Angina Pectoris und Bluthochdruck verwendet. Es fehlen bislang jedoch wichtige Erkenntnisse über ihre Wechselwirkungen mit dem Calciumkanal auf molekularer Ebene. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass es bis heute unmöglich war den Calciumkanal im funktionsfähigen Zustand zu kristallisieren und spektroskopisch die dreidimensionale Struktur aufzuklären. Erst eine solche Struktur könnte, verbunden mit Calciumantagonisten als Kokristallisat, den genauen Mechanismus der Wechselwirkung klären.

Erfolg versprechend auf diesem Weg ist die Veröffentlichung der Kristallstruktur eines Kaliumkanals [10]. Doyle gelang damit 1998 erstmals die Strukturaufklärung eines prokaryontischen Kationenkanals. Der Kaliumkanal ist relativ klein und seine Quartärstruktur besonders stabil. Daher ließ er sich in genügend großer Menge für eine Kristallisation exprimieren. Entwicklungsgeschichtlich wird er als einfachster Kanal der spannungsabhängigen Kationenkanäle in einem sehr frühen Stadium der Evolution mit dem Auftreten eukaryontischer Zellen vor 1,4 Milliarden Jahren eingeordnet. Die Calciumkanäle sind aus dem Kaliumkanal wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden. Erst nach dem Erscheinen der ersten Tiere vor etwa 700 Millionen Jahren entstanden dann durch weitere Mutationen die Natriumkanäle [11].

Bis zur vollständigen Strukturaufklärung der Calciumkanäle ist es aber noch ein steiniger Weg.

Allgemein bekannt ist die Existenz einer hochaffinen und hochspezifischen Bindungsstelle für Dihydropyridine am spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanal, die schon zur Entdeckung dieser Kanäle beitragen konnte. Der Grund für das Auftreten ist aber weiter ein Rätsel, über das bis heute spekuliert werden muss.

Wie lange Zeit mit Morphin am Opioid-Rezeptor wird mit den Dihydropyridinen am Calciumkanal nur die Bindung an der spezifischen Bindungsstelle medizinisch ausgenutzt, ohne die Struktur dieser zu kennen oder von der Existenz endogener Liganden zu wissen. Für das Morphin wurden erst 1973 von Goldstein [12] spezifische Opioid-Rezeptoren nachgewiesen und zwei Jahre später von Hughes, Kosterlitz et al. [13, 14, 15] zwei endogene Liganden aus Gehirnschubstanz isoliert, die am Opioid-Rezeptor angreifen.

Den ersten Hinweis auf die Existenz eines entsprechenden endogenen Liganden für die L-Typ-Calciumkanäle lieferte Huang [16] mit der Isolierung eines Peptids aus dem

Blutextrakt spontan-hypertensiver Ratten. Die Sequenz dieses Peptids konnte jedoch experimentell nicht aufgeklärt werden.

Diese Arbeit soll mit Methoden des Molecular Modelling Calciumkanal-modulatorische Modellpeptide entwickeln und so zu einer Vorstellung verhelfen, wie endogene Liganden aussehen könnten, die an der Dihydropyridin-Bindungsstelle des Calciumkanals angreifen. Hierbei muss bedacht werden, dass momentan keine Struktur der Bindungsstelle bekannt ist. Gelingt jedoch die Charakterisierung auf molekularer Ebene, so werden die neu gewonnenen Informationen sicherlich die Suche nach potenziellen Kandidaten der zahlreich im Körper vorhandenen Peptide erleichtern. Vielleicht ergeben sich dann auch Hinweise über die physiologische Bedeutung der Dihydropyridin-Bindungsstelle am Kanal und die mangelnde Fähigkeit des Körpers, den pathologischen Veränderungen, z.B. bei Bluthochdruck, über eigene Regulationsmechanismen entgegenzuwirken.

Mit Hilfe solcher Erkenntnisse könnte die Entwicklung völlig neuer Leitstrukturen initiiert werden.

2 Pharmakologie

2.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind ionendurchlässige Poren in der lipophilen Zellmembran, deren schnelles Öffnen und Schließen vor allem die Signal- und Erregungsübertragung im Nervensystem vermitteln. Ihre Rolle wurde zuerst in der Generierung des propagierten Aktionspotenzials an den Axonen und Endplatten der neuromuskulären Kopplung von Hodgkin und Huxley 1952 erkannt, wofür ihnen 1963 der Nobelpreis verliehen wurde [17, 18]. Die Ionenkanäle ermöglichen mono- und bivalenten Ionen wie Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Cl^- die schnelle Diffusion durch die Zellmembran entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Sie unterscheiden sich von einfachen, wassergefüllten Poren durch zwei wichtige Eigenschaften. Sie besitzen Ionenselektivität, die nur einer Ionenart den Durchtritt erlaubt, und sie sind nicht ständig geöffnet, d.h. sie können durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Dieser geregelte Ionendurchtritt ist für den Aufbau von Membranpotenzialen und für die Reizweiterleitung notwendig.

Die Vorfahren der für diese Arbeit interessanten Calciumkanäle treten entwicklungs-geschichtlich als Kationenkanäle wahrscheinlich mit den ersten Eukarionten vor etwa 1,4 Milliarden Jahren in ihrer spannungsgesteuerten Form auf. Daraus entwickelten sich zuerst die K-Kanäle und dann durch doppelte Genduplikation die Ca-Kanäle. Heute zeugt noch die charakteristische eukariontische Eigenschaft, sich die freie intrazelluläre Calciumkonzentration zur Signaltransduktion zunutze zu machen, von der frühen Entwicklung dieser Kanäle. Die zweite Innovationsperiode ließ dann vor 700 Millionen Jahren mit dem Ursprung der ersten Tiere Na-Kanäle (vermutlich aus einem Ca-Kanal-Vorgänger) und ligandgesteuerte Ionenkanäle (aus anderen genetischen Pools) auftreten. Diese stellten dann die Grundlage für die Entwicklung des tierischen Nervensystems dar. Die Informationsübertragung durch chemische Botenstoffe in den Synapsen und die schnelle Weiterleitung in Axonen ermöglichte erst den Bauplan eines multizellulären Körpers mit schneller exzitatorischer und inhibitorischer Interaktion [11].

Alle Kationenkanäle (vgl. Bild 2.1) sind nach einem allgemeinen Schema aufgebaut. Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten [19, 20]. Über Genexpressionsversuche konnte gezeigt werden, dass die Pore von der α - bzw. α_1 -Untereinheit gebildet wird. Diese Untereinheit durchspannt die Membran mehrfach und liegt häufig glykosiliert vor. Beim Calciumkanal und beim Natriumkanal gelang die Expression zu einem funktionierenden Kanal ohne weitere assoziierte Untereinheiten, auch wenn sich dadurch die Aktivierung und Inaktivierung sowie die Potenzialabhängigkeit der Kanäle von ihren assoziierten Derivaten stark unterscheidet.

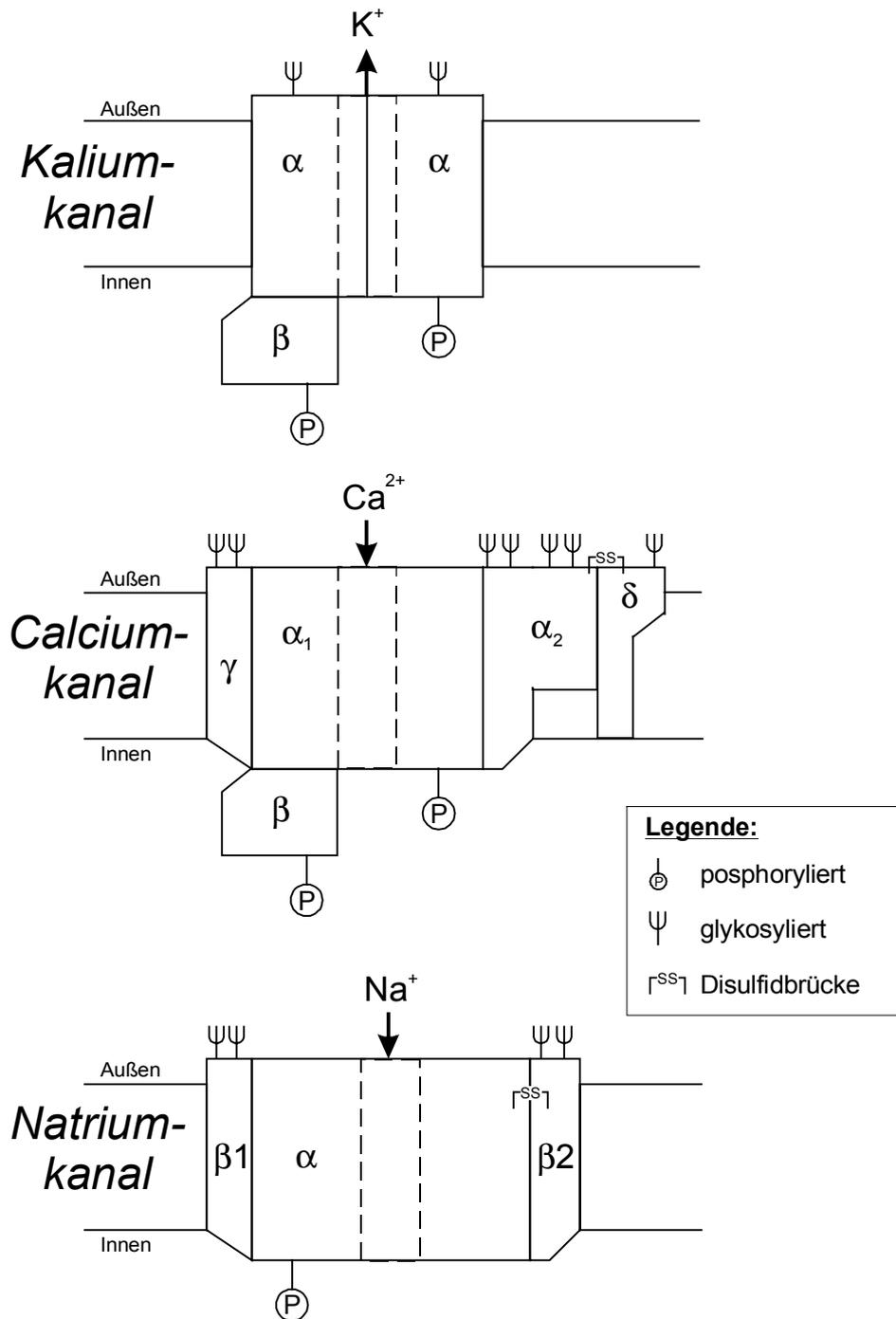


Bild 2.1: Aufbau der Kationenkanäle (Abbildung nach [19])

Der einfache Kaliumkanal stellt in der Reihe der Kationenkanäle mit der Größe seiner α -Untereinheit eine Ausnahme dar. Für die Ionenleitfähigkeit setzt er eine Assoziation von vier Kanalproteinen zu einem Tetramer (α_4) voraus. Die Sequenzen der α - bzw. α_1 -Untereinheiten des Calcium- und Natriumkanals sind dagegen etwa viermal so lang wie die eines Kaliumkanals und stellen sozusagen ein Analogon des Kaliumkanal-Tetramers dar.

Die α -Untereinheit besteht wahrscheinlich aus sechs transmembranären Helices (S1-S6). Der Spannungssensor (beim spannungsabhängigen Calciumkanal) ist auf der Helix S4 lokalisiert. Zwei kurze Segmente (SS1 und SS2) verbinden die transmembranären Helices S5 und S6. Für die Ionenselektivität konnten vier Glutamate in diesem Bereich verantwortlich gemacht werden [21].

Die β -Untereinheiten des Kalium- und des Calciumkanals sind hydrophile, nicht glykosilierte Proteine, die sich vermutlich vollständig auf der Innenseite der Membran befinden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle. Werden sie zusammen mit der $\alpha(\alpha_1)$ -Untereinheit exprimiert, so werden die Zeitverläufe extrem (bis zu 10-fach) beschleunigt. Interessanterweise konnte jedoch zwischen den beiden β -Untereinheiten kaum Sequenzhomologie festgestellt werden. Sie werden durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert, darunter Proteinkinase C und cAMP-abhängige Proteinkinase, die für die Regulation verschiedener Kalium- und Calciumkanäle verantwortlich sind [19].

Die α_2 -Untereinheit des am besten untersuchten Calciumkanals der Skelettmuskulatur weist extrazellulär viele Glykosilierungsstellen auf und liegt über eine Disulfidbrücke an die δ -Untereinheit gekoppelt vor. Dieses $\alpha_2\delta$ -Dimer verbessert die Eigenschaft des Kanals, sich bei der Expression in L Zellen in der Lipid-Doppelschicht zu rekonstituieren [19].

Die γ -Untereinheit ist ein hydrophobes Glykoprotein, das die Membran durchspannt. Im Gegensatz zu den Isoformen der $\alpha_2\delta$ - und β -Untereinheiten (α_{1a-c} ; β_{1-3}) sind von ihr bis heute noch keine Isoformen bekannt [19, 22].

Der Aufbau des Natriumkanals ist dem des Calciumkanals sehr ähnlich, allerdings liegen die beiden β -Einheiten in der Membran (Bild 2.1).

Erst im späteren Verlauf dieser Arbeit brachte die Aufklärung des Kaliumkanals aus *Streptomyces lividans* durch Doyle et al. 1998 [10] einen wesentlichen Fortschritt in der Kanalforschung. Dieser Arbeitsgruppe gelang es eine Röntgenkristallstruktur aufzuklären. Erstmals erhielt man Einblicke in den Mechanismus der Ionenselektivität und Hinweise auf die Frage, wie sich gleichgeladene Ionen beim Durchtritt durch den Kanal beeinflussen. In der Aufsicht (Bild 2.2) läßt sich gut erkennen, dass die Pore durch Zusammenlagerung von vier gleichen Kanalproteinen (tetramere Struktur) gebildet wird. In der Seitenansicht erkennt man drei Kaliumionen (dunkle Kugeln) beim Durchtritt durch die Pore. Die für die Selektivität verantwortlichen Aminosäuren liegen innen am Ende der kurzen Helices (dunkler Bereich der Bänder - entspricht SS1-SS2).

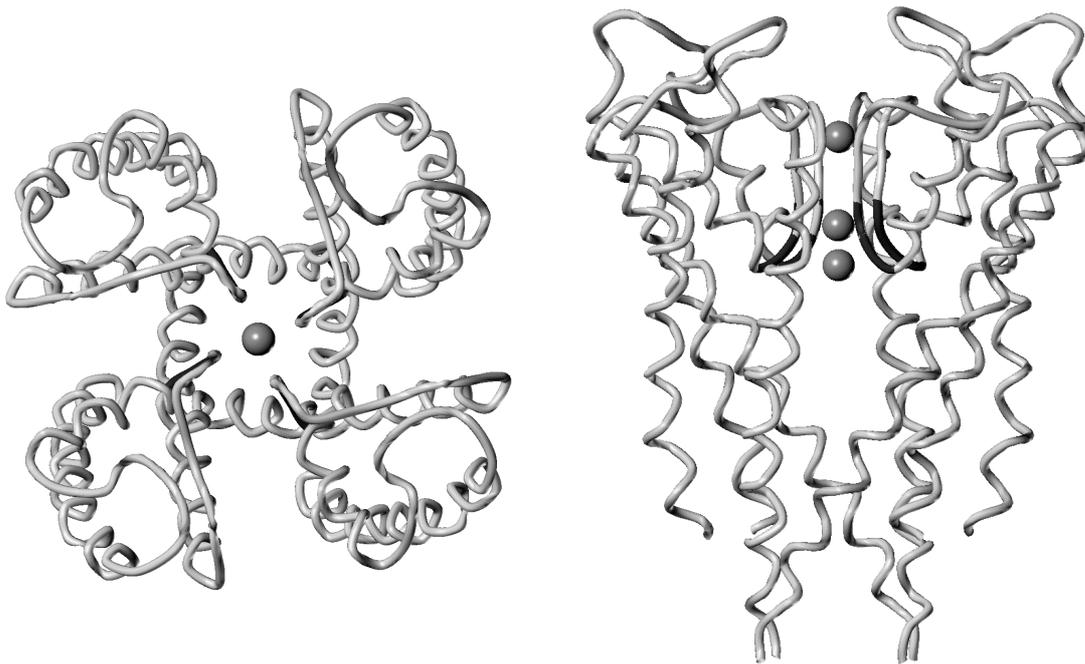


Bild 2.2: Sekundärstruktur des K-Kanals (links Aufsicht; rechts Seitenansicht) nach Doyle et al. [10]. Kaliumionen sind als Kugeln und das Selektivitätsfenster als schwarze Bänder dargestellt.

Erst heute ließe sich der Versuch wagen, auf Grundlage der K-Kanal-Kristallstruktur durch Homologie-Modelling ein Modell des Calciumkanals mit der Bindungsstelle der Dihydropyridine zu entwickeln. Zu Beginn dieser Arbeit wäre dies reine Spekulation gewesen.

2.2 Calcium im menschlichen Körper und der Zelle

Der menschliche Körper enthält durchschnittlich 1,2 kg Calcium. 98% davon liegen gebunden im Knochen als Hydroxylapatit vor. Im Plasma beträgt die Calciumkonzentration etwa 2,5 mmol/l. Davon sind 40% proteingebunden, wodurch sich für die interstitiellen Flüssigkeit eine Konzentration von 1,5 mmol/l ergibt [23, S. 455].

Dem gegenüber wird im Cytoplasma eine sehr geringe Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Calcium erreicht (15000 fach geringer). Die Zelle lagert Calciumionen intrazellulär in den Mitochondrien, im endo- und sarkoplasmatischen Retikulum [24] oder nutzt den Mechanismus der Calciumpumpe (Ca^{2+} -ATPase) und des Na^+ - Ca^{2+} -Kotransporters. Letzterer nutzt den Einstrom von drei Natriumionen entsprechend ihrer elektrochemischen Gradienten zum Ausschleusen von einem Calciumion aus der Zelle (Na^+ -Ionenkonzentration: extrazellulär 149 mmol/l, intrazellulär 10 mmol/l). Die Ca^{2+} -ATPase verbraucht Energie in Form von ATP, um Calciumionen direkt aus der Zelle zu transportieren (vgl. auch Bild 2.3).

Calciumionen gehören zu den wichtigsten Regulatoren biologischer Funktionen. In der Zelle fungiert Ca^{2+} unter anderem als sekundärer Transmitter („second messenger“). Die niedrige Konzentration in der Zelle kann sehr schnell und effektiv über Freisetzung

aus den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum bzw. durch Einstrom von außen über Ca^{2+} -selektive Kanäle in der Zellmembran erhöht werden. Extrazelluläre Signale von Hormonen und Neurotransmittern werden so auf intrazelluläre Effektoren übertragen.

Zu den zellulären Funktionen, die durch Ca^{2+} -Einstrom reguliert werden, gehören:

- Muskelkontraktion (elektromechanische Kopplung)
- Sekretion aus exkretorischen und inkretorischen Drüsen (elektrosekretorische Kopplung)
- Exocytose
- Modulation von K^+ -Kanälen

Da die Dihydropyridine (Kapitel 2.7.1.1) ihre pharmakologische Wirkung hauptsächlich über die Herz- und die glatte Gefäßmuskulatur entfalten, soll im Folgenden detaillierter auf Muskelkontraktion, Calciumionenkonzentration und die Rolle der Calciumkanäle in der Zelle eingegangen werden.

Von Ringer konnte schon vor 100 Jahren an frei schlagenden Froschherzen gezeigt werden, dass die Kontraktionskraft in Ca^{2+} -freier Lösung abnimmt und sich bei Zugabe von Ca^{2+} wieder normalisiert [25].

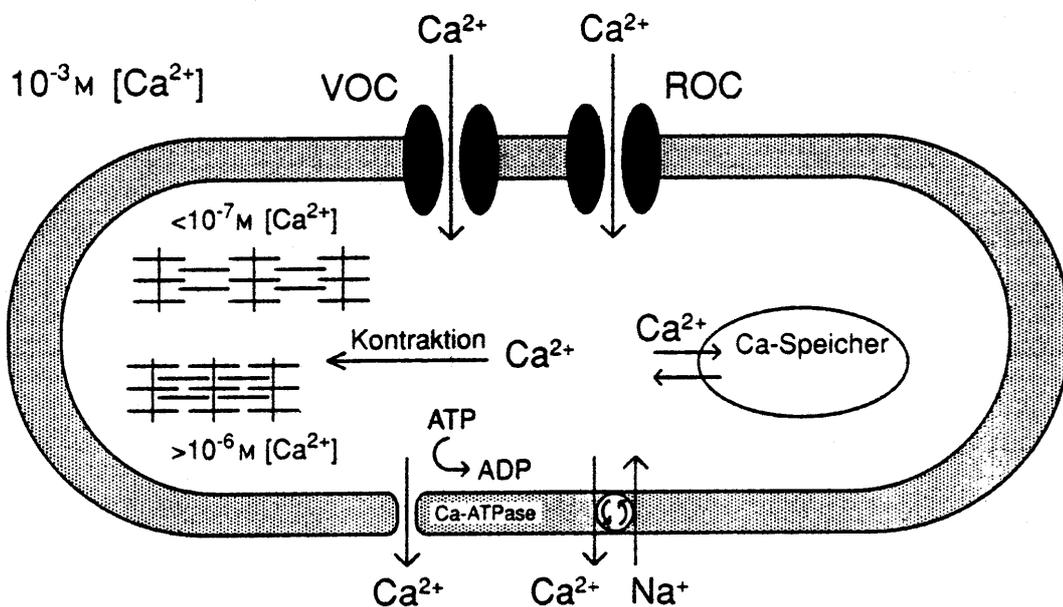


Bild 2.3: Zelle mit Steuerung der Calciumionenkonzentration nach Goldmann [25]

Durch kurzzeitiges Öffnen spezifischer Calciumkanäle in der Zellmembran kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Wie in Bild 2.3 dargestellt, strömt Calcium durch zwei Arten von Calciumkanälen in die Zelle: Rezeptor-gesteuerte

Kanäle (ROC, „receptor operated channels“) und potenzial-abhängige Kanäle (VOC, „voltage operated channels“).

Die erhöhte Calciumkonzentration bewirkt dann weitere Ca^{2+} -Freisetzung durch Calcium-aktivierbare Kanäle aus den intrazellulären Calciumspeichern (Mitochondrien oder sarko-/endoplasmatisches Retikulum). Die im endoplasmatischen Retikulum liegenden Calciumkanäle zeigten bei ihrer Identifizierung Affinität zu radioaktiv markiertem Ryanodin. Neben diesem insektiziden Pflanzenalkaloid sowie Calciumionen sind auch ATP, KCl, Mg^{2+} , Coffein und Calmodulin als Modulatoren dieser Kanäle wirksam.

Wird die freie Calciumkonzentration intrazellulär größer als $1 \mu\text{mol/l}$, so kontrahieren die Filamente der Muskelzellen. Erst ein Abfall der Calciumkonzentration durch Aufnahme der Calciumionen aus dem Sarkoplasma in das longitudinale System oder durch Ausschleusen der Calciumionen aus der Zelle über andere Mechanismen beendet den Kontraktionsvorgang [26]. Sinkt die Calciumionenkonzentration unter $0,1 \mu\text{mol/l}$, so liegen die Filamente vollständig dilatiert vor.

Das Ausschleusen der Calciumionen aus der Zelle erfolgt über Calcium-Natrium-Kotransporter sowie über die Ca^{2+} -ATPase.

2.3 Calciumkanäle

Die Calciumkanäle der Zellmembran können grob nach ihren Aktivierungsmöglichkeiten eingeteilt werden. Es gibt Rezeptor-aktivierbare Kanäle (ROC, receptor operated channels) und Potenzial-abhängige Kanäle (VOC, voltage operated channels) [25].

2.3.1 Rezeptor-aktivierbare Kanäle

Rezeptor-aktivierbare Kanäle werden z.B. durch Catecholamine wie Adrenalin oder Noradrenalin aktiviert. Sie werden durch α - oder β -Adrenozeptorenblocker pharmakologisch beeinflusst. Eine andere Bezeichnung für diese Klasse lautet Ligand-gesteuerte Kanäle [20].

2.3.2 Potenzial-abhängige Kanäle

Bei Potenzial-abhängigen (auch häufig mit Spannungs-abhängig oder Spannungsgesteuert übersetzt [20]) Kanälen ist der Ca^{2+} -Einstrom abhängig vom Membranpotenzial. Sie werden pharmakologisch durch Calcium-Antagonisten mehrerer Verbindungsklassen gehemmt und stellen in erregbaren Zellen die größte Gruppe calciumleitender Kanäle dar [24].

2.4 Wirkungsweise der Potenzial-abhängigen Kanäle

Das Membranruhepotenzial liegt zwischen -60 und -90 mV, wodurch sich die Potenzial-abhängigen Kanäle hauptsächlich im geschlossenen Zustand befinden. Entsteht ein Aktionspotenzial, z. B. durch Angriff von Acetylcholin an den postsynaptischen, nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, so werden die Acetylcholin-gesteuerten Na-Kanäle aktiviert. Innerhalb einer Millisekunde strömen Natriumionen in das Cytosol und bedingen eine Potenzialänderung in Richtung positiverer Werte. Die Potenzialänderung wirkt als Stimulus für den Spannungssensor der Potenzial-abhängigen Calciumkanäle. Ihre Aktivierung führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Kanal-Proteinkomplexes, die den Einstrom der extrazellulären Calciumionen entlang ihres Konzentrationsgefälles ermöglicht. Die gleichzeitige Signalübertragung an die Ryanodin-Rezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums steuert die Freisetzung intrazellulär gespeicherten Calciums aus dem longitudinalen System. Dieser additive Mechanismus von extracellulärem und intracellulärem Einstrom in das Cytoplasma erhöht die Calciumkonzentration dort auf ~ 10 $\mu\text{mol/l}$. Durch die Botenstoff (second messenger)-Funktion der Calciumionen werden dann eine Vielzahl unterschiedlichster Prozesse gesteuert (vgl. Kapitel 2.2).

2.5 Funktionelle Unterteilung Potenzial-abhängiger Kanäle

Die verschiedenen Potenzial-gesteuerten Calciumkanäle lassen sich durch unterschiedliche Kriterien auf elektrophysiologischer und pharmakologischer Ebene klassifizieren. Die Typenbezeichnungen leiten sich aus dem Inaktivierungsverhalten (L-, N- und T-Typ) sowie dem Gewebe ab, in dem sie erstmalig detektiert worden sind (B- und P-Typ) [20, 27]. Der R-Typ ist nicht durch organische und peptidische Liganden hemmbar (resistent).

Die Calciumkanäle vom L-, N-, P-, B- und R-Typ können in die Gruppe der hochspannungsaktivierten Kanäle (high voltage activated channels) eingruppiert werden. Ihr Aktivierungspotenzial liegt bei -50 bis -30 mV und ist somit im Vergleich zum T-Typ-Kanal (-70 mV, low voltage activated) zu positiveren („höheren“) Werten verschoben.

Das Inaktivierungsverhalten ist ein weiteres Unterscheidungskriterium zwischen den Calciumkanälen. T-Typ-Kanäle werden schon wenige Millisekunden nach ihrer Aktivierung wieder inaktiviert, L-Typ-Calciumkanäle bleiben bis zu 500 ms im aktivierten Zustand, was zu ihrem Namen (long lasting) geführt hat.

Schrittmacherzellen besitzen T-Typ-Calciumkanäle für die schnelle Aktivierung und Inaktivierung. Dagegen wird der P-Typ-Kanal als Überträger des Aktionspotenzials vom Sinusknoten auf das Arbeitsmyokard verwendet.

Die selektive Hemmung der Calciumkanäle durch anorganische und organische Verbindungen lässt eine zusätzliche Unterscheidung zu. Cadmiumionen hemmen L-

und R- Typ, Nickelionen T- und R-Typ. Natürliche Peptide werden von diversen Tieren als Gift zur Paralyse ihrer Beutetiere genutzt. Die Klapperschlange (*Crotalus atrox* – Atrotoxin) nutzt dabei die Kanalaktivierung, während die schwarze Mamba (*Dendroaspis polylepis polylepis*), Spinnen (*Agelenopsis aperta* – ω -Agatoxine) und fischjagende Schnecken (*Conus majus* – ω -Conotoxine) die Kanäle inaktivieren (vgl. Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Funktionale Klassifizierung spannungsabhängiger Calciumkanäle nach [28, 29, 20, 30]

Typus	High voltage activated channels					Low voltage activated channel
	L-Typ (long lasting)	N-Typ (neither L nor T)	P-Typ (Purkinje)	B/Q-Typ? (Brain)	R-Typ? (resistant)	T-Typ (transient/tiny)
Lokalisierung (Funktion)	Muskel- und Nervenzellen	Neuronen (Transmitter-freisetzung)	Purkinje-Zellen	Gehirn	Gehirn, Herz, C Zellen	weitverbreitet (Schrittmacherfunktion)
Aktivierungspotenzial	>-30mV	>-30mV	>-50mV	>-30mV	>-30mV	>-70mV
Leitfähigkeit ~100 mM Ba ²⁺	25 pS	12-20 pS	9,14,19 pS	-	-	8 pS
Inaktivierung	langsam	moderat	sehr langsam	-	-	schnell
Agonisten	(S)-BayK8644 (S)-SZ 202791 Atrotoxin	-	-	-	-	-
Hemmstoffe	DHP; PAA; BTZ; Cd ²⁺ ; Calciseptin	ω -Conotoxin GVIA	ω -Agatoxin IIIa und IVa; ω -Conotoxin MVIIC	ω -Agatoxin IVa; ω -Conotoxin MVIIC	Ni ²⁺ ; Cd ²⁺	Flunarizin; Ni ²⁺ ; Octanol; Mibefradil*

* Mibefradil ($IC_{50} = 1 \mu M$) ist relativ selektiv für T-Typ Kanäle (15-fach gegenüber L-Typ). In neueren Publikationen wurde zusätzlich zur Aktivität am L-Typ auch eine am N-Typ beschrieben [31].

2.6 Zustände des L-Typ-Calciumkanals

Nach vorherrschender Meinung existieren die Ionenkanäle in verschiedenen Aktivitätszuständen [32, 33], auch unter dem englischen Begriff „modulated receptor“ bekannt. Dabei wird zwischen den folgenden drei Zuständen unterschieden: Ruhezustand, offener Zustand und inaktivierter Zustand. Interessanterweise besitzen die Dihydropyridine abhängig von den Zuständen des Kanals unterschiedliche Affinität zu ihrer Bindungsstelle.

Im Ruhezustand bei einem Membranpotenzial von -90 bis -60 mV liegt der Kanal in einer Konformation vor, die wahrscheinlich noch keine Pore bildet. Ein Calciumfluss in die Zelle ist nicht möglich. Die Affinität der DHP zum Kanal ist eher gering. Calciumagonisten besitzen eine höhere Affinität für diesen Zustand des Kanals als Calciumantagonisten, was auch logisch und sinnvoll erscheint. Agonisten aktivieren ja den Kanal.

Wird das Membranpotenzial durch externe Reize (z.B. Angriff von Neurotransmittern und Na-Ionen Einstrom) zu einem positiveren Potenzial (etwa -30 mV) verschoben, so geht der L-Typ-Calciumkanal in den „Nichtruhe“-Zustand über. Dabei durchläuft der Kanal wahrscheinlich eine größere Konformationsänderung und die Pore, durch die Calciumionen fließen sollen, wird gebildet. In dieser Konformation oszilliert der Kanal zwischen einem offenen und einem inaktivierten Zustand.

Man stellt sich vor, dass die jetzt gebildete, offene Pore im inaktivierten Zustand durch eine Art Deckel ohne große Konformationsänderung verschlossen wird. Die Affinität der DHP zu diesen „Nichtruhe“-Zuständen ist erhöht.

Experimentelle Daten von Berjukow können zeigen, dass die Calcium-Antagonisten sogar eine noch höhere Affinität zum inaktiven Zustand als zum offenen Zustand besitzen [32]. Sie stabilisieren gewissermaßen den verschlossenen „Nichtruhe“-Zustand. Die Unterscheidung dieser oszillierenden Zustände konnte dabei allerdings nur in mutierten Calciumkanälen untersucht werden.

2.7 Calciumkanal-modulatorische Substanzen

Sidney Ringer erkannte 1882 die Bedeutung von Calcium-Ionen bei der Muskelkontraktion. Im selben Jahr beschrieb Hantzsch die Synthese der Dihydropyridine aus Acetessigester, Aldehyd und Ammoniak. Aber erst Anfang 1970 erkannte Arthur Fleckenstein das völlig neue pharmakodynamische Grundprinzip der Relaxation glatter Muskulatur. Er beobachtete, dass kleine synthetische Verbindungen die gleichen Symptome hervorrufen wie Calcium-Komplexbildner oder ein Arbeiten in calciumfreiem Milieu [34, 35].

Seine Ergebnisse führten zu dem noch heute häufig verwendeten Begriff der Calciumantagonisten. Inzwischen wissen wir, dass dieser Begriff eigentlich durch den Ausdruck Calciumeintritts-Blocker ersetzt werden müsste, da diese Verbindungen ihre Wirkung durch die Inaktivierung des Calciumkanals entfalten und absolut keine calciumantagonistische Wirkung besitzen.

Klinische Relevanz erlangten drei strukturell unterschiedliche Gruppen nicht-peptidischer L-Typ-Calciumeintritts-Blocker.

2.7.1 Calciumkanal-Blocker – Chemische Klassifizierung

2.7.1.1 1,4-Dihydropyridine (DHP)

Dihydropyridine besitzen eine extrem hohe Affinität zum L-Typ-Calciumkanal. Ihr Target wurde deshalb auch als DHP-Rezeptor bezeichnet. Prominentestes Beispiel in der Therapie ist das durch die Firma Bayer schon Anfang 1975 eingeführte Nifedipin (Adalat[®]), das zur Behandlung von koronaren Herzerkrankungen auch heute noch häufig eingesetzt wird. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Derivaten mit zum Teil deutlich unterschiedlichen Wirkprofilen. Nitrendipin (Bayotensin[®]) wird beispielsweise wegen seiner ausgeprägten vasodilatierenden Wirkung nur als Antihypertonikum eingesetzt, während Nimodipin (Nimotop[®]) derzeit zur Prophylaxe und Therapie hirnorganisch bedingter Leistungsstörungen im Alter wie Gedächtnis-, Antriebs- und Konzentrationsstörungen sowie Stimmungslabilität verwendet wird [26, 36, 37]. Dass auch heute noch die Entwicklung der Dihydropyridine nicht am Ende angelangt ist, zeigt das erst dieses Jahr in den Markt eingeführte Lercanidipin (Corifeo[®], Carmen[®]). Es zeichnet sich durch eine sehr lipophile Seitenkette (Bild 2.5), durch einen hohen Membranverteilungskoeffizienten und damit einer verlängerten antihypertensiven Wirkung aus. Obwohl bekannt ist, dass die antihypertensive Wirkung hauptsächlich vom (S)-Enantiomer ausgeht, wird das Razemat in der Therapie eingesetzt.

Die Stereochemie der Dihydropyridine spielt generell eine wichtige Rolle für die Wirkung am Calciumkanal, hier sei daher auf die Beschreibung des Pharmakophors (Kapitel 4.1.3) und die Beschreibung der Calciumagonisten (Kapitel 2.7.2) verwiesen.

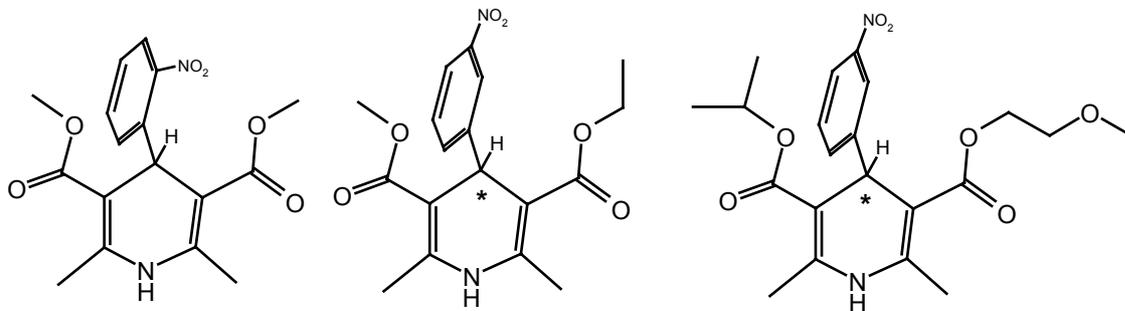


Bild 2.4: Nifedipin, Nitrendipin, Nimodipin (von links)

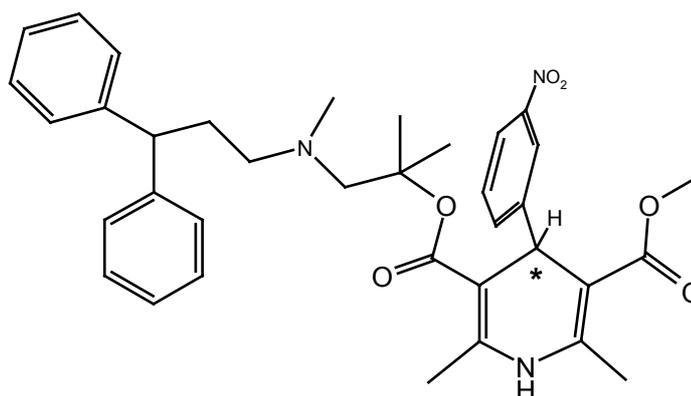


Bild 2.5: Lercanidipin

2.7.1.2 Phenylalkylamine (PAA)

Die Phenylalkylamine besetzen eine allosterische Bindungsstelle an der gleichen Unter-einheit des Calciumkanals wie die Dihydropyridine. Beispiele für wichtige Präparate auf dem deutschen Markt sind Isoptin[®] und Falicard[®]. Obwohl das (S)-Enantiomer beim Verapamil deutlich wirksamer ist als die (R)-Form, ist das Razemat im Handel. Pharmakologisch wirken die Phenylalkylamine ähnlich wie die DHP. Sie haben aber darüber hinaus therapeutisch nutzbare Hemmwirkungen am Herzen. Sie wirken negativ chronotrop (durch Angriff am Sinusknoten), negativ dromotrop (vor allem durch Angriff am AV-Knoten) und negativ inotrop (durch Angriff am Arbeitsmyokard) [23].

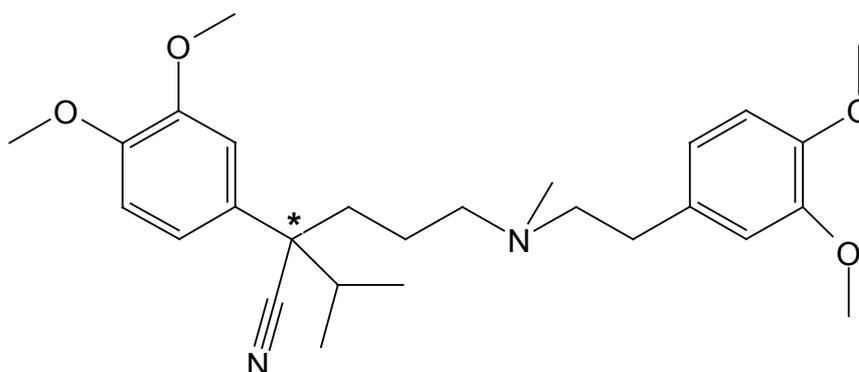


Bild 2.6: Verapamil

2.7.1.3 Benzothiazepine (BTZ)

Auch die Benzothiazepine greifen allosterisch am Calciumkanal an. Der bekannteste Vertreter Diltiazem besitzt zwei chirale Zentren. Die wirksame Form ist das (2S, 3S) Enantiomer, das im Markenpräparat Dilzem[®] vorliegt. Das pharmakologische Profil ähnelt dem der Phenylalkylamine, die kardialen Wirkungen sind aber nicht so stark ausgeprägt.

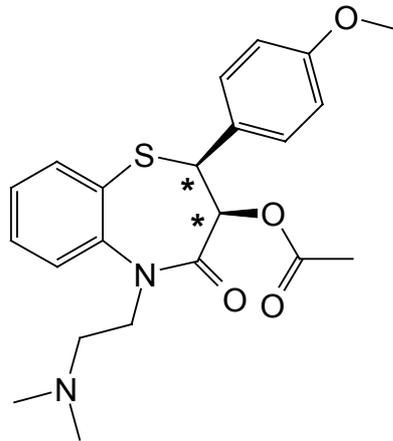


Bild 2.7: (2S,3S)-Diltiazem

2.7.1.4 Wechselwirkungen an der Bindungsstelle

Die Wechselwirkungen zwischen den drei spezifischen Bindungsstellen (DHP, PAA und BTZ) an der α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals werden am besten durch das „allosterische Modell“ von Triggle [38] und Glossmann et al. [39] beschrieben (Bild 2.8). Die Pfeile symbolisieren negative (Minuszeichen) und positive (Pluszeichen) heterotrope allosterische Regulation zwischen den entsprechenden Bindungsdomänen. Binden die DHPs, so sinkt die Affinität zu den PAAs. Binden die PAAs, so sinkt die Affinität zu den BTZs, etc. Die Regulation der Dihydropyridin-Bindung durch Diltiazem (BTZs) ist dabei ausgeprägt temperaturabhängig. Hier ist bei Raumtemperatur eine positiv heterotrope allosterische Regulation der DHP-Bindung zu beobachten [24]. Bei Temperaturen über 25 °C wird eine negative Regulation beobachtet [39].

Alle drei Domänen sind allosterisch mit divalenten Kationen, symbolisiert durch „Ca²⁺“, gekoppelt. Dabei ist die Bindung der Ionen an die DHP-Domäne mit ihrer hohen Affinität zu den DHP positiv gekoppelt. Werden beispielsweise die divalenten Kationen durch EDTA-Behandlung komplexiert, so besitzt die DHP-Bindungsstelle kaum noch Affinität zu ihren Liganden. Dagegen bleibt die Affinität der PAA- und BTZ-Bindungsstelle erhalten. Steigt im Gegensatz dazu die Konzentration an divalenten Kationen (> 100 $\mu\text{mol/l}$) [39], so wird die Bindung der PAA und BTZ gehemmt. Der Verlust der DHP-Bindung und die Hemmungen der PAA- und BTZ- Bindung sind vollständig reversibel.

Zwei weitere Bindungsdomänen für Diphenylbutylpiperidine und Benzothiazinone wurden der Übersicht halber nicht eingezeichnet, da die Wechselwirkungen nur negativ allosterisch sind [38].

Neuere Erkenntnisse über die Struktur des Kanals erweitern das Modell nicht nur auf allosterische, sondern eventuell auch auf eine direkte sterische Interaktion [40].

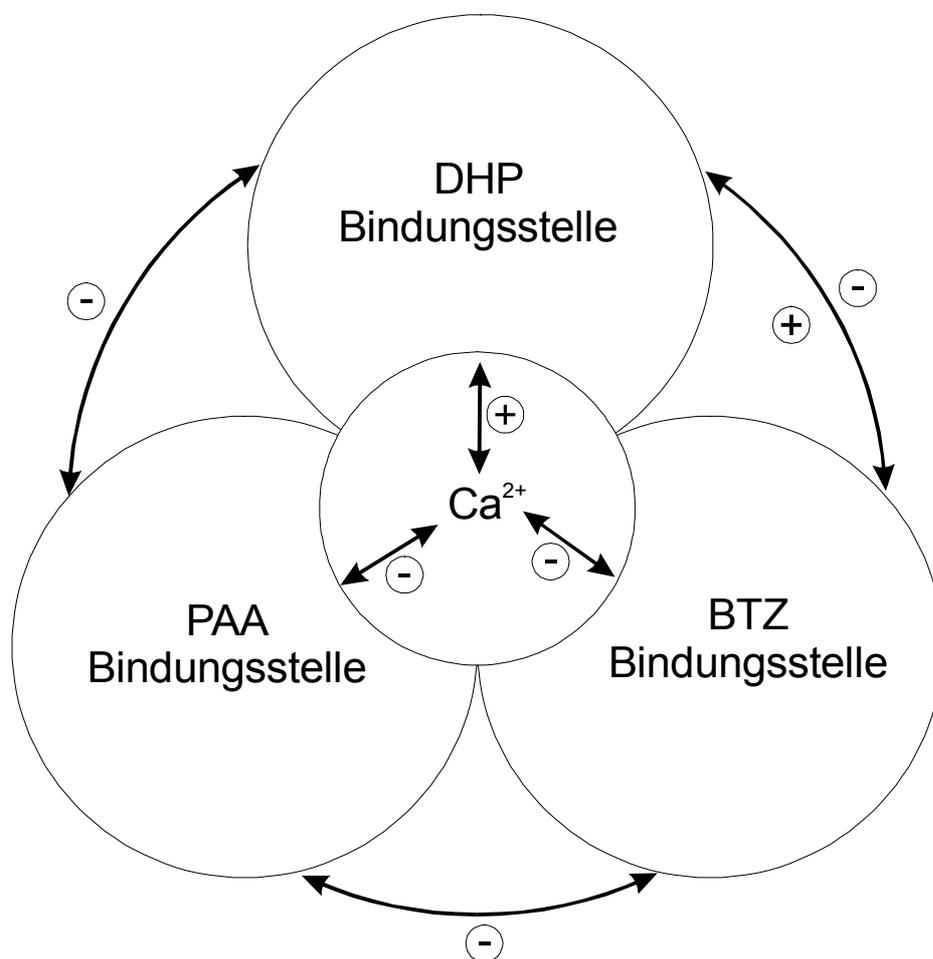


Bild 2.8: Allosterisches Modell der Bindungsdomänen am Calciumkanal nach [41, 38, 39, 24]. Die Pfeile symbolisieren positive (+) und negative (-) wechselseitige allosterische Interaktionen zwischen den Domänen, die *in vitro* mit selektiven Radioliganden beobachtet worden sind. (Beispiele siehe Text)

2.7.2 Calciumkanal-Öffner (Calciumagonisten)

2.7.2.1 BAY K 8644

Eine besondere Rolle unter den Dihydropyridinen spielt die Substanz BAY K 8644. Dieses Derivat wirkt nicht blutdrucksenkend, negativ inotrop und vasodilatierend, sondern erhöht den Blutdruck; es wirkt positiv inotrop und vasokonstriktorisch. Dabei greift es an derselben Bindungsstelle wie die DHP-Antagonisten am Calciumkanal an und steigert den Calciumeinstrom in die Zelle. Erst durch Substanzen wie BAY K 8644 wurde die Vielzahl der Untersuchungen auf dem Gebiet der Calciumantagonisten ermöglicht, da sich einfach die DHP-Wirkung und Bindung als Antagonismus zur

BAY K 8644-Wirkung/Bindung messen lässt. Obwohl BAY K 8644 keine klinische Relevanz besitzt, ist es die wichtigste Referenzsubstanz in experimentellen Testreihen.

Worauf die inversen Wirkungen von z.T. sehr ähnlich substituierten Dihydropyridinen beruhen, wird in Kapitel 4.1.3 bei der Beschreibung des Pharmakophors diskutiert.

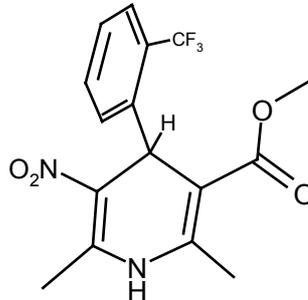


Bild 2.9: (S)-BAY K 8644

2.7.3 Peptide

2.7.3.1 Kurze Peptide

2.7.3.1.1 Endogener „hypertensiver Faktor“

Schon 1984 wurde von der Arbeitsgruppe McCumbee und Wright eine endogene Substanz aus dem Blut spontan-hypertensiver Ratten isoliert, die den Blutdruck von normotensiven Ratten steigert und die Lanthan-resistente Aufnahme von Calcium in die Aorta-Ring-Zellen erhöht [42]. Es konnte beobachtet werden, dass diese Substanz die Aktivität des spannungsabhängigen Calciumkanals moduliert. Die Substanz wurde als Peptid mit einem Molekulargewicht von 700-800 Da charakterisiert [43]. Die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung ergab folgendes Ergebnis: Asp/Asn (1.41), Ser (1.02), Glu/Gln (1.00) und Gly (2.00). Weder die exakte Sequenz noch die Struktur des Peptides konnten aufgeklärt werden. 1989 gelang jedoch die Isolierung durch Affinitätschromatographie mit monoklonalen Antikörpern, sodass eindeutige Messungen des Calciumeinstroms an Froschherzzellen möglich waren [44]. Die gewonnenen Diagramme ähneln in ihrem Verlauf den Kurven von Dihydropyridin-Agonisten (Bsp. BAY K 8644).

2.7.3.1.2 Endogenes Peptid

Die Modulation von Calciumkanälen in kardialen und neuronalen Zellen durch ein endogenes Peptid wurde auch von der Gruppe Callewaert und Hanbauer untersucht [45]. Hanbauer hatte 1987 aus Rattenhirn ein Peptid mit einem Molekulargewicht von etwa 1 kDa isolieren können [46], das einen [³H]Nitrendipin verdrängenden Effekt aufweist, in isolierten Herzzellen den Calciumeinstrom am L-Typ-Calciumkanal erhöht und in neuronalen Zellen den Calciumeinstrom verringert. Die gereinigte Substanz zeigt im Massenspektrometer zwei Peaks. Der Hauptpeak liegt bei

948, ein kleinerer Peak bei 1022. Die Zusammensetzung bestimmte die Arbeitsgruppe mit 55% Asp, 25% Glu, 5% Gly, 5% Thr sowie zwei nicht identifizierbaren Peaks.

Zusammenfassend lässt sich für beide Untersuchungen (hypertensiver Faktor und endogenes Peptid) sagen, dass die genaue Sequenz oder Struktur der Peptide, die für die Regulation des Calciumeinstroms in die Zelle verantwortlich sind, nicht geklärt werden konnte. Sie geben jedoch einen Hinweis darauf, dass ein oder mehrere Peptide existieren, die als natürliche Liganden des DHP-Rezeptors am Calciumkanal in Frage kommen.

2.7.3.2 Schlangentoxine

Das Gift der Familien Elapidae (Giftnattern, Cobras, Mambas) und Hydrophidae (Seeschlangen) enthält ein breites Spektrum an Toxinen mit definiertem pharmakologischem Profil. Ein großer Teil dieser Toxine verteilt sich auf zwei Kategorien kleiner, sehr toxischer Peptide, den Neurotoxinen und den Cytotoxinen.

Die Neurotoxine bestehen wiederum aus zwei Gruppen: kurze Toxine (60 – 62 Aminosäuren) und lange Toxine (65 - 74 Aminosäuren). Beide blockieren postsynaptisch den nicotinischen Acetylcholinrezeptor und führen zu einer Lähmung der Muskeln durch Erschlaffen.

Die Cytotoxine werden nur in den Familien der Kobras und Ringhals-Schlangen gefunden und greifen auf der Ebene der Zellmembran an. Es wird vermutet, dass sie die Durchlässigkeit und/oder die direkte Organisation der Membran beeinflussen.

Durch die Aufklärung der Struktur mithilfe von Kristall- und NMR-Untersuchungen wurde gezeigt, dass trotz ihrer unterschiedlichen Effekte Neurotoxine und Cytotoxine eine sehr ähnliche Struktur besitzen. Stabilisiert durch vier konservierte Cysteinpaare entspricht ihr dreidimensionales Aussehen einem so genannten „Drei-Finger“-Motiv (Bild 2.10) [47].

Neben diesen Toxinen konnte noch eine dritte Klasse, nämlich postsynaptisch aktive Toxine, aus dem Gift der *Dendroaspis* (Familie der Mamba-Schlangen) isoliert werden, die man als Angusticeps-Typ-Toxine (AT-Tx) bezeichnet. Obwohl diese AT-Tx große Homologie zu den Neurotoxinen und Cytotoxinen aufweisen, konnten keine vergleichbaren Aktivitäten festgestellt werden. Die Toxine sind für sich getestet nur sehr schwach toxisch, entfalten aber im Gemisch mit den anderen Toxinen einen synergistischen Effekt. Man unterscheidet aufgrund ihrer Homologie und immunologischen Eigenschaften vier Untergruppen.

Zwei dieser Untergruppen zeigen eine definierte pharmakologische Aktivität. Toxine der Subgruppe I sind potente Inhibitoren der Acetylcholinesterase. Zu ihnen gehören die Fasciculine. Die Kristallstruktur des Fasciculin 1 aus *Dendroaspis angusticeps* (Grüne Mamba) konnte 1992 aufgeklärt werden. 1995 wurde die Röntgenkristallstruktur von Fasciculin 2 (PDB-Code: 1FSC) veröffentlicht, kurze Zeit später der Komplex mit der Acetylcholinesterase (PDB-Code: 1MAH).

Zur Subgruppe III gehörten anfangs nur das Toxin FS2 aus *Dendroaspis polylepis polylepis* (Schwarze Mamba) und C10S2C2 aus *Dendroaspis angusticeps* (Grüne Mamba). Später wurden noch Calciseptin, ein sehr homologes Toxin zu FS2, aus *Dendroaspis polylepis polylepis* isoliert. Es unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren (Ser5Ile und His30Gln) von FS2 und konnte als spezifischer Inhibitor des L-Typ-Calciumkanals charakterisiert werden [48, 49, 50].

2.7.3.3 Schlangentoxin FS2

Obwohl der schwache pharmakologische Effekt von Calciseptin zuerst bekannt war, konzentrierten sich Albrand et al. auf die Aufklärung der NMR-Struktur von FS2 [47]. Dies hatte zwei pragmatische Gründe: Toxin FS2 ist in wesentlich höherer Konzentration als Calciseptin im Schlangentoxin vorhanden und die Arbeitsgruppe besaß schon Erfahrung mit diesem Toxin, das einen synergistischen Effekt mit Dendrotoxin I (im selben Labor untersucht) aufweist.

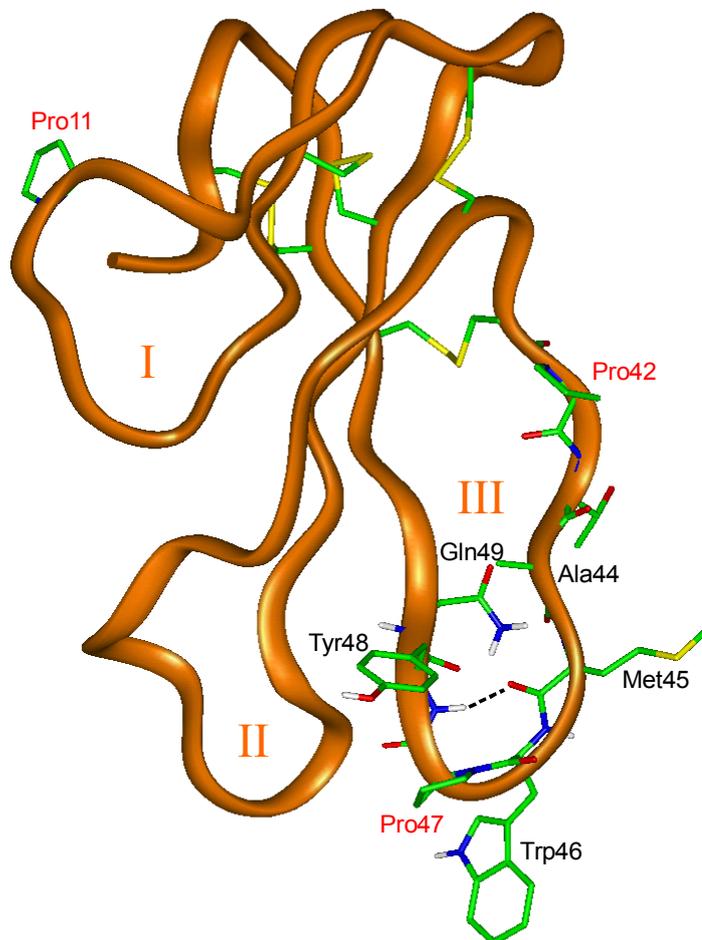


Bild 2.10: NMR-Struktur des „Drei-Finger“-Toxins FS2 (wichtige AS hervorgehoben)

Die NMR-Daten wurden in verschiedenen Lösungsmitteln (99,96% D₂O; 90% H₂O / 10% D₂O gepuffert bei pH 5,3) und verschiedenen Temperaturen (296 K, 305 K, 310 K) aufgenommen. In der Brookhaven-Datenbank ist ein Ensemble von 20

Strukturen gespeichert (PDB-Code: 1TFS). Es entspricht den 20 besten Strukturen bei 300 K, die auf experimentell gewonnenen Daten (Restraints) basieren.

Das Toxin hat eine Kernregion mit vier stabilisierenden Disulfidbrücken, an die drei Loops mit β -Faltblattstruktur anschließen. Diese Loops stabilisieren sich durch ein Netzwerk von Wasserstoff-Brücken im Backbone des Peptids. Die gesamte Struktur ist – besonders durch den Einfluss des mittleren Loop II – leicht konkav gewölbt und ähnelt einem flachen „Suppenteller“.

Die primäre Funktion der Kernregion ist bei allen Drei-Finger-Toxinen die eines stabilisierenden Elementes [47, S. 5932]. Die Vielfalt biologischer Aktivität wird durch die Sequenz der freien Loops bestimmt. Besonders auffallend ist das Vorkommen der Faltblattstruktur des Loop III im gesamten Spektrum der Drei-Finger-Toxine. Der Hauptunterschied zwischen Cardiotoxinen, Neurotoxinen, Fasciculin 1 und dem Toxin FS2 besteht darin, dass an der Spitze des dritten Fingers in den ersten Fällen ein Nicht-Standard β -Turn oder β II-Turn zu finden ist, während im Toxin FS2 ein typischer β VIA-Turn (cis-Prolin-Turn) vorhanden ist.

3 Methoden

3.1 Protein-Ligand-Wechselwirkung

Wirkstoffe müssen an den Ort ihrer Wirkung im Körper gelangen. Dort binden sie an ein bestimmtes Zielmolekül, meistens handelt es sich dabei um ein Protein. Wichtigste Voraussetzung für eine optimale Bindung und Wirkung sind Größe und Gestalt des Wirkmoleküls (Ligand), das an die Bindungsstelle des Proteins wie ein Schlüssel in sein Schloss angepasst sein muss.

3.2 Proteinbindung

Die Bindungsstärke (Affinität) zwischen dem Protein und dem Liganden lässt sich in Bindungsstudien bestimmen. Die charakteristische Größe, die dabei gemessen wird, ist die Bindungskonstante K_i . Sie beschreibt die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand. K_i ist eine thermodynamische Gleichgewichtsgröße, die angibt, welcher Anteil des Liganden an das Protein gebunden ist.

$$K_i = \frac{[\text{Ligand}] \cdot [\text{Protein}]}{[\text{Ligand} \cdot \text{Protein}]} \quad (3.1)$$

K_i ist eine Konzentration mit der Einheit mol/l (M). Je kleiner der K_i -Wert, desto stärker bindet der Ligand an das Protein. Statt der Bindungskonstante K_i wird auch häufig die freie Bindungsenthalpie ΔG angegeben.

$$\Delta G = RT \ln K_i \quad (3.2)$$

In Gleichung (3.2) ist R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur in Kelvin.

Oft wird statt des K_i -Wertes der so genannte IC_{50} -Wert (inhibitory concentration) oder auch der EC_{50} -Wert (effective concentration) angegeben. Der IC_{50} -Wert gibt an, bei welcher Ligandkonzentration die Aktivität des Enzyms oder eines Proteinsystems (Rezeptor + gekoppelte Enzymkaskade) um die Hälfte absinkt. Die allgemeinere Bezeichnung des EC_{50} -Wert lässt auch Enzyme/Proteinsysteme zu, bei denen die Bindung des Liganden zu einer Aktivitätssteigerung führt. Der EC_{50} -Wert bezeichnet die Konzentration des Liganden, bei der die Aktivitätsänderung halbmaximal ist. Im

Gegensatz zum K_i -Wert hängen diese Werte von der Enzym/Proteinkonzentration ab. Die Erfahrung zeigt jedoch, dass in erster Näherung die Kurven beider Werte parallel verlaufen, sodass die einfacher bestimmbareren IC_{50} -Werte (EC_{50} -Werte) zur Charakterisierung eines Liganden (Enzymblockers oder -aktivators) meist ausreichend sind.

Für die Stärke der Proteinbindung sind nicht nur die Größe und Gestalt der Liganden wichtig, sondern auch unterschiedliche Arten von Wechselwirkungen, die sich aus der chemischen Struktur der Liganden ergeben. Liganden können an die Bindungsstelle sowohl über nichtkovalente Wechselwirkungen als auch über kovalente Bindungen binden. Letztere sind eher selten und führen dann zu einer irreversiblen Blockade der Enzyme. Verschiedene nichtkovalente Wechselwirkungen sollen im Anschluss kurz erläutert werden. Mit dem Programm GRID [3] (vergleiche Kapitel 3.5.2) lassen sich diese Wechselwirkungen berechnen und als dreidimensionale Felder darstellen, die man zum Vergleich unterschiedlicher Moleküle heranziehen kann.

3.2.1 Wasserstoffbrücken

Wasserstoffbrücken werden häufig bei der Bindung eines Liganden im Protein beobachtet. Der Partner, der das Proton trägt, wird als Wasserstoffdonor bezeichnet. Die Gegenpartei, ein Atom mit elektronegativer Partiaalladung, wird als Wasserstoffakzeptor benannt. Der Grund für die Anziehung zwischen Akzeptor und Donor-Gruppe liegt darin, dass der Wasserstoff der Donorgruppe an ein stark elektronegatives (elektronenziehendes) Atom gebunden ist. Seine Elektronendichte wird zum Partneratom verschoben, was dem Akzeptoratom in der H-Brücke erlaubt näher an das Wasserstoffatom heranzurücken, als das von den van-der-Waals-Radien her möglich wäre. Die elektrostatische Anziehung wird größer.

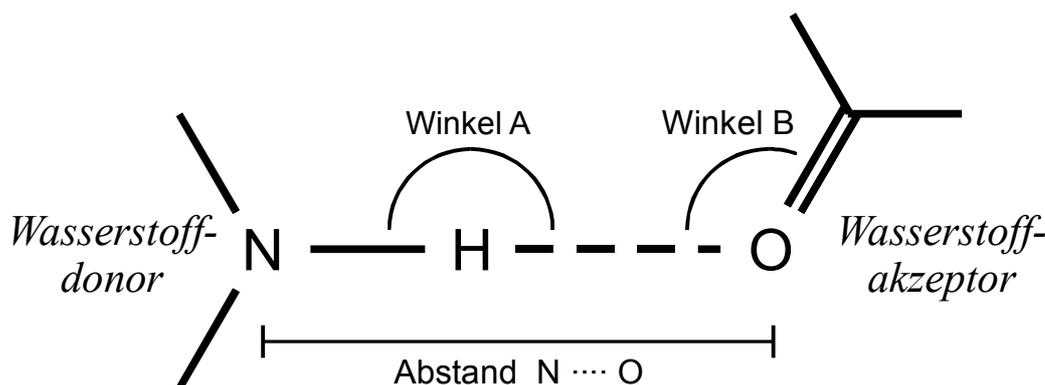


Bild 3.11: Winkel einer Wasserstoffbrückenbindung

Die Stärke dieser Wechselwirkung ist besonders abhängig von dem Winkel und Abstand der Wechselwirkungspartner. Typischerweise liegt der Abstand zwischen dem Akzeptor- und Donoratom zwischen 2,8 und 3,2 Å. Der Winkel A (vgl. Bild 3.11) ist

praktisch immer größer als 150° . Für den Winkel B wird eine Schwankungsbreite von 100° bis 180° beobachtet.

3.2.2 Ionische Wechselwirkung

Wechselwirkungen von geladenen Gruppen werden als ionische Wechselwirkungen oder auch als Salzbrücken bezeichnet. Sie sind bei kleinem Abstand besonders stark. Prominentes Beispiel für diese Wechselwirkung sind die vier ringförmig angeordneten Glutamate am Calciumkanal, die ein Calciumion selektiv stabilisieren können („Selektivitätsfenster“) [21, 51].

3.2.3 Hydrophobe Wechselwirkung

Hydrophobe Wechselwirkungen entstehen z.B. zwischen unpolaren Aminosäure-Seitenketten des Proteins und den lipophilen Teilen des Liganden durch Verdrängung von „schlecht gebundenen“ Wassermolekülen (entropischer Effekt). Sie sind ungerichtet, es kommt also nur auf die räumliche Nähe und die Größe der Kontaktfläche zwischen den wechselwirkenden Gruppen an. Die geometrische Lage zueinander hat keinen Einfluss auf die Stärke der Wechselwirkung. (Einzig wechselwirkende aromatische Systeme nehmen eine bestimmte Orientierung zueinander ein.) Die diskreten Wechselwirkungsenergien sind wesentlich kleiner als bei polaren Wechselwirkungen. Durch den hohen Gesamtbetrag dürfen sie jedoch nicht vernachlässigt werden.

3.2.4 Kation- π Wechselwirkung

In Kristallstrukturen wurde häufig beobachtet, dass quartäre Ammoniumgruppen bevorzugt Wechselwirkungen mit aromatischen Resten eingehen (Bsp. Acetylcholinesterase). Diese Wechselwirkung beruht auf dem polarisierenden Effekt der positiven Ladung auf die π -Elektronen-Wolke der Aromaten.

3.3 Konformationsanalyse

In den seltensten Fällen sind Moleküle so rigide, dass sie nur in einer einzigen Konformation vorkommen. Die meisten Moleküle lassen sich durch Drehung einer oder mehrerer Bindungen in verschiedene energetisch erlaubte Konformationen überführen. Bei der günstigsten Konformation spricht man vom globalen Minimum. Andere energetisch günstige Zustände bezeichnet man als lokale Minima. Sie spiegeln die Konformationen des Moleküls wider, in denen es häufiger vorliegt. Mit der Anzahl der frei drehbaren Bindungen steigt auch die Anzahl der möglichen Energieminima. Das mathematische Verfahren, um das nächste Minimum zu einer Konformation zu finden, wird als Minimierung bezeichnet. Die Suche nach allen lokalen Minima (und dem globalen Minimum) wird Konformationsanalyse genannt. Für die Konformationsanalyse sind verschiedene Verfahren entwickelt worden.

3.3.1 Systematische Konformationsanalyse

Eine systematische Konformationsuche kann rechenstechnisch nur bei einer begrenzten Anzahl frei rotierbarer Bindungen durchgeführt werden. Es werden alle möglichen Torsionswinkel für die Bindungen eingestellt und die jeweiligen Energiewerte berechnet. Entsprechend der Formel (3.3) geht dabei die Anzahl der frei rotierbaren Bindungen exponentiell in die Anzahl zu berücksichtigender Konformere ein und steigt sehr rasch an.

$$n = \left(\frac{360^\circ}{x^\circ} \right)^y \quad (3.3)$$

- n: Anzahl der Konformere
x: Rotationsinkrement
y: Anzahl frei drehbarer Bindungen

3.3.2 Monte-Carlo-Verfahren

Für Moleküle mit einer größeren Anzahl frei drehbarer Bindungen wurden Methoden entwickelt, die den Konformationsraum nicht mehr systematisch (vollständig) absuchen. Durch wiederholtes zufälliges Einstellen der Torsionswinkel („random search“) werden viele Ausgangsstrukturen generiert, die dann minimiert werden. Bei einer genügend hohen Anzahl von Startkonformationen kann man davon ausgehen, dass der Konformationsraum weitestgehend abgedeckt ist und die energetisch günstigste Struktur das globale Minimum widerspiegelt. Nachteilig ist die Unsicherheit, ob die Suche vollständig abgeschlossen wurde und damit das gefundene Minimum mit dem globalen Minimum übereinstimmt.

Diese Methode erwies sich als besonders effizient für Cycloheptadecan [52]. Speziell für cyclische Verbindungen mit mehreren optisch aktiven Zentren müssen aber bei Monte-Carlo-Verfahren besondere Filter eingebaut werden, die die Strukturen auf „falsch“ generierte Verbindungen überprüfen. Um die Torsionswinkel zufällig einzustellen, werden cyclische Verbindungen aufgebrochen und nach dem Einstellen wieder geschlossen. Dabei sollten sich die Enden in unmittelbarer Nähe befinden und bei erfolgreichem Ringschluss müssen die Stereozentren überprüft werden, was die Effizienz stark beeinträchtigen kann.

3.3.3 Moleküldynamiksimulation

Als Alternative wird die Methode der Moleküldynamiksimulation verwendet. Hierbei wird dem Molekül eine bestimmte Energie über einen definierten Zeitraum zugeführt.

Zu definierten Zeitpunkten können Geometrien abgespeichert werden, die dann als Ausgangspunkt für eine Minimierung genutzt werden. Je höher die gewählte Temperatur, desto größer sind die Energiebarrieren, die in der Moleküldynamiksimulation überwunden werden können.

Ein Sonderfall der Moleküldynamiksimulation ist das „Simulated-Annealing“-Protokoll. Dabei wird im Laufe der Dynamiksimulation die Temperatur periodisch verändert. Die Substanz wird nach einer Initialisierungsphase auf eine hohe Temperatur aufgeheizt, um bestehende Energiebarrieren zu überwinden. Anschließend wird das System langsam abgekühlt (eingefroren), wodurch das Molekül schließlich in der Nähe oder direkt in einem Minimum eingefroren wird. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der normalen Moleküldynamiksimulation liegt in der Reduktion temperaturverzerrter Strukturen, die sich später schlecht minimieren lassen.

3.4 Pharmakophorhypothese

Bei der Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein liegt der Ligand in einer spezifischen Bindungstasche. Die Struktur dieser Tasche legt die räumliche Lage und Orientierung des Liganden fest. Die funktionellen Gruppen des Liganden finden ihre entsprechenden Wechselwirkungspartner in der Proteinbindungstasche. Die räumliche Anordnung der für die Bindung verantwortlichen funktionellen Gruppen des Liganden wird als Pharmakophor bezeichnet. Ist dieser bekannt, so können Liganden entsprechend modifiziert oder neu entwickelt werden, ohne dass die Proteinbindungstasche bekannt sein muss.

3.5 Molekulare Eigenschaften

Potenzielle Wechselwirkungen eines Moleküls (vgl. Kapitel 3.1) hängen nach der Pharmakophorhypothese stark von dessen Orientierung im Raum ab. Sie lassen sich so nicht mehr durch eine ein- oder zweidimensionale Funktion darstellen. Das dreidimensionale Erscheinungsbild wird am besten in einem dreidimensionalen Gitter dargestellt, wobei jedem Gitterpunkt ein Wert zugeordnet wird, der die entsprechende Wechselwirkungsenergie repräsentiert. Hierbei lässt sich leicht vorstellen, dass die Fülle an Informationen rapide steigt, je größer die Ausdehnung des Moleküls (bzw. die der betrachteten Box) ist und je kleiner der Abstand der Gitterpunkte zueinander gewählt wird.

Erst durch Einsatz eines Rechners mit Grafik- und Stereo-Option können solch komplexe Wechselwirkungsfelder ausgewertet werden. Durch so genannte Konturdiagramme können ähnlich den Höhenlinien auf einer Wanderkarte Punkte gleicher Energiehöhe verbunden werden.

3.5.1 Molekulares elektrostatisches Potenzial (MEP)

Durch die unterschiedlichen Elektronegativitäten der einzelnen Atome in einem Molekül kommt es zu einer Elektronenverschiebung im Molekülorbital. Gleichzeitig induziert das Molekül ein elektrisches Feld in seiner Umgebung. Berechnet man Interaktionsenergien einer positiven Punktladung für alle Gitterpunkte außerhalb der van-der-Waals-Oberfläche mit der Elektronendichteverteilung im Molekül, so lässt sich das molekulare elektrostatische Potenzial (MEP) für dieses Molekül darstellen. Dieses Feld ist für die molekulare Fernerkennung des Moleküls mit seinem Rezeptor wichtig. Dabei gibt es entweder positive oder negative Felder. Zwei positive bzw. zwei negative Felder stoßen sich ab, gegensätzliche Felder ziehen sich an. Das Molekül, das sich dem Rezeptor bzw. seiner Bindungstasche nähert, wird unterschiedlich stark angezogen oder abgestoßen, und somit in seiner Orientierung ausgerichtet.

Wird die Wellenfunktion eines Moleküls quantenchemisch berechnet, so kann die Elektronendichteverteilung direkt abgeleitet werden. Dies ist die beste und genaueste Methode. Für viele Moleküle kommt sie jedoch aufgrund der großen Anzahl der Atome und der damit verbundenen hohen Rechendauer nicht in Betracht. Daher wird in den meisten Kraftfeld-basierten Molecular Modelling Softwarepaketen die Elektronendichteverteilung vereinfacht dargestellt. Auf die einzelnen Atomzentren werden Partialladungen gesetzt, die die Ladungsverteilung im Molekül repräsentieren sollen. Aus dieser physikalisch nicht messbaren Größe lässt sich durch Anwendung der Coulomb-Formel wieder ein MEP generieren. Der Vorteil besteht darin, dass sich die Partialladungen von anderen Programmpaketen leicht importieren lassen.

Für die Berechnung dieser Partiaalladungen werden grundsätzlich zwei Methoden verwendet [53, S. 38 ff.].

3.5.1.1 Topologische Partiaalladungen

Topologische Ladungen werden durch Berücksichtigung von Elektronegativitäten der Atome, von ihrem Hybridisierungsgrad und durch die Konnektivitätsmatrix berechnet. Ein Beispiel ist die Gasteiger-Hückel-Methode, bei der die Gasteiger-Marsili-Methode zur Berechnung des σ -Elektronenanteils mit der alten Hückel-Theorie zur schnellen Berechnung des π -Elektronenanteils kombiniert worden ist. Diese für jeden Atomtyp bestimmten Partiaalladungen sind in den meisten Kraftfeldern standardmäßig implementiert. Die Programme können auf diese Weise sehr schnell, auch für Moleküle mit einer großen Anzahl von Atomen (>10.000), die Partiaalladungen setzen, wobei allerdings konformative Änderungen unberücksichtigt bleiben. In den meisten Fällen reicht dies für die Simulation von Molekülen jedoch aus.

3.5.1.2 Quantenchemisch berechnete Partiaalladungen

Bei der quantenchemischen Berechnung werden die Partiaalladungen aus der Wellenfunktion abgeleitet. Diese kann entweder mit semi-empirischen oder *ab initio*-Verfahren generiert werden. Dabei ist der Aufwand für die Berechnung mit der

notwendigen Genauigkeit abzuwägen. Für größere Peptide oder sogar Proteine können bedingt durch die hohe Anzahl an Atomen höchstens noch semi-empirische Verfahren wie AM1 oder PM3 angewendet werden.

Aus der Wellenfunktion wurden in einer älteren Methode die Partialladungen durch Populationsanalyse (Mulliken-Methode) gewonnen. Dabei wird die Elektronendichte der Wellenfunktion entnommen und aufgrund der Orbitalbesetzung auf benachbarte Atome verteilt. Nachteile der Methode sind die starke Abhängigkeit vom gewählten Basissatz der quantenchemischen Rechnung und die häufig unnatürlichen Ergebnisse.

Eine neuer entwickelte Methode generiert die Partialladungen durch mathematische Überlagerung und Anpassung (auch „electrostatic potential (ESP) fit“-Methode genannt). Die Partialladungen auf den Atomen werden so lange optimiert, bis sie einen aus der Elektronendichteverteilungsfunktion berechneten Satz von Ladungspunkten um das Molekül am besten entsprechen. Dadurch werden wesentlich bessere Ergebnisse erzielt als mit der Mulliken-Populationsanalyse.

Unabhängig davon, mit welcher Methode die Ladungsverteilung festgelegt wurde, sollte man die elektronischen Eigenschaften von Molekülen möglichst gegen experimentelle Daten abgleichen. Aus den Partialladungen läßt sich sehr leicht das Dipolmoment des Moleküls berechnen, welches experimentell bestimmt werden kann. Für einen Vergleich von MEP-Feldern zweier Moleküle ist es sinnvoll, möglichst gleiche Berechnungsmethoden zu wählen.

3.5.2 Gridfelder

Für die molekulare Ähnlichkeit zwischen zwei Molekülen reicht die Beschreibung der MEP-Felder nicht aus. Peter Goodford entwickelte deshalb das Programm GRID, mit dessen Hilfe man unterschiedliche Eigenschaften von Liganden und Rezeptoren auf einfache Weise berechnen und dreidimensional visualisieren kann [54]. Vom Benutzer kann eine Sonde (definiertes Atom oder funktionelle Gruppe) ausgewählt werden, für die das Programm alle auf einem vorher definierten Gitter gelegenen Wechselwirkungsenergien berechnet. Der Vorteil des Verfahrens liegt in der Auswahl der Molekülsonden, für die unterschiedliche Wechselwirkungen und Eigenschaften definierbar oder schon vordefiniert sind, sowie in der Berechnungsgeschwindigkeit. Zu den Parametern, die die Eigenschaften der Probe definieren, zählen van-der-Waals-Radius, Elektronenanzahl, Polarisierbarkeit, Teilladung und mehrere Wasserstoffbrückenparameter. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die drei Proben mit den in Tabelle 3.2 beschriebenen Eigenschaften verwendet.

Tabelle 3.2: Parameter verschiedener GRID-Sonden, die zur Anwendung kamen.

Spezifische Eigenschaften der molekularen Sonden	O-Probe (Carbonyl-sauerstoff)	N1-Probe (amidische NH-Funktion)	DRY-Probe (hydrophobe Sonde)
van-der-Waals-Radius (in Å)	1,6	1,65	1,7
effektive Anzahl der Elektronen	6	7	7
Polarisierbarkeit (in Å ³)	0,84	1,40	1,20
Partiellladung	-0,25	-0,08	0,00
Optimale H-Brücken-Bindungsenergie (in kcal/mol)	-4,0	-4,0	-4,5
Optimaler Radius der H-Brücke (in Å)	1,4	1,6	1,4
Anzahl der donierten H-Brücken	0	1	2
Anzahl der akzeptierten H-Brücken	2	0	2
H-Brücken Typ	8	0	91

Die Wechselwirkungsenergie berechnet sich für jeden Gitterpunkt entsprechend der Gleichung:

$$E_{\text{gesamt}} = \sum E_{\text{vdW}} + \sum E_{\text{elec}} + \sum E_{\text{hb}} \quad (3.4)$$

E_{vdW} : Van-der-Waals-Energie, berechnet mit der Lennard-Jones-Funktion

E_{elec} : Elektrostatische Energie, berechnet mit einem modifizierten Coulomb-Potenzial [55]

E_{hb} : Wasserstoffbrückenenergie [55]

Das Wasserstoffbrückenbindungs-Potenzial der untersuchten Verbindungen lässt sich durch die Carbonyl- und die amidische NH-Probe darstellen. Die Carbonylprobe zeigt Bereiche des Moleküls, in dem Wasserstoffbrücken doniert werden, die NH-Probe Bereiche, in denen Wasserstoffbrücken akzeptiert werden.

Eine Methyl-Probe simuliert die Dispersionswechselwirkungen mit einer lipophilen Methyl-Gruppe. Diese sind zwar wesentlich schwächer als Wasserstoffbrücken, liefern jedoch in ihrer Summe einen wichtigen Beitrag zur Gesamtwechselwirkungsenergie besonders für aromatische Systeme. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht die Methylsonde, sondern die DRY-Probe verwendet. Diese detektiert Regionen im Molekül, die hydrophobe Wechselwirkungen eingehen können. Es handelt sich dabei eigentlich um eine modifizierte Wasser-Probe, mit der die hydrophilen Wechselwirkungen detektiert werden. Über den besonderen H-Brücken-Typ 91 wird das Programm angewiesen, das Molekül wie ein Wasser-Molekül zu positionieren und entsprechend möglicher H-Brücken auszurichten. Dann berechnet es die Summe der entropischen und der Lennard-Jones Energie abzüglich der Energie, die durch mögliche H-Brücken eines Wassermoleküls gewonnen worden wäre [3, Manual S. 146-151].

3.5.3 Connolly-Oberfläche

Die Connolly-Oberfläche wird häufig in Molecular Modelling Studien verwendet, um Eigenschaften der Moleküle auf ihrer Oberfläche darzustellen. Sie wird auch „solvent accessible surface“, d.h. „Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche“, genannt. Zu ihrer Generierung stellt man sich vor, dass ein Lösungsmittelmolekül mit einem bestimmten Radius wie eine Kugel über die van-der-Waals-Oberfläche rollt. Kleinere Kavitäten zwischen den Einzelatomen, die dann auch für ein Lösungsmittelmolekül nicht zugänglich sind, werden zum Volumen des Moleküls gerechnet [53, S.43].

In dieser Arbeit wurde die Connolly-Oberfläche hauptsächlich aus zwei Gründen generiert. Sie ergibt einen guten Volumeneindruck der zu vergleichenden Moleküle bzw. Molekülteile. Außerdem wird die Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials deutlicher. Da programmbedingt das Potenzial auch innerhalb der Atome bzw. innerhalb des Moleküls berechnet wird, können durch die Connolly-Oberfläche die entsprechenden Punkte verdeckt und nur die relevanten Bereiche „außerhalb“ des Moleküls visualisiert werden.

Zur Berechnung wurde ein Radius für das simulierte Lösungsmittelmolekül von 1,4 Å verwendet (Standardeinstellungen im Programm INSIGHT).

3.6 Reguläre Strukturen in Proteinen und Peptiden

Proteine und Peptide lassen sich in ihrer Struktur nicht vollständig durch die Abfolge der Aminosäuren (Sequenz) beschreiben. Neben dieser als Primärstruktur bezeichneten Strukturebene existieren noch weitere, die zur vollständigen Beschreibung eines Proteins notwendig sind. Unter der Sekundärstruktur versteht man die Faltung der Peptidkette. Die Tertiärstruktur bezieht die Konformation der Seitenketten mit ein. Mit der höchsten Strukturebene, der Quartärstruktur, werden Aggregate mehrerer Proteine (Bsp. Dimere) verstanden [56, 57]. Ein Beispiel dafür ist der strukturell aufgeklärte Kaliumkanal aus *Streptomyces lividans*, der aus vier identischen Proteinen (α -

Untereinheiten) zusammengesetzt ist und erst dadurch zu einem funktionsfähigen Kanal wird.

Bei der Kettenkonformation (also Sekundärstruktur) werden generell zwei Zustände unterschieden. Es gibt geordnete Bereiche, in denen für die Winkel der Aminosäuren im Rückgrat (Backbone) der Peptidkette immer wiederkehrende gleiche Werte gefunden werden, und Bereiche, in denen eine solche Periodizität nicht auftritt. Letztere werden als Windung (coil) oder zufällige Windung (random coil) bezeichnet. Ihnen haftet immer der Anschein eines ungeordneten Bereichs an, obwohl auch diese Bereiche genauso geordnet und stabil sein können wie die „geordneten Bereiche“, ihnen fehlt nur die Periodizität [58].

Die α -Helix- und die β -Faltblatt-Struktur gehören zu den oben erwähnten geordneten Bereichen. Sie sind vor allem für die Strukturstabilität der Proteine und Peptide interessant. Zu den nichtperiodischen Bereichen gehören so genannte Wendungen (turns), Verbindungsstücke (connections) und kompakte Schleifen (compact loops).

3.6.1 Die Helix

Bei den Helices (z.B. α -Helix; 3_{10} -Helix) nehmen die Aminosäuren in der Peptidkette eine energetisch begünstigte Konformation ein. Man muss sich vorstellen, dass sich die Peptidkette um einen Zylinder windet. Hierbei bilden sich gegenüberliegende peptidische CO- und NH- Gruppen günstige H-Brücken aus. Dabei ist eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren pro Windung möglich, was jeweils einem eigenen Helix-Typ entspricht. In der vorliegenden Arbeit werden die Helices nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

3.6.2 Das β -Faltblatt

Die als β -Faltblatt-Struktur bezeichnete Anordnung der Peptidkette besitzt größere Relevanz für die Untersuchung der Toxinstruktur FS2. Bei den Faltblattstrukturen werden die freien H-Brücken-Bindungsstellen (CO- und NH-Gruppen) nicht durch Partner aus dem Backbone desselben Strangs abgesättigt, sondern durch einen benachbarten Peptidstrang. Dabei sind prinzipiell zwei Anordnungen denkbar, die beide auch in der Natur vorkommen. Bei der gleichläufigen (parallelen) Anordnung liegen C-terminale bzw. N-terminale Enden beider Ketten auf der gleichen Seite, bei der gegenläufigen (antiparallelen) Anordnung an entgegengesetzten Seiten.

In der untersuchten FS2-Toxinstruktur (Bild 2.10) stabilisieren neben den vier Disulfidbrücken ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt Loop I und ein ausgedehntes antiparalleles β -Faltblatt Loop II sowie den inneren Strang von Loop III.

3.6.3 Der β -Turn

Die nicht-periodischen „geordneten“ Strukturen in Proteinen und Peptiden sind meistens Verbindungsstücke zwischen Helices und Faltblattstrukturen oder kompakte

Schleifen. Die β -Turns repräsentieren dabei gleichzeitig die kürzesten Verbindungsstrukturen und kompaktesten Schleifen. Sie kommen aber auch in längeren Schleifen, losgelöst von Faltblatt- und Helix-Strukturen, vor.

Ursprünglich wurde als Kriterium für β -Turns eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen der CO-Gruppe der ersten Aminosäure (i) und der NH-Funktion der vierten Aminosäure (i+3) angenommen (Bild 3.12) [59]. Heute wird die Charakterisierung durch Berücksichtigung spezifischer Φ - und Ψ -Winkeln mit der Fähigkeit zur Wasserstoffbrücken-Bildung herangezogen. Dabei sind hauptsächlich ausgeprägte Winkelkombinationen beobachtet worden, die Wasserstoffbrücken bilden. Dieselben Winkelkombinationen wurden aber auch bei Turns ohne Wasserstoffbrückenbildung beobachtet [58].

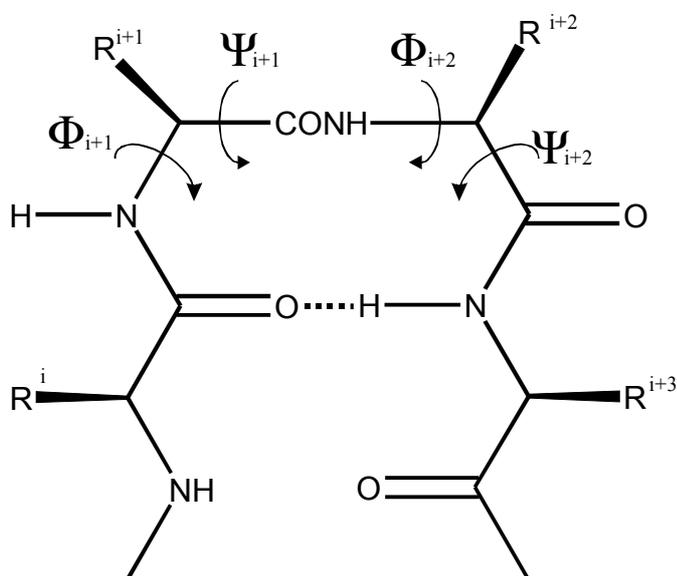


Bild 3.12: Nomenklatur der Aminosäuren und Winkel der Peptidkette in β -Turns

Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Turn-Typen, die in der PDB-Datenbank beobachtet werden. Dabei sind als Grenze für drei Winkel ± 30 Grad und bei maximal einem Winkel ± 45 Grad zugelassen. Die mit ($^{\circ}$) gekennzeichneten Turns werden als inverse Turns bezeichnet. Der Übersicht halber sind auch die Φ - und Ψ -Winkel der Helices und der besonders engen γ -Turns aufgelistet.

Der Typ-I-Turn gehört zu den am häufigsten auftretenden Turns und könnte damit als „allgemeiner Turn“ bezeichnet werden. Seine definierten Winkel der Aminosäure 2 ($i+1$) in α -helikaler und Aminosäure 3 ($i+2$) in 3_{10} -Konformation können von jeder beliebigen Aminosäure günstig eingenommen werden.

Der Typ-II-Turn kann als Glycin-Turn bezeichnet werden. Bei seiner Winkelzusammensetzung – Aminosäure 2 ($i+1$) in poly-Pro-Anordnung und Aminosäure 3 ($i+2$) in

links drehender 3_{10} -Konformation – kommt in fast 60 Prozent der Turns an Position drei ein Glycin vor. Die links-drehende 3_{10} -Konformation ist nur für Glycin günstig, da das in anderen Aminosäuren vorhandene beta-C-Atom den Carbonylsauerstoff der Aminosäure (i+1) fast berührt.

Der β -VIa-Turn wird auch als cis-Prolin-Turn bezeichnet. Bei ihm liegt die Aminosäure 2 (i+1) mit einer cis-Bindung vor. Da die cis-Peptidbindung nur bei Prolin gehäuft beobachtet wird, ist Prolin die prädestinierte Aminosäure für Position 2.

Tabelle 3.3: Diederwinkel der verschiedenen Turn-Typen und Helices nach [60, 61]

Peptid Winkel	i+1		i+2	
	Φ	Ψ	Φ	Ψ
β-Turns				
Typ I	-60°	-30°	-90°	0°
Typ I'	60°	30°	90°	0°
Typ II	-60°	120°	80°	0°
Typ II'	60°	-120°	-80°	0°
Typ III	-60°	-30°	-60°	-30°
Typ III'	60°	30°	60°	30°
Typ V	-80°	80°	80°	-80°
Typ V'	80°	-80°	-80°	80°
Typ VIa	-60°	120°	-90°	0°
Typ VIb	-120°	120°	-60°	150°
γ-Turns				
Turn	70° bis 85°	-60° bis -70°		
inverser Turn	-70° bis -85°	60° bis 70°		
Helices				
α -Helix	-57°	-47°		
3_{10} -Helix	-60°	-30°		

3.6.3.1 Rolle von Prolin im Protein/Turn

Im Unterschied zu allen anderen Aminosäuren und im besonderen Gegensatz zu Glycin besitzt Prolin durch den Ringschluss in seiner Seitenkette eine zusätzliche Einschränkung des konformativen Freiraums. Die konformative Beschränkung allein ist jedoch von untergeordneter Bedeutung, da sie lediglich die Entropie einer Verbindung verringert. Bemerkenswert aber ist, dass Prolin weder in das reguläre Muster einer α -Helix noch in das eines β -Faltblattes passt. Neben der fehlenden NH-Funktion für das notwendige Wasserstoffbrückenmuster belegt die Seitenkette den Raum, den die Nachbarseitenkette einnehmen sollte.

Prolin wirkt demnach also hauptsächlich als Brecher regulärer Strukturen. Zusätzlich taucht Prolin aber auch häufig einleitend an Position 1 einer Helix auf. Es ist dort die zweithäufigste Aminosäure und erlangt dadurch eine Starterfunktion.

Was jedoch Prolin wirklich herausragend macht, ist das Auftauchen in Turns. Dort hat es die höchste spezifische Präferenz gegenüber allen anderen Aminosäuren. Es ist häufig an Position 2 in Typ I- und Typ II-Turns.

Durch die relative Abwesenheit im Inneren regulärer Sekundärstrukturen liegt Prolin als hydrophobe Aminosäure bevorzugt an der Oberfläche von Proteinen und damit eher überraschend in hydrophiler Umgebung vor.

Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft ist das Vorkommen einer cis-Peptidbindung im Gegensatz zur sonst üblichen trans-Verknüpfung. Bei anderen Aminosäuren kommen cis-Bindungen sehr selten vor. Die Energiebarriere zur Rotation der Prolyl-Peptidbindung ist zwar groß, dennoch besitzt Prolin eine Isomerisierungshalbwertszeit von wenigen zehntel Sekunden. Dies ist deshalb von Bedeutung, da Prolin für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einiger Proteinfaltungskinetiken verantwortlich gemacht wird [62, 63].

Die Geometrie des cis-Prolins ist derart gestaltet, dass es immer einen Turn (β VI-Turn oder cis-Prolin-Turn) bilden muss. Dabei liegt Prolin auf Position 3 ($i+2$) im Turn. Die Aminosäure vor dem Prolin (also $i+1$) liegt immer in einer ausgestreckten Seitenkettenkonformation vor.

Liegt der Ψ -Winkel des cis-Prolins bei 0 Grad, so entsteht ein β VIa-Turn. Die NH-Funktion der Aminosäure ($i+3$) bildet eine Wasserstoff-Brückenbindung zur CO-Funktion der Aminosäure (i).

Beim Ψ -Winkel von $+150^\circ$ (β VIb-Turn) ist die CO-Funktion der Aminosäure ($i+3$) ins Innere des Turns gerichtet, wodurch keine Wasserstoffbrückenbindung möglich ist.

Vor cis-Prolinen beobachtet man bevorzugt Phe, Tyr und Leu, während die Aminosäuren Ile, Val und Thr sehr selten gefunden werden. Auch geladene Aminosäuren grenzen äußerst selten an cis-Proline, neben trans-Prolinen findet man sie dagegen häufig.

3.6.3.2 Rolle von Glycin im Turn

Glycin als kleinste und einzige natürliche Aminosäure mit achiralem alpha-C-Atom spielt ebenfalls eine besondere Rolle in Turns. Durch die fehlende Seitenkette ist der konformative Freiraum des Glycins erweitert. Konformationen, die linksdrehende Helices erzeugen, sind energetisch äquivalent zu Konformationen, die rechtsdrehende Helices erzeugen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Turns, die eine L-3₁₀-Konformation voraussetzen, bevorzugt Glycin (mit positivem Φ -Winkel) enthalten. Bei Typ II-, Typ II'- und Typ I'-Turns werden daher häufig Glycine gefunden. Bei dem sehr engen inversen Turn vom Typ I' taucht Glycin gleich doppelt in Position i+1 und i+2 auf.

3.7 Struktur von kleinen cyclischen Peptiden

Die biomedizinische Forschung zeigt, dass Peptide in Kontrollmechanismen nahezu aller Körperfunktionen involviert sind. Die Zahl bekannter hochaktiver Peptidwirkstoffe, die als Ausgangspunkt zur Suche nach optimierten Wirkstoffen dienen, steigt stetig. Aus der Historie seien exemplarisch folgende Verbindungen aufgeführt: Oxytocin, Vasopressin, Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), Somatostatin, Thyroliberin, Enkephaline, Endorphine, Angiotensin, Bradykinin, Calcitonin, Pepstatin, Gastrin, Cholecystokinin (CCK), Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF), Substanz P, Neuropeptid Y (NPY), Endothelin und Epidermaler Growth Factor (EGF) [64]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine intensive Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen pharmakologisch wichtiger Sequenzen und Sequenzteile läuft. Dabei wirkt sich die konformative Freiheit und Vielfalt der Peptidketten als eher hinderlich aus.

Um die Wechselwirkungen und die Wirkkonformation peptidischer Liganden zu ergründen, gibt es im Wesentlichen zwei Vorgehensweisen. Im optimalen Fall liegt eine Kristallstruktur des Peptids gebunden an sein Ziel vor. Hier ist die Konformation des Peptids klar festgelegt und man kann sofort mit dem Design anderer nichtpeptidischer Verbindungen, so genannter Peptidomimetika, beginnen, die günstigere pharmakokinetische Eigenschaften besitzen.

Im ungünstigeren (Normal-) Fall ist die Wirkkonformation nicht bekannt. Hier muss die bioaktive Konformation experimentell durch künstliche Einschränkung des konformativen Freiraums gefunden werden. Dabei haben sich vor allem Cyclisierungen von Peptiden bewährt. Drei Methoden werden verwendet: die Cyclisierung über das Backbone, über Disulfidbrücken oder über andere Seitenkettenfunktionen. Nach Messung der biologischen Aktivitäten werden die aussichtsreichsten Derivate durch Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt. Die aus den NMR-Spektren (meist in Lösung) gewonnenen Abstandsinformationen zwischen einzelnen Atompaaaren werden dann in Moleküldynamiksimulationen als sogenannte „constraints“ verwendet, um ein Ensemble von Konformeren zu generieren, die die experimentellen Werte erfüllen.

Für die allgemeine Verwertbarkeit und den Zugriff auf die Strukturergebnisse solcher NMR-Untersuchungen in Lösung ergibt sich allerdings für kurze cyclische Peptide ein Problem. Die Brookhaven Protein Datenbank (PDB) enthält nur makromolekulare Strukturen, das Cambridge Crystallographic Data Centre (CSD-Datenbank) nimmt nur Röntgenkristallstrukturen kleiner Moleküle auf. NMR-Daten von kleinen cyclischen Peptiden werden also nicht berücksichtigt und müssen somit mühsam aus Artikeln oder Doktorarbeiten herausgesucht werden.

Da sich Prof. Kessler (Technische Universität München) intensiv mit der Synthese und Strukturaufklärung cyclischer Peptide als pharmazeutische Wirkstoffe beschäftigt [65], wurde auf experimentelle Daten aus seinem Arbeitskreis zurückgegriffen. Dabei ist besonders die Doktorarbeit von Kurz [66] über cyclische Modellpeptide und die Veröffentlichung von Müller et al. [67] über β VI-Turns zu erwähnen. Bei der Strukturvorhersage neuer cyclischer Peptide ohne experimentelle Daten (mit Molecular Modelling Methoden) steckt die Forschung noch in den Kinderschuhen. Die heutigen Kraftfelder können die ab initio Faltung eines β -Turns noch nicht sicher vorher-sagen [68, 69]. Daher behilft man sich mit der Untersuchung über die Stabilität einer vorgegebenen Struktur. Bei der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Ausgangsstrukturen der entwickelten Peptide aus der experimentell aufgeklärten 3D-Toxinstruktur abgeleitet. Über Moleküldynamiksimulationen wurde die Stabilität dieser Peptide getestet und evaluiert, ob und wieviele andere stabile Konformere entstehen.

3.8 Minimieralgorithmen im INSIGHT

Ein wichtiger Schritt bei der Untersuchung der molekularen Energiehyperfläche ist das Auffinden von Energieminima. Sie repräsentieren stabile Konformationen und liefern die Grundlage für sinnvolle Strukturanalysen. Der Prozess der Minimierung verändert iterativ die Atomkoordinaten bis ungünstige, verzerrte Strukturen im Molekül beseitigt sind. Dabei muss ein Verfahren von einem beliebigen Punkt auf der Energiehyperfläche den Weg zum nächsten Energieminimum finden.

Die in dieser Arbeit für Kraftfeldrechnungen verwendeten Algorithmen (steepest descent und conjugate gradient) des Programms INSIGHT/DISCOVER gehören zur Klasse der Gradientenverfahren. Sie nutzen die in der ersten Ableitung einer Energiefunktion enthaltenen Informationen für die Suche nach dem nächsten Energieminimum. Das Vorzeichen des Gradienten bestimmt die Richtung, die Größe des Gradienten und die Entfernung zum Minimum.

Um beide Methoden zu verstehen, muss noch der Begriff „line search“, der beiden Verfahren zugrunde liegt, erläutert werden. Die Minimieralgorithmen müssen zu Beginn einer Iteration (nicht zu verwechseln mit der einzelnen Energieberechnung) den Richtungsvektor für die Suche bestimmen. Entlang dieses Vektors (dieser Linie) wird das Minimum gesucht. Wird es auf der Linie gefunden, ist die Iteration abgeschlossen

und der nächste Richtungsvektor wird von diesem Punkt aus bestimmt. Die beiden Verfahren unterscheiden sich nur in der Art der Bestimmung des Richtungsvektors.

3.8.1 Steepest Descent

Bei dem Verfahren „steepest descent“ wird der Richtungsvektor durch Berechnung der ersten Ableitung der Energiefunktion zunächst aus dem Gradienten der Startkonformation und bei der folgenden Iterationen aus dem Gradienten nach vollständig abgeschlossenem „line search“ bestimmt. Im Programm DISCOVER wurde die Methode allerdings dahingehend modifiziert, dass die Positionen der Atome entlang des Richtungsvektors in kleinen Schritten verändert werden. Dadurch kann die starke Oszillation (Zickzack-Kurs) auf dem Weg zum Minimum eingeschränkt werden. Leider wird die absolute Zahl an Iterationen wenig verringert. Der Algorithmus eignet sich besonders zur Minimierung stark verzerrter Strukturen, arbeitet jedoch in der Nähe des Minimums ineffizient [70].

3.8.2 Conjugate Gradient

Beim Verfahren des „conjugate gradient“ wird die Information über den Energiegradienten der vorangegangenen Iteration in die Berechnung des neuen Richtungsvektors mit einbezogen. Dadurch ist der Weg zum Minimum geradliniger. Das Problem der Oszillation tritt nicht mehr auf. Nachteilig ist allerdings der erhöhte Rechenbedarf innerhalb einer Iteration, da jeder „line search“ exakt ausgeführt werden muß. Durch die drastisch reduzierte Zahl der Iterationen führt die Methode trotzdem zu schnellen Ergebnissen. Schwierigkeiten bereiten der Methode aber stark verzerrte, nicht harmonische Systeme, bei denen es leicht zu Konvergenzproblemen kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Methoden immer kombiniert angewendet. Der groben Vorminimierung mit „steepest descent“ wurde die „conjugate gradient“ Methode bis zum eigentlichen Abbruchkriterium (bestimmter Gradient oder Anzahl der Iterationen) nachgeschaltet.

3.9 Energieberechnung im CVFF-Kraftfeld

Für ein molekülmechanisches Kraftfeld wie das CVFF (consistent valence force field), das im Programmpaket INSIGHT/DISCOVER implementiert ist, beschreiben Energiegleichungen die Energiehyperfläche als Funktion ihrer Atomkoordinaten. Dabei stellt man sich die Atome wie in der klassischen Mechanik als Massepunkte vor, die durch Federn miteinander verbunden sind. Die Gleichgewichtswerte werden dabei für verschiedene definierte Atomkombinationen in Atomtypen und die Kraft der Federn in Kraftkonstanten beschrieben. Eine Abweichung aus der Gleichgewichtslage erhöht die einzelnen Energieterme.

Das CVFF-Kraftfeld wurde ausgehend vom CFF (consistent forcefield) nach Lifson für Alkane sukzessive über Alkene und Amide zu einem für Peptide und Proteine optimierten Kraftfeld weiter entwickelt [71, 72, 73, 74]. Die Implementierung von Parametern kleiner Moleküle ermöglichte später auch die Bearbeitung von Protein-Ligand-Komplexen. Für die vorliegende Arbeit wurde die Version 3.0 (INSIGHT/DISCOVER) zur Dynamik-Simulation und Analyse der Peptidkonformationen verwendet. Da die untersuchten Aminosäuren dem Kraftfeld vollständig bekannt sind, mussten keine Anpassungen vorgenommen werden.

3.9.1 Intramolekulare Energie

Zu den intramolekularen Energietermen, die das Kraftfeld berechnet, gehören die Valenzenergien und nichtbindende Energien. Die Valenzenergie setzt sich aus Bindungslängen-, Bindungswinkel-, Torsionswinkel- und der Out-of-plane-Energie zusammen. Zu den nichtbindenden Energien zählen die van-der-Waals- und elektrostatische Energie. Zu den Gleichungen der entsprechenden Terme sei auf die Dokumentation im DISCOVER-Handbuch verwiesen [70]. Wahlweise können im CVFF-Kraftfeld auch „Kreuzterme“ berechnet werden, die eine Kopplung zwischen den einzelnen Energietermen (z. B. Bindungslänge–Bindungslänge oder Bindungslänge–Bindungswinkel oder Bindungslänge–Torsionswinkel) beschreiben. Sie sind unerlässlich, wenn mithilfe des Kraftfeldes Schwingungsfrequenzen berechnet werden sollen. Für die vergleichenden Geometrieuntersuchungen und Moleküldynamiksimulationen ergeben sich aber nur marginale Unterschiede, sodass auf dieses rechenzeitintensive Verfahren verzichtet wurde.

Ein zusätzlicher Term für Wasserstoffbrückenbindungen, die einen wichtigen strukturellen Einfluss auf die Konformation der cyclischen Peptide besitzen, ist im CVFF-Kraftfeld nicht implementiert. Der Energiegewinn, der aus der Bildung einer Wasserstoffbrücke resultiert, wird jedoch hinreichend genau durch das Lennard-Jones-Potenzial, der van-der-Waals-Energie und durch das Coulomb-Potenzial der elektrostatischen Energie wiedergegeben. Daraus folgt dann auch, dass entsprechende H-Brücken-Energien nicht separat für die Auswertung zur Verfügung stehen.

3.9.2 Intermolekulare Energie

Bei den intermolekularen Wechselwirkungen werden nur van-der-Waals- und elektrostatische Energien berücksichtigt.

Bei den Auswertungen der Moleküldynamiksimulationen wird vom Programm standardmäßig die Energie des gesamten Systems berechnet. Das schließt bei der Simulation mit expliziten Wassermolekülen neben der Gesamtenergie des Peptids und seinen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Wasser die Gesamtenergie aller Wassermoleküle und deren Wechselwirkungsenergie untereinander ein. Die Funktion „print energy/molecule“ lässt eine Aufschlüsselung bezogen auf das Peptid (Hauptmolekül) zu. Die Energieangabe beinhaltet also neben der intramolekularen

Energie des Peptids noch die intermolekulare Energie zwischen dem Peptid und den umliegenden Wassermolekülen (Lösungsmittel). Die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen für die Konformation werden damit berücksichtigt. Stabilisierende Wechselwirkungen der zweiten Wasserschicht um das Peptid müssen aber vernachlässigt werden, da sie in der Berechnung der Wasser-Wasser Wechselwirkungen (im Lösungsmittel) verschwinden.

4 Molekulare Grundlagen

4.1 Dihydropyridin-Pharmakophor

Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor wird gerne mit dem Schlüssel–Schloss-Prinzip beschrieben. Die dreidimensionale Form des Schlüssels entspricht der dreidimensionalen Struktur des Liganden, die Form des Schlosses entspricht der Struktur des Rezeptors. Auch wenn der Aufbau des Schlosses (Rezeptors) nicht genau bekannt ist, können Schlüsseln, vergleichbar mit realen mechanischen Schlüsseln, nachgemacht werden. Im Fall des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals ist die genaue dreidimensionale Struktur der DHP-Bindungsstelle nicht bekannt. Auf der Suche nach einem neuen peptidischen Liganden kann also nur von den bisher bekannten Liganden ausgegangen werden (indirekter Ansatz). Da die 1,4-Dihydropyridine relativ einfach über die „Hantzsche Pyridin Synthese“ zugänglich sind, wurden in vielfältiger Weise abgewandelte Dihydropyridine synthetisiert und getestet, sodass sehr genaue Vorstellungen über den Pharmakophor bestehen.

4.1.1 Calcium-Antagonisten

Die erste Substanz, die 1975 in die Therapie eingeführt wurde, war Nifedipin (Adalat[®]), das nach IUPAC als *2,6-Dimethyl-3,5-dicarbomethoxy-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridin* bezeichnet wird (Bild 4.13). Hierbei handelt es sich um ein Derivat mit zwei identischen Estern an C3 und C5 des Dihydropyridin-Rings. Im Gegensatz zu anderen DHP-Derivaten entsteht dadurch kein Asymmetriezentrum an C4. Der Pyridinstickstoff (N1) liegt in allen aktiven Dihydropyridinen als frei zugänglicher Wasserstoffbrücken-donator vor, der nach Loev et al. [75] für die Wirkung essentiell ist.

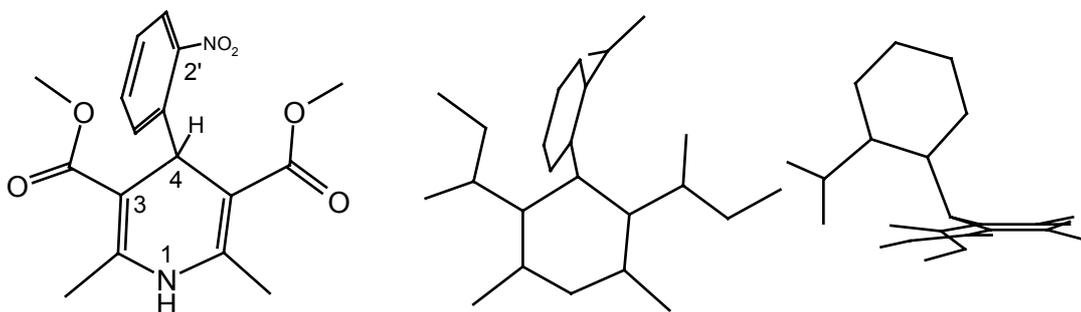


Bild 4.13: Strukturformel links und Röntgenkristallstruktur (CSD-Code BICCIZ) von Nifedipin

Der 4-substituierte Dihydropyridinring nimmt eine flache Bootkonformation ein (Bild 4.13, rechts), die in allen Kristallstrukturen zu beobachten ist. Diese Bootkonformation hat entscheidenden Einfluss auf die Stellung des 4-Aryl-Substituenten. Dieser kann pseudoaxial (Bild 4.14a) oder äquatorial (Bild 4.14b) angeordnet sein. Beim Nifedipin

(Wasserstoff an C4) beobachtet man die pseudoaxiale Anordnung. Ersetzt man den C4-Wasserstoff durch eine Methylgruppe, orientiert sich der Aryl-Substituent äquatorial (Bild 4.14b). Die Aktivität vermindert sich um drei Zehnerpotenzen. Wird die pseudoaxiale Konformation durch eine Schwefelbrücke zu C2 stabilisiert, so bindet die resultierende tricyclische Verbindung (Bild 4.15) weiterhin am DHP-Rezeptor.

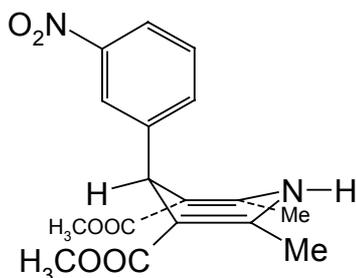


Bild 4.14a: 4-Aryl-Substituent pseudoaxial

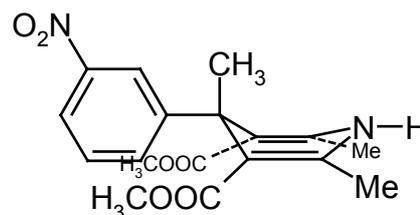


Bild 4.14b: 4-Aryl-Substituent äquatorial

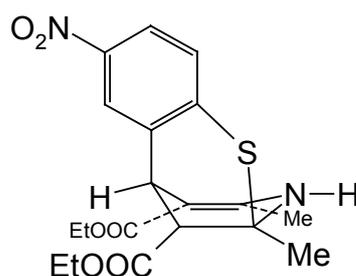


Bild 4.15: Schwefelverbrückte DHP-analoge Verbindung (Tetrahydropyridin)

Neben der Untersuchung an dem Tetrahydropyridin (Bild 4.15) wurde die Stellung des 4-Aryl-Substituenten an konformativ eingeschränkten Dihydropyridinen durchgeführt. Die ungünstige Konformation des Arylringes wurde hier durch Bildung eines Lactons erzwungen (Bild 4.16). Es zeigte sich, dass erst bei einem ausreichend langen (Pentamethylen-) Spacer pharmakologisch wirksame Verbindungen entstehen. Beide Ringsysteme müssen also möglichst orthogonal zueinander angeordnet sein.

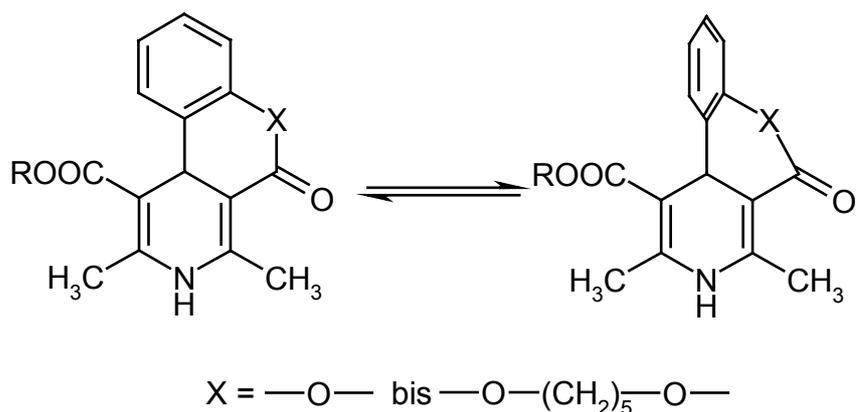


Bild 4.16: Konformativ eingeschränkte DHP

In orthogonaler Stellung sind prinzipiell zwei Rotationsisomere möglich. Am 4-Arylsubstituenten kann die Position der 2'-Nitro- oder 3'-Nitrogruppe bezogen auf den Wasserstoff am C4 Atom synperiplanar (sp) oder antiperiplanar (ap) vorliegen. Sp bedeutet die (Z)-Konfiguration der beiden Substituenten (Bild 4.17a). Das antiperiplanare Derivat mit 2'- oder 3'-Nitrogruppe hat eine um 2 Zehnerpotenzen geringere Aktivität als die synperiplanare Verbindung. Am schwefelverbrückten Derivat lässt sich auch die Stellung der Esterseitenketten bezogen auf den Dihydropyridinring betrachten. Eine axiale Anordnung (b) des Esters reduziert die Aktivität um zwei Zehnerpotenzen. Auch bei Nifedipin (und anderen DHP-Derivaten) liegen die Ester durch die sp²-Hybridisierung der C3- und C5-Atome koplanar (entspricht äquatorial) zum DHP-Ring.

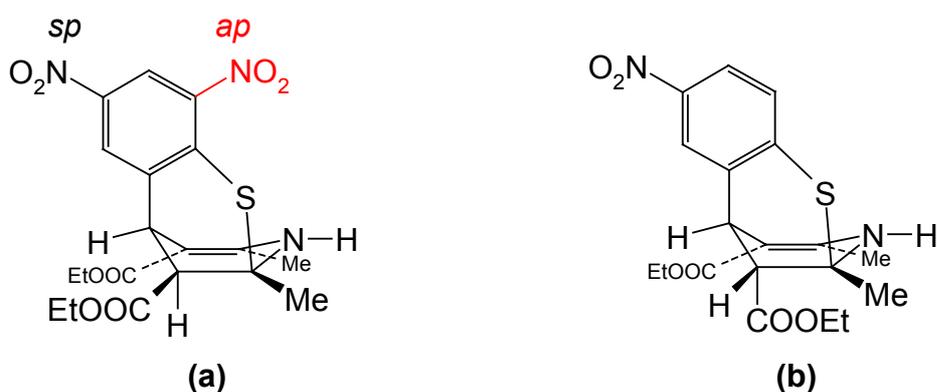


Bild 4.17: Schwefelverbrückte DHP-Analoga

Trotzdem sind auch hier noch zwei Rotationsisomere möglich. Die Ester an C3 und C5 können entweder synperiplanar (sp) oder antiperiplanar (ap) vorliegen. Synperiplanar bezeichnet hier die Stellung der Carbonylfunktion im Ester auf der selben Seite wie die Doppelbindung im DHP-Ring (Z)-Konfiguration. Antiperiplanar ist dementsprechend die (E)-Konfiguration. In [76] berechnete Schleifer quantenchemisch die sechs verschiedenen Konformationen für alle drei Substituenten an C3, C5 und C4. Für die

sp/sp/sp-Konformation (C3/C5/C4) ergab sich die niedrigste Energie. Da in der Kristallstruktur die sp/ap/sp-Konformation vorliegt (d.h. auch die 9,6 kJ/mol ungünstigere Konformation möglich ist), müssen zur Bestimmung der pharmakophoren Konformation verschiedene rigide Derivate mit den dazugehörigen biologischen Aktivitäten betrachtet werden.

Durch die flache Bootkonformation des Dihydropyridinrings haben sich zur einfacheren und eindeutigen Beschreibung der Position der Ester oder äquivalenter Substituenten die nautischen Begriffe Backbord und Steuerbord eingebürgert. Das „Boot“ in Fahrtrichtung mit dem 4-Arylsubstituenten und am Heck dem N1-Stickstoff hat auf der linken Seite Backbord und auf der rechten Seite Steuerbord.

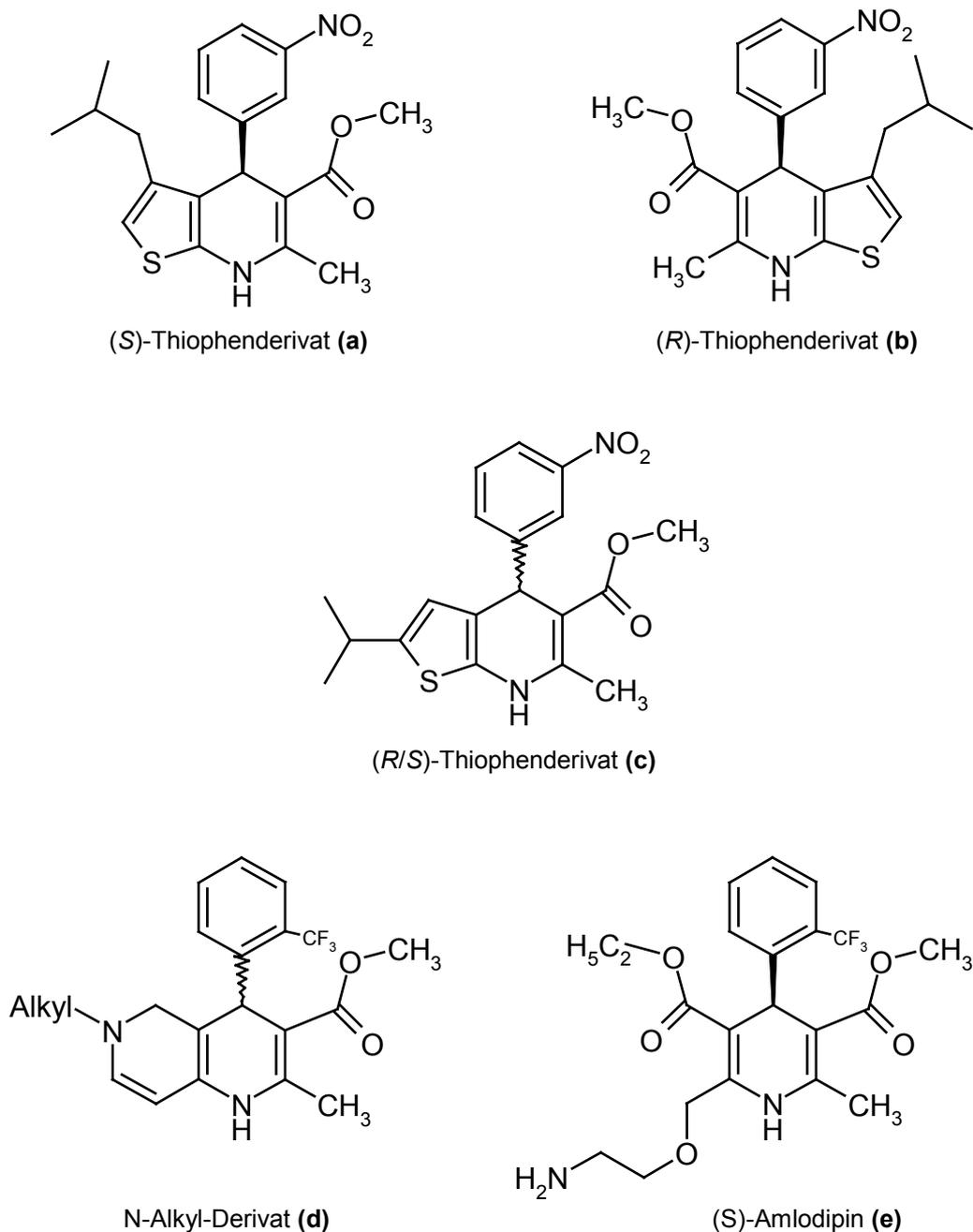


Bild 4.18: Orientierung der DHP-Ester

Für die Backbord-Seite kann man von einer sp -Anordnung des Carbonylsauerstoffs für eine positive Beeinflussung der pharmakologischen Wirksamkeit ausgehen. Diese beruht aber wahrscheinlich nicht auf der Orientierung des Carbonylsauerstoffs, sondern auf der daraus resultierenden Orientierung des lipophilen Restes. Das Thiophenderivat Bild 4.18 **a** mit dem Backbord-Rest in „synperiplanarer“ Lage ist in seiner (S)-Form zwanzigmal calciumantagonistischer als **b** ((R)-Form). Das racemische Derivat **c** mit

dem Backbord-Rest in „antiperiplanarer“ Lage ist nahezu unwirksam. Das N-Alkyl-Derivat **d** zeigt eine ähnliche Wirkungsabschwächung. Eine Vergrößerung des Esters auf der Backbordseite vom Methyl- zum Isopropylester führt zu einer Steigerung der Aktivität um den Faktor fünfzehn. Eine entsprechende Änderung auf Steuerbord zeigt keinen Effekt. Hier scheint das Vorhandensein eines Wasserstoffbrückenakzeptors (C=O) wesentlich wichtiger. Sowohl das racemische Thiophenderivat **c** und damit sein (R)-Derivat **c** als auch das (R)-Derivat **b** sind schlecht wirksam. Tendenziell ist zu beobachten, dass die Derivate mit größeren lipophilen Resten auf der Backbordseite eine größere calciumantagonistische Aktivität besitzen.

Amlodipin **e** schien dabei eine Ausnahme. Dessen (R)-Enantiomer wurde lange Zeit als der pharmakologisch wirksamere DHP-Antagonist beschrieben [77]. Hier läge der kleinere Ester auf der Backbordseite. Wie jedoch durch Röntgenkristallstruktur-Aufklärung mit zwei chiralen Proben von Goldmann et al. [78] gezeigt werden konnte, ist doch (S)-Amlodipin mit dem größeren Ester auf der Backbordseite das wirksamere Enantiomer.

4.1.2 Calcium-Agonisten

Der bisher besprochene Pharmakophor zeichnet ein einheitliches Bild über Dihydropyridinderivate. Alle besitzen einen mehr oder weniger ausgeprägten blutdrucksenkenden (negativ inotropen) pharmakologischen Effekt. Mit der Substanz BAY K 8644 (Bild 4.19a) wurde erstmals ein Dihydropyridinderivat beschrieben, das positiv inotrop, d.h. blutdrucksteigernd wirkt. Es wird zwar nicht klinisch eingesetzt, findet aber vor allem experimentell weite Verwendung. Die Substanz ist kompetitiv zu anderen Dihydropyridinen, was auf einen Angriff an derselben Bindungsstelle hinweist. Unterstützend konnte in Mutationsstudien gezeigt werden, dass identische Aminosäuren den gleichen Einfluss auf die Bindung und die Aktivität von DHP-Antagonisten und Agonisten besitzen [79, 80].

Substituiert man eine Estergruppe gegen eine Nitrofunktion, kehrt sich die Wirkung der Dihydropyridine um. Enantiomerentrennung konnte zeigen, dass für diesen Effekt eine Nitrogruppe auf der Backbordseite notwendig ist. Das entsprechende (R)-Derivat **b** wirkt dagegen als schwacher Calciumantagonist. Auch der Einsatz einer Nitril-Gruppe, einer Methylgruppe oder eines Wasserstoffs an derselben Position führt zu einem „Calciumagonismus“.

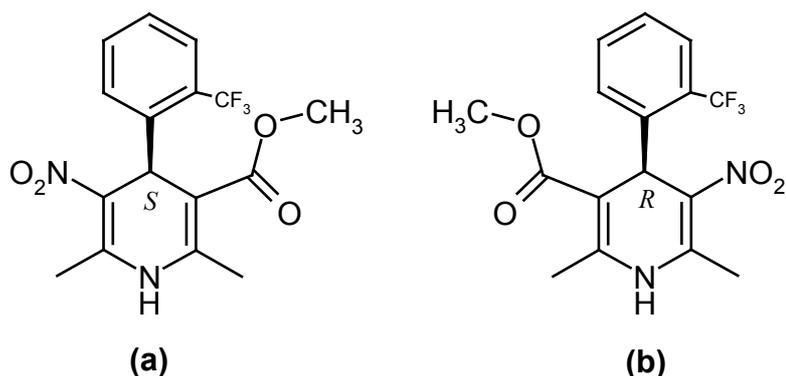


Bild 4.19: Enantiomere von BAY K 8644: **a** – Agonist, **b** – Antagonist

Dabei entsteht durch die Nitrogruppe auf der linken Seite ein nicht abgeschirmtes negatives molekulares elektrostatisches Potenzial (MEP). Dieser Effekt wird auch bei einer Methylgruppe oder einem Wasserstoff, verursacht durch den 4-Aryl-Substituenten, beobachtet. Ein entsprechendes 4-Cyclohexyl-Derivat generiert dagegen kein negatives MEP und hat klassische calciumantagonistische Wirkung (Bild 4.20).

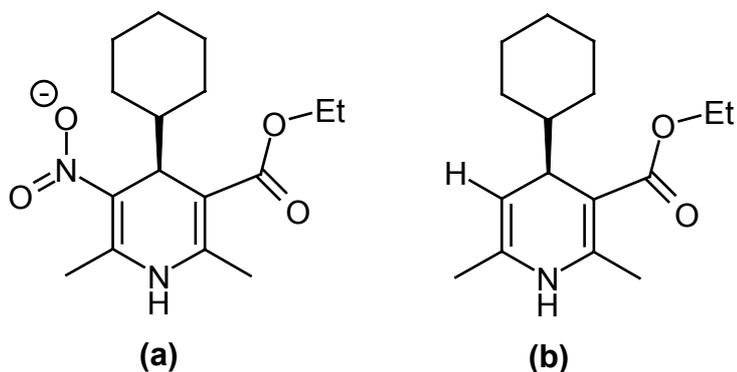


Bild 4.20: 4-Cyclohexyl-DHP-Derivate: (a) Calciumagonist und (b) schwacher Calciumantagonist

Betrachtet man das verwandte Dihydropyrimidin (Bild 4.21a), so sind beide Stereoisomere Calciumkanal-modulatorisch unwirksam, da der Estercarbonylsauerstoff in einer ap-Anordnung fixiert ist. Vergleicht man mit dem entsprechenden Dihydropyridin-Derivat **b**, so entsteht durch Einführen eines frei drehbaren Esters auf der rechten Seite (also höchstwahrscheinlich sp orientiert) ein gut wirksamer Calciumagonist. Wird die Estercarbonylfunktion in einer sp-Anordnung fixiert, so erhält man einen Calciumantagonisten **c** oder einen Calciumagonisten **d**. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Wasserstoffbrückenakzeptoren mit sp-Orientierung auf beiden Seiten wichtig sind.

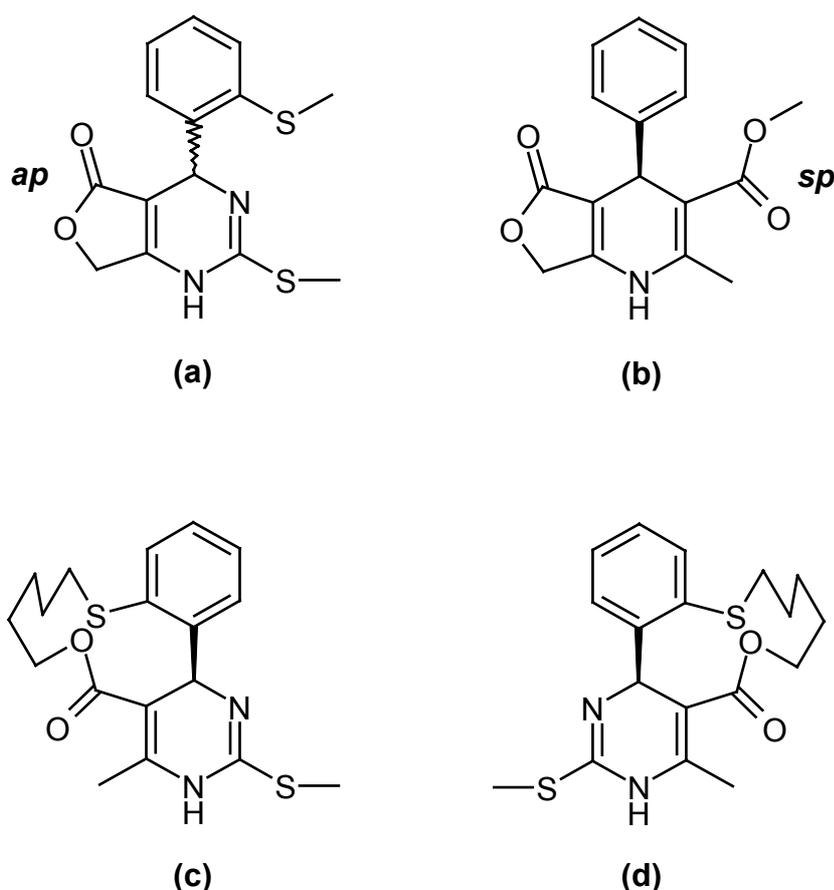


Bild 4.21: Dihydropyrimidine (a,c,d) und Dihydropyridin (b)

Diese Beschreibung geht von gleichen Bindungsmodi der DHP-Antagonisten und DHP-Agonisten aus [81] und erklärt die agonistische Wirkung durch die fehlende Abschirmung der negativen Partialladung auf der Backbordseite [82]. Das Modell beschreibt bis heute alle Experimente am besten und wird in Abschnitt 4.1.3 noch einmal zusammengefasst.

Der Vollständigkeit halber soll noch ein anderes Modell, das Rovnyak in [83] beschreibt, für Antagonisten und Agonisten mit unterschiedlichen Bindungsmodi erwähnt werden. Der Bindungsmodus der Agonisten wird mit einem „gekehrten Boot“ beschrieben. Der Antagonist bindet mit dem 4-Aryl-Substituenten nach oben, während den Agonist mit dem Aryl-Substituenten nach unten bindet. Wichtigste Konsequenz aus diesem Modell ist die Vorstellung, dass die rechte Seite der DHP-Antagonisten (bzw. die linke Seite der Agonisten) als unwichtig für die Bindung betrachtet wird. Hier wird nur eine wichtige Wasserstoffbrückenbindung auf der linken Seite (in *sp*-Orientierung) angenommen. Da dieses Modell im Widerspruch zu den Mutationsstudien steht [79, 80], wird es in dieser Arbeit nicht weiter diskutiert.

4.1.3 Zusammenfassung Pharmakophor

Das Pharmakophor soll an *S*-Isradipin, dem stärksten calciumantagonistischen Dihydropyridinderivat, zusammengefasst werden (vgl. Bild 4.22).

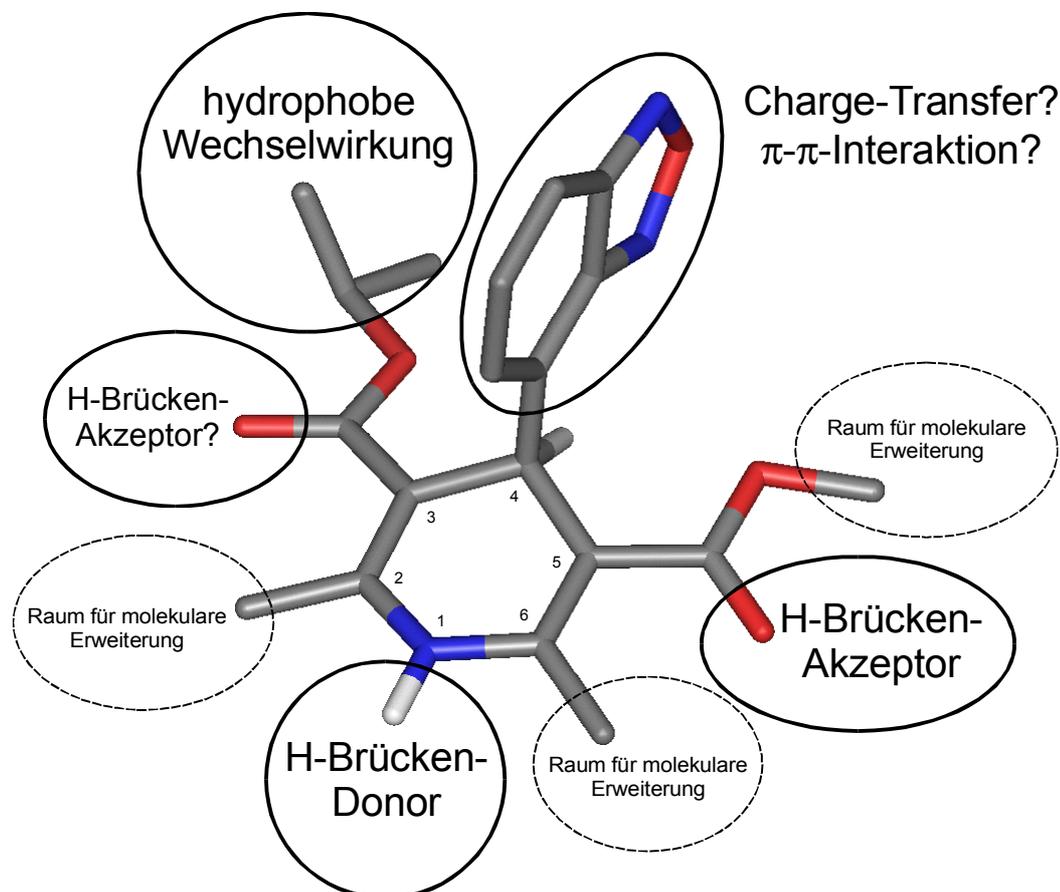


Bild 4.22: Zusammenfassung des Pharmakophors an *S*-Isradipin

- Frei zugänglicher Wasserstoff-Brücken-Donor an N1
- Wasserstoff-Brücken-Akzeptor-Möglichkeit auf der rechten Seite (sp-orientiert)
- Lipophile Wechselwirkungsmöglichkeit bzw. Abschirmung der negativen Ladung auf der linken Seite für antagonistische Wirkung verantwortlich
- Orthogonaler, pseudoaxialer 4-Aryl-Substituent, der Charge-Transfer oder π - π -Wechselwirkung eingehen kann
- Möglicherweise Wasserstoff-Brücken-Akzeptor auf der linken Seite (sp-orientiert)
- Größere Reste werden an C2 und C6 toleriert, solange der freie Zugang zum N1-Wasserstoff-Brücken-Donor nicht behindert wird
- Größere Reste auf der rechten Seite am Ester sind ebenfalls möglich, jedoch nicht aktivitätssteigernd!

Dieser Pharmakophor soll als Ziel der Dissertation durch kleine Peptide imitiert werden. Die Entwicklung dieser Peptide basiert auf der Grundlage der Toxinstruktur FS2, in der das oben beschriebene Pharmakophor ebenfalls wieder gefunden werden kann.

Wichtig bei der Betrachtung und einem sinnvollen Vergleich von pharmakophoren Strukturen sind im Wesentlichen drei Aspekte, die vorher für einen guten Vergleich gelöst sein müssen.

- Die untersuchten Moleküle müssen an die gleiche Bindungsstelle binden.
- Der zu vergleichende Pharmakophor sollte möglichst präzise vorliegen. Für die zu vergleichenden Verbindungen ist es günstig, wenn sehr rigide Moleküle bekannt sind. Bei weniger rigiden Verbindungen müssen ihre aktiven Konformationen herausgefunden und verglichen werden.
- Es sollten Aktivitäten oder Bindungsaffinitäten über die Substanzen bekannt sein, um beurteilen zu können, welche Eigenschaften wichtig und welche unwichtig für die Bindung sind.

4.2 Charakterisierung von Toxin FS2

4.2.1 Sequenzalignment von Angusticeps-Typ III Toxinen

In Bild 4.23 wird die Sequenz des Toxins FS2 dargestellt. Zusätzlich wurden Informationen eines Sequenzvergleichs mit knapp 100 „Drei-Finger-Toxinen“ und zwischen den vier Angusticeps-Typ-III-Toxinen (FS2, Calciseptin, S4C8, C10S2C2) berücksichtigt [84]. Dabei markieren die grün unterlegten Aminosäuren gemeinsame und einzigartige Aminosäuren der Gruppe der vier am L-Typ-Calciumkanal wirkenden Angusticeps-Typ-III-Toxine. Die gelb unterlegte Glutaminsäure (FS2, Calchin, S4C8) ist eine funktionshomologe Aminosäure, da im Toxin C10S2C2 an dieser Stelle eine Asparaginsäure vorkommt.

An der dreidimensionalen Lokalisation der spezifischen Aminosäuren fällt die besondere Lage des zusammenhängenden Abschnitts Ala44 bis Thr50 auf, die an der Spitze von Loop III (unterstrichen) liegt.

An gleicher lösungsmittlexponierter Stelle liegt bei einem anderen Drei-Finger-Toxin (Dendroaspin) das bekannte RGD-Motiv, das für die Hemmung der Blutplättchenaggregation verantwortlich ist [85].

Loop III fällt in dem sonst polaren und geladenen Toxin (18 ionische Aminosäuren – Nettoladung von +6) durch eine Ansammlung hydrophober Aminosäuren auf (Ala44, Met45, Trp46 und Pro47). Da über die DHP-Bindungsstelle bekannt ist, dass Dihydropyridine mit permanent geladenen Seitenketten erst ab einer bestimmten Spacer-Länge

an die Bindungsstelle gelangen [86, 87], erscheint die Lokalisation der Erkennungssequenz für die DHP-Bindungsstellen dort am wahrscheinlichsten.

Den Autoren der NMR-Struktur von FS2 fiel das ungewöhnliche Vorhandensein eines cis-Prolin Turns (β Via-Turn) an der Spitze von Loop III auf. Typischer Weise kommen in anderen Drei-Finger-Toxinen (Cardiotoxinen und Neurotoxinen) β II- oder Nicht-Standard- β -Turns vor. Vergleichende NMR-Untersuchungen [88, 89] an linearen Peptiden haben gezeigt, dass diese Aminosäuresequenz selbst in Lösung bevorzugt als β Via-Turn vorliegt. Besonders der Abschnitt WPY ist für die Ausbildung und Stabilität des Turns verantwortlich. Ein großer Unterschied besteht jedoch. In Lösung kommt es zu einer Art Sandwich-Struktur, gebildet aus dem Indolring des Trp, dem Ring des Pro und dem Phenolring des Tyr. In allen 20 Konformationen der experimentell aufgeklärten FS2-Struktur liegt der Indolring jedoch exponiert vor, was auf seine besondere Rolle im Pharmakophor hinweisen könnte.

Alle Indizien und theoretischen Überlegungen [84] deuten darauf hin, dass entweder die komplette Sequenz Ala44 bis Thr50 oder aber ein Teil davon für die Wirkung am L-Typ-Calciumkanal verantwortlich ist.

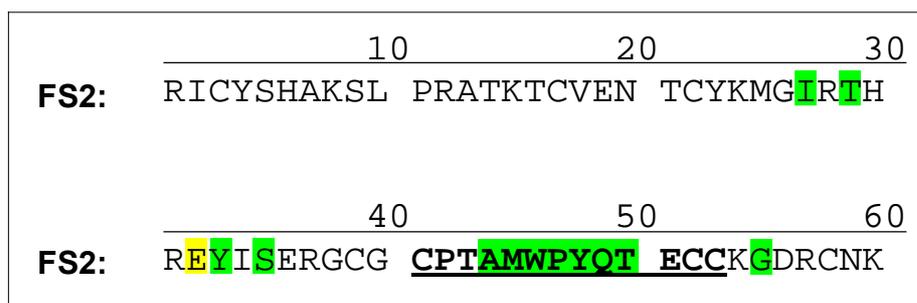


Bild 4.23: Sequenz von Toxin FS2 (Erklärung siehe Text)

4.2.2 NMR Strukturen des Toxins

Da in der PDB-Datenbank ein Ensemble von 20 NMR-Strukturen für das Toxin FS2 abgelegt ist, die alle den aus NMR-Daten gewonnenen Abstandsinformationen („restraints“) entsprechen, muss für einen direkten (statischen) Vergleich des Toxins mit den pharmakophoren Eigenschaften der Dihydropyridine eine möglichst repräsentative Struktur für das Toxin ausgewählt werden.

Üblicherweise wird die Durchschnittsstruktur (meist stark verzerrt) oder der energieärmste Vertreter (stark kraftfeld- oder lösungsmittelabhängig) oder diejenige Konformation mit der größten Anzahl von intramolekularen Wasserstoff-Brücken-Bindungen (deutet auf eine besonders stabile Struktur hin) für die weitere Betrachtung ausgewählt.

Bei dem Vergleich mit dem DHP-Pharmakophor kommt es aber im Wesentlichen auf die dreidimensionale Lage der pharmakophoren Elemente an (also die Geometrie der Loop-III-Spitze). Für die Auswahl der Vergleichsstruktur wurde daher ein geometrisches Kriterium gewählt, dass sich auf den wichtigen Sequenzabschnitt zwischen Ala44 und Thr50 beschränkt.

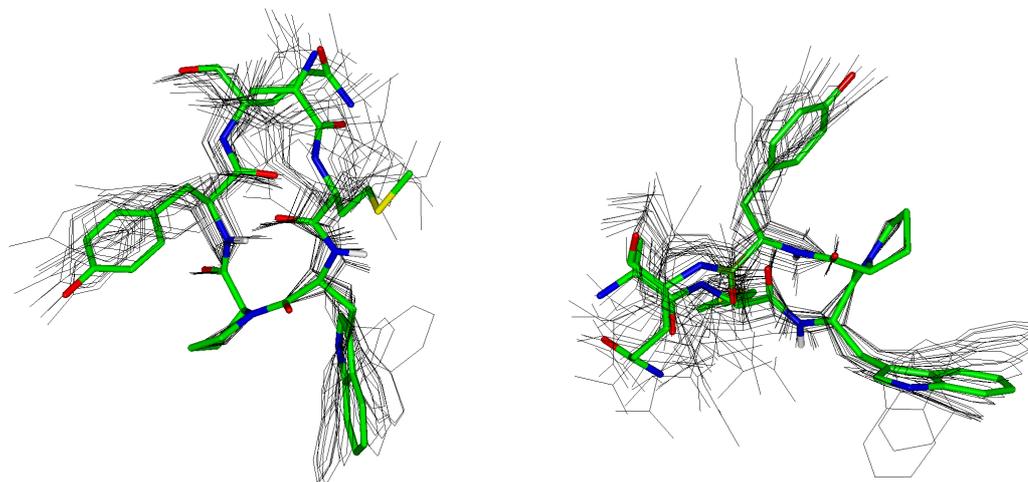


Bild 4.24: Überlagerung der Loop III-Spitze aller 20 NMR-Strukturen von Toxin FS2 (2 Ansichten)
Kohlenstoff – grün; Sauerstoff – rot; Stickstoff – blau; Schwefel – gelb

Wegen der besonderen Bedeutung des cis-Prolin-Turns wurden die FS2-Konformationen über die Backbone-Atome des Turns superpositioniert (Bild 4.24).

Konformer 16 (farbkodiert) entspricht in seiner Struktur genau dem geometrischen Mittel. Das lässt sich besonders an den Wasserstoffbrücken-bildenden Atomen des Backbone (Met45:CO und Tyr48:NH) beobachten.

Die Konformation der Seitenketten in Struktur 16 ist ebenfalls repräsentativ. Die Met45-Seitenkette liegt in einer nahezu ausgestreckten Konformation vor. Man sieht, dass in den anderen Konformationen eine Rotation um die Mittellage beschrieben wird.

Der Indolring von Trp46 liegt zwischen den zwei extremen Positionen, wenn man die zwei Strukturen (Struktur 1 und 19 der PDB-Datei) mit gedrehter Orientierung außer Betracht lässt. Die geringe Fluktuation an dieser Stelle lässt auf eine bevorzugte Orientierung schließen (Bild 4.24 rechts).

Die Konformation des Pro47-Rings ist sehr konstant und auch für die Orientierung des Tyr48 zeigt Struktur 16 das geometrische Mittel. Hier weicht nur eine Konformation (Struktur 1) etwas ab.

Struktur 16 repräsentiert somit am besten den geometrischen Durchschnitt der 20 Strukturen, ohne dass mit den Unzulänglichkeiten einer klassisch berechneten Durchschnittsstruktur (falsche Bindungslängen, -winkel, etc.) gekämpft werden muss.

4.2.3 Überlagerung des Toxins mit dem DHP-Pharmakophor

Ausgehend vom DHP-Pharmakophor sollen nun auch Entsprechungen der pharmakophoren Eigenschaften in der Toxinstruktur (Bild 4.25) gesucht werden.

Für einen Vergleich werden die GRID Felder, das MEP (AM1-Rechnungen aus SPARTAN) sowie die sterischen Eigenschaften („solvent accessible surface“) herangezogen. Als Referenzligand wird *S*-Isradipin benutzt, das als aktivstes DHP-Derivat gilt.

Bei einem derartigen Vergleich ist jedoch zu beachten, dass wahrscheinlich nicht alle Entsprechungen gefunden werden können, da Toxin FS2 zwar spezifisch am L-Typ-Calciumkanal angreift, aber nicht so aktiv ist wie *S*-Isradipin.

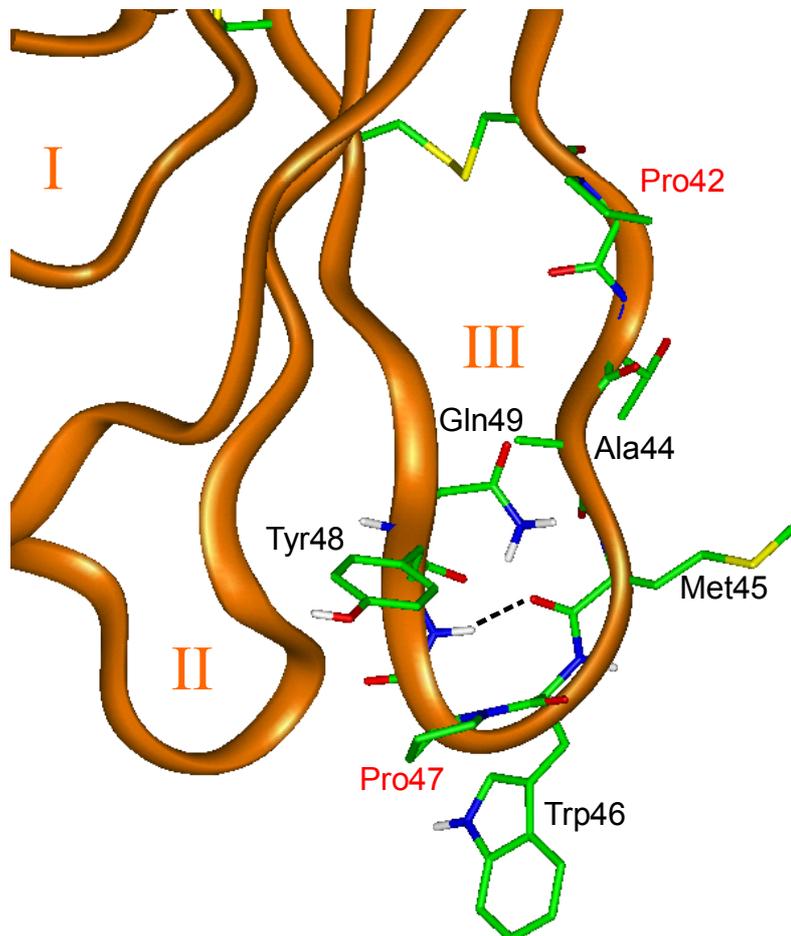


Bild 4.25: Ausschnitt von Loop III des Toxins FS2

4.2.3.1 Connolly-Oberfläche

Die Connolly-Oberfläche von Toxin FS2 wird in Bild 4.26 dargestellt. Die Teiloberflächen der Aminosäuren Trp46 und Pro47 sind orange gefärbt. Isradipin (Bild

4.26), dessen Volumen ebenfalls dargestellt ist, zeigt eine gute Übereinstimmung mit diesem Epitop.

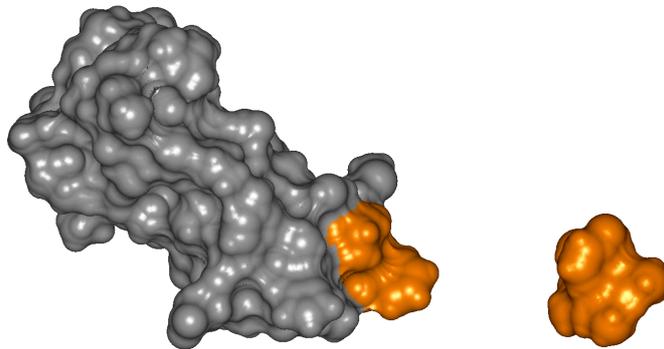


Bild 4.26: Connolly Oberflächen von Toxin FS2 (links, Trp46 und Pro47 hervorgehoben) und S-Isradipin

Zur Orientierung und zum Verständnis des in Bild 4.28 dargestellten MEPs, wurde in Bild 4.27 die Connolly-Oberfläche transparent dargestellt. Neben der orangenen Banddarstellung der drei Loops sind die Seitenketten aller Arginine und Histidine sowie der wichtigen Aminosäuren an der Spitze des Loop III explizit verzeichnet.

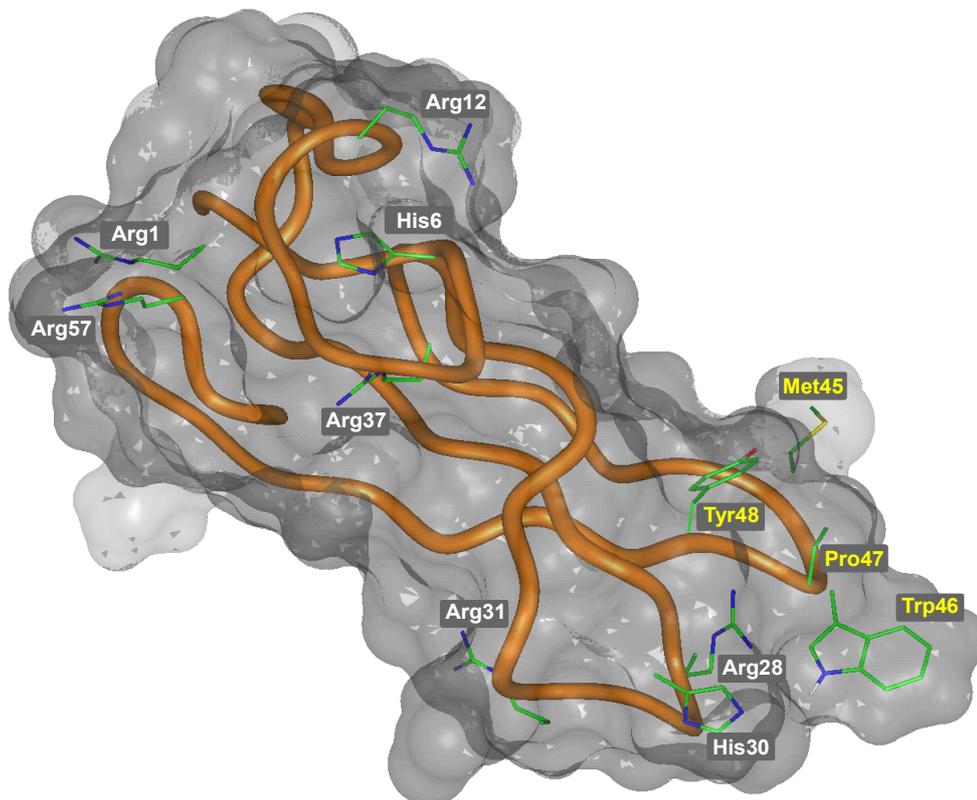


Bild 4.27: Transparente Connolly-Oberfläche von Toxin FS2 (Seitenketten von allen Arg und His sowie AS 45-48 dargestellt)

4.2.3.2 MEP-Felder

Toxin FS2 besitzt sechs positiv geladene Arginine in der Core-Region und in Loop I und II, die mit ihrer Guanidinium-Funktion dem gesamten Molekül ein positives MEP verleihen, das lediglich auf halber Höhe durch einen negativen Gürtel unterbrochen wird. Arg28 und Arg31 an der Spitze von Loop II generieren ein starkes positives MEP in Verlängerung zur NH-Funktion des Trp46-Indolrings. Um einen freien Zugang zur Pharmakophor-relevanten NH-Funktion zu gestatten, muss die Seitenkette des Arg28 etwas zur Seite rücken. Bei genauer Analyse der NMR-Strukturen von Toxin FS2, erkennt man eine derartige Flexibilität von Arg28, wodurch Trp46 erreichbar wird. Das Histidin in Position 30 an der Spitze des Loop II dient vermutlich zur Verstärkung dieser Beweglichkeit, quasi als konformatives Kontrollelement in der Nähe der potenziellen Bindungsstelle.

Die Aminosäure Histidin ist mit ihrer Ladungsgruppe in der Seitenkette und dessen pKs Wert nahe dem Neutralpunkt einzigartig unter den natürlichen Aminosäuren. Sie kann damit auf kleine pH-Änderungen ihrer Umgebung reagieren. Histidin wird daher überwiegend im aktiven Zentrum oder als Kontrollelement für konformative Änderungen gefunden [58, S. 72].

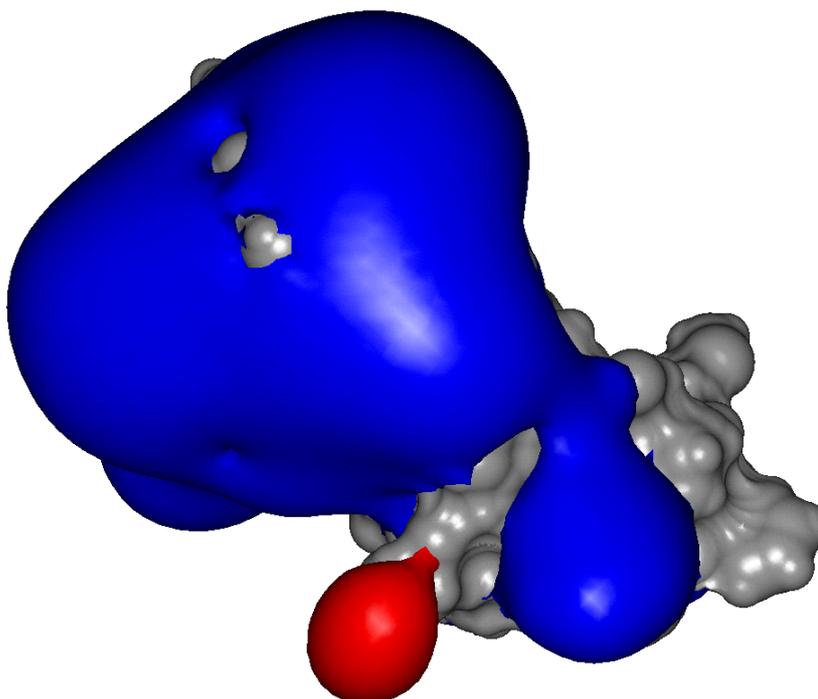


Bild 4.28: MEP von Toxin FS2 (positiver Bereich blau; negative Ladung rot)

Da die Betrachtung des kompletten Toxins nicht aussagekräftig genug ist, wird zusätzlich das MEP des isolierten dritten Loops untersucht. Die Sequenz wird dabei auf den Bereich Pro42 bis Thr50 verkürzt. Durch diese Kürzung gelingt es, die topologischen

CVFF-Kraftfeldladungen durch semiempirisch (AM1) berechnete ESP Ladungen zu ersetzen, da zur Zeit nur Moleküle mit maximal 166 Atomen berechnet werden können. Von großem Vorteil ist, dass anders als bei topologischen Verfahren die Konformation des so entstandenen verkleinerten Proteins bei der Ladungsberechnung berücksichtigt wird. Außerdem werden die Ergebnisse direkt vergleichbar mit Isradipin, dessen Ladungen ebenfalls mit AM1 berechnet wurden.

Quantenchemische ab initio Vergleichsrechnungen (6-31G*, SPARTAN) zeigen für Isradipin qualitativ äquivalente MEP-Felder.

Im Vergleich (Bild 4.29) der FS2-Teilsequenz mit Isradipin findet das positive MEP der NH-Funktion im Dihydropyridinring seine Entsprechung im positiven Potenzial an der NH-Funktion des Indolrings (**a**). Das negative Potenzial der linken Carbonylfunktion im Isradipin wird durch ein negatives Feld des Pro47-Backbone-Sauerstoff simuliert (**b**). Selbst das Feld der rechten Carbonylfunktion im Isradipin wird durch ein, wenn auch sehr schwaches negatives Feld rechts auf dem Indolring angedeutet (**d**). Die Nitrogruppe (**c**) hat eine Entsprechung in der Backbone-Carbonyl-Funktion des Trp46. Hierbei muss angemerkt werden, dass nicht alle Dihydropyridin-Derivate am 4-Aryl-Substituenten in 2'- oder 3'-Position ein stark negatives Potenzial tragen müssen, da beispielsweise auch chloresubstituierte Derivate gut wirksam sind.

Wichtig für die antagonistische Wirkung ist die Abschirmung des negativen Potenzials auf der Backbordseite von DHPs. Im Isradipin wird das durch den Isopropylrest (**e**) vermittelt, beim Toxin durch die Seitenkette des Met45 (**e**).

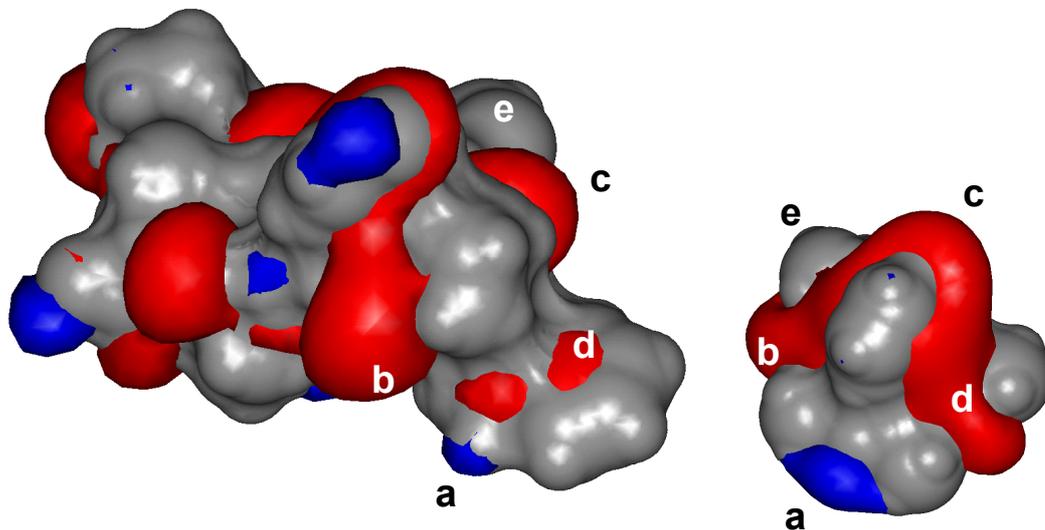


Bild 4.29: MEPs der Sequenz Pro42 bis Thr50 von Toxin FS2 (links) und S-Isradipin (rechts) – rote Felder negatives, blaue Felder positives MEP – Entsprechungen mit Buchstaben markiert

4.2.3.3 GRID-Felder

Zum Vergleich molekularer Eigenschaften können neben dem molekularen elektrostatischen Potenzial auch Wechselwirkungsfelder benutzt werden, die mit dem Programm GRID (vgl Kapitel 3.5.2) berechnet werden. In den folgenden Abbildungen werden die entsprechenden Felder für Isradipin farbige gefüllt dargestellt und die Felder, die sich auf Toxin FS2 beziehen, als Gitterlinien.

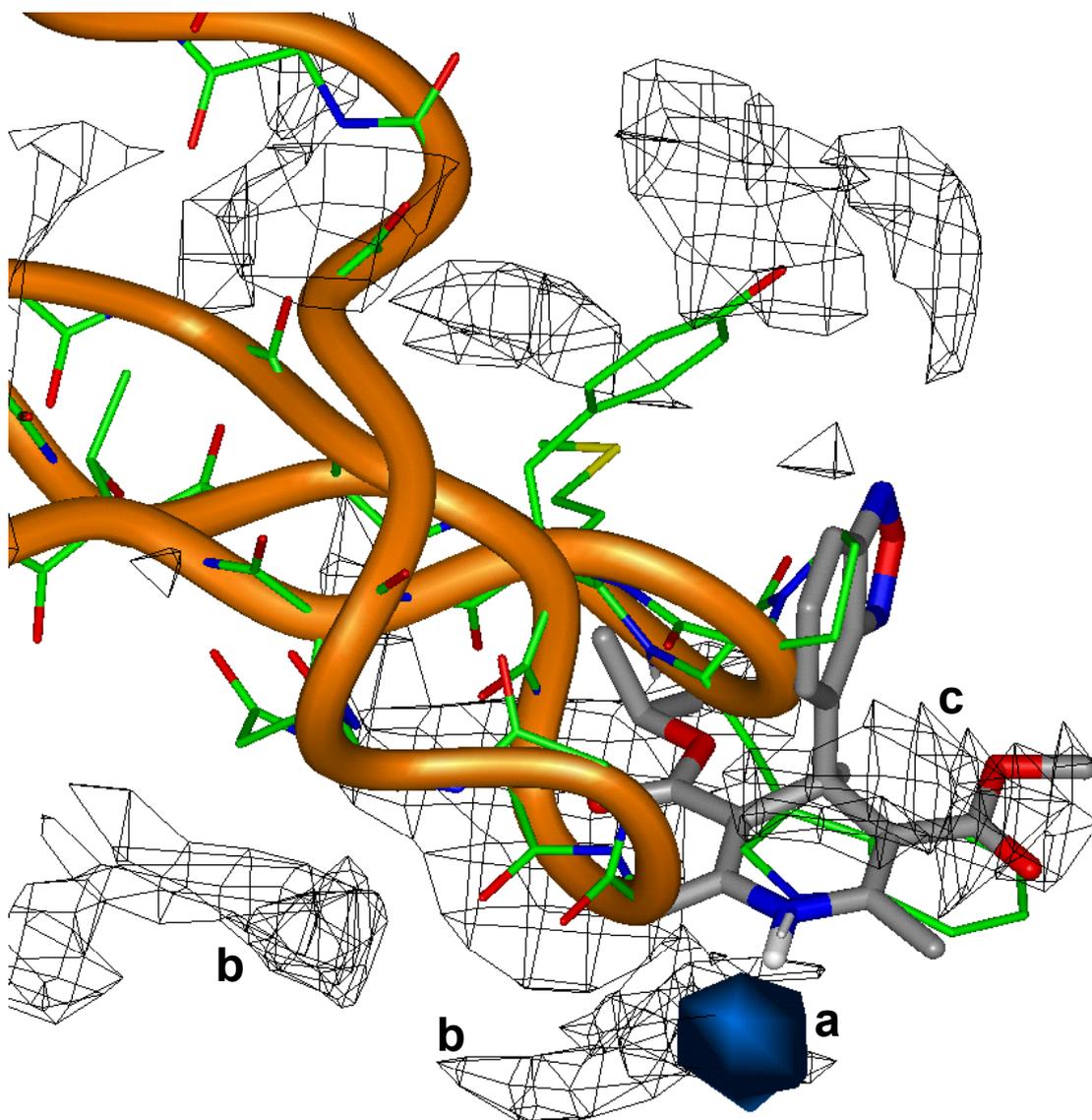


Bild 4.30: Wechselwirkungsfelder mit der O-Probe (Carbonylsauerstoff) – Toxin FS2 (Gitterlinien); S-Isradipin (blaues Feld)

Die O-Probe markiert Bereiche des Moleküls, an denen eine Wasserstoffbrücken-Donor Funktion vermittelt wird. Sowohl die NH-Donor-Funktion an N1 im Dihydropyridin-

Ring (dunkelblauer Bereich **a**) als auch die NH-Funktion im Trp46-Indolring (schwarzes Gitter im Bereich **a**) besitzen diese Eigenschaft.

Die beiden schwarzen Gitter **b** im unteren Teil der Abbildung stammen von den Guanidiniumfunktionen der beiden Aminosäuren Arg28 und Arg31 aus Loop II, deren Seitenketten in der Abbildung der Übersicht halber nicht dargestellt wurden. Das Gitter **c**, das sich scheinbar über das Isradipin erstreckt, liegt einige Ångstrom davor und resultiert aus den Wechselwirkungen mit der His30-Seitenkette (vgl. auch Bild 4.27).

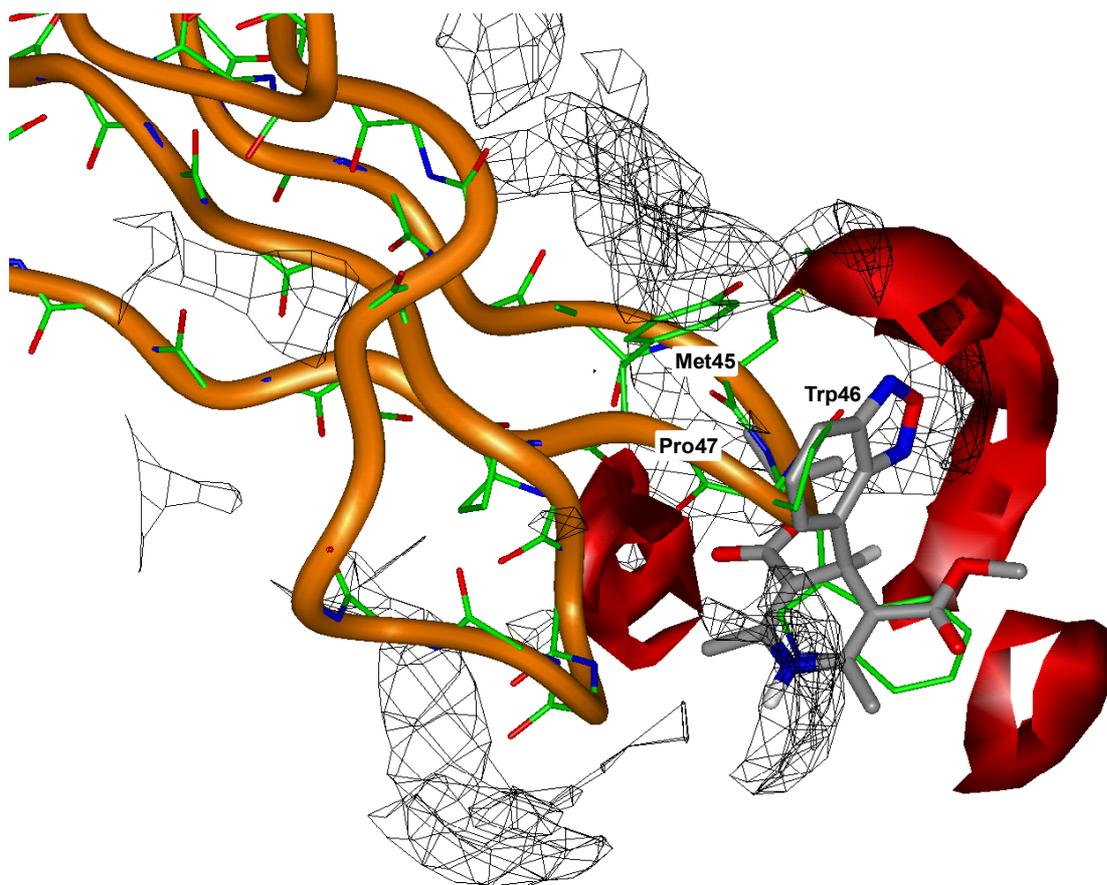


Bild 4.31: Wechselwirkungsfelder mit der N1-Probe (amidische NH-Gruppe) – FS2 (Gitterlinien); S-Isradipin (rote Felder)

Zusätzlich wurden Wechselwirkungen mit der N1-Probe berechnet. Diese stellt Bereiche mit Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktion dar. Für Isradipin erkennt man drei Areale, die durch die Carbonyl-Funktionen der beiden Ester an C3 und C5 sowie durch den Oxadiazol-Ring am 4-Aryl-Substituenten verursacht werden.

Die linke Carbonylfunktion entspricht dem Backbone-Carbonylsauerstoff des Pro47 und teilweise des Met45. Das Feld des Oxadiazol-Rings wird durch den Backbone-

Sauerstoff von Trp46 nachgeahmt. Die rechte H-Brücken-Akzeptor-Funktion des Dihydropyridins findet keine Entsprechung.

Für die Darstellung der dritten Probe (DRY-Probe) wurde die Blickrichtung verändert. Sie verläuft jetzt nicht mehr über den Stickstoff in Position 1 des Dihydropyridins, sondern entgegengesetzt über die Position 4. Dadurch lässt sich besonders das Feld unter dem DHP-Ring und um den 4-Aryl-Substituenten besser erkennen.

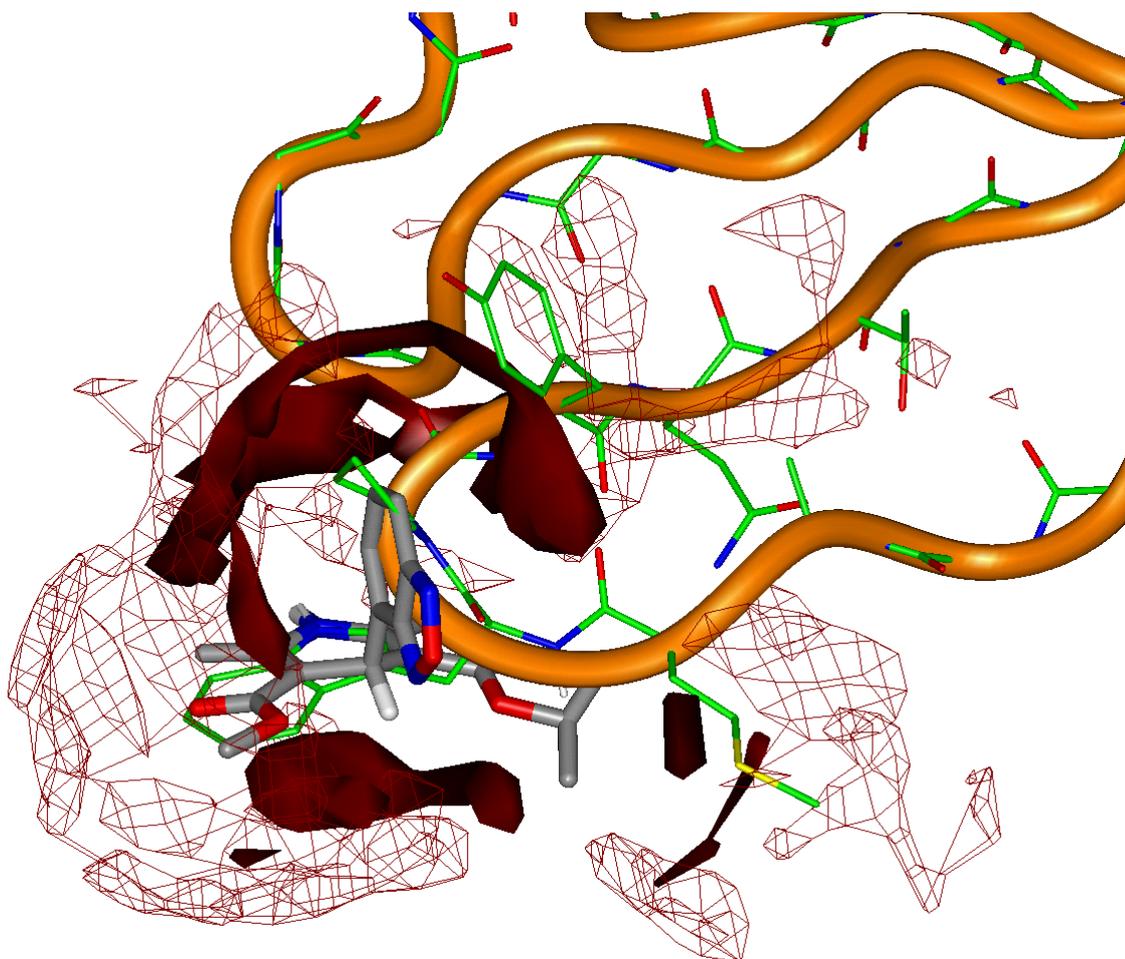


Bild 4.32: Wechselwirkungsfelder mit der DRY-Probe („hydrophobes Wasser“) – Toxin FS2 (Gitterlinien); *S*-Isradipin (braunes Feld)

Die hydrophobe Wechselwirkung unterhalb des Indolrings ist noch ausgedehnter als unterhalb des DHP-Rings, was sicherlich an der Größe des π -Elektronensystems hängt.

Der linke Teil der kugelförmigen Wolke um den Benzofurazan-Ring im Schaubild entspricht dem Gitter um den Pro46-Ring (Bild 4.32).

Besonders deutlich fällt auch der Vergleich zwischen dem Isopropyl-Ester und der Seitenkette des Met45 aus. Sie liegen unten rechts im selben Bereich.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass große Ähnlichkeiten sowohl für sterische (Connolly-Oberfläche) als auch für molekulare elektrostatische Eigenschaften vorhanden sind. Die Grid-Wechselwirkungsfelder des *S*-Isradipins finden sich fast vollständig in den Wechselwirkungsfeldern des Toxin FS2 wieder. Lediglich der rechte H-Brücken-Akzeptor-Bereich des *S*-Isradipins lässt sich keinem Bereich im Toxin zuordnen. Hier sei aber auch auf die unterschiedliche Affinität der beiden Moleküle zum Rezeptor verwiesen. *S*-Isradipin ist um den Faktor 10-100 aktiver als das Toxin FS2 [48, 83].

Für das Design kleiner Peptide mit Wirkung am L-Typ-Calciumkanal scheint damit die essentielle Domäne im Toxin FS2 klar definiert. Sie erstreckt sich von Ala44 (Carbonylfunktion) über die Seitenketten von Met45 und Trp46 bis hin zur Carbonylfunktion des Pro47.

Diese Ergebnisse stützen die Untersuchungen von Schleifer [84], der jedoch Nifedipin als molekulare Schablone für das Toxin FS2 verwendet hat. Ein grundlegender Unterschied zwischen den beiden Untersuchungen liegt in der Konformation des DHPs. Schleifer nutzte für seinen Vergleich Nifedipin in sp/ap/sp Konformation (C3/C5/C4) basierend auf Berechnungen in [76]. Bedingt durch neue experimentelle Erkenntnisse korrigierte er jedoch seine Hypothese über die Bindungskonformation und postuliert nun eine sp/sp/sp Konformation [81] (vgl. auch Erklärungen in Kapitel 4.1.1). Diese Konformation (hier von *S*-Isradipin) passt als Schablone sogar noch besser auf das Toxin FS2 als die sp/ap/sp Konformation.

5 Durchführung und Ergebnisse

5.1 Vorhersage von peptidischen β -Turns

5.1.1 Allgemeine, theoretische Methode

Für das Design kleiner Peptide mit vorher festgelegter Sequenz stellt sich durch die hohe Anzahl frei drehbarer Bindungen und der daraus folgenden starken Flexibilität das Problem der Vorhersage ihrer Konformation. Da bei vielen biologischen Prozessen das Motiv eines β -Turns die Schlüsselrolle spielt, verwundert es, dass bis heute noch keine allgemeine, theoretische Methode existiert, mit der sich die Konformation der β -Turns aus der primären Sequenz vorhersagen lassen.

Derzeit wird zwar viel Arbeit in die Synthese von Modellpeptiden und Peptidomimetika gesteckt, um mit anschließender NMR-Untersuchung und Röntgenstruktur-Analyse deren Konformation aufzuklären. Trotzdem ist noch recht wenig über das Prinzip der β -Turnbildung bekannt und die β -Turns werden nur mit experimentell gewonnenen Constraints simuliert.

Im Folgenden soll eine allgemeine Methode entwickelt werden, die eine Simulation (Vorhersage) peptidischer β -Turns ermöglicht, ohne auf experimentelle Constraints zurückgreifen zu müssen. Dabei wird eine Vielzahl von Kraftfeldern und Methoden verglichen, die in der Literatur als besonders vorteilhaft für Proteine und Peptide beschrieben worden sind.

5.1.2 Experimentell bestimmte Konformation von cyclo-PAAPAA

Da keine zentrale Datenbank für NMR-Strukturen kleiner Peptide existiert (wie z. B. die PDB-Datenbank für Proteine), muss auf grundlegende Arbeiten wie die Dissertation von Kurz [66] zurückgegriffen werden, in der einer größere Anzahl von Peptiden bearbeitet wurde. Diese cyclisierten Peptide eignen sich besonders gut für strukturelle Untersuchungen, da ihr Konformationsraum durch die Ringverknüpfung eingeschränkt ist. Bei der endgültigen Auswahl des Peptids wird Wert darauf gelegt, dass die Sequenz möglichst einfach gestaltet ist, um dadurch die Anzahl der beeinflussenden Parameter möglichst gering zu halten.

Zur Entwicklung einer Simulationsmethode bietet sich das cyclische Testpeptid mit der Sequenz Pro1-Ala2-Ala3-Pro4-Ala5-Ala6 besonders an (Bild 5.33). Es enthält neben dem Turn-induzierenden L-Prolin ausschließlich die einfache Aminosäure L-Alanin. So kann der Effekt der Turnbildung ohne besondere Wechselwirkungen in den Seitenketten beobachtet werden. Außerdem handelt es sich um ein symmetrisches Peptid, was die Auswertung zusätzlich vereinfacht. Der Turn im Peptid kann doppelt beobachtet werden

und, falls eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Turns stattfindet, wird diese gleichartig ausfallen.

Das Peptid liegt nach Müller und Kurz [67, 66] hauptsächlich in zwei Populationen (Konformationen) vor. Zu 49% entstehen zwei β II-Turns mit der all-trans Konfiguration der Aminosäuren und zu 28% sind zwei β Vla-Turns gemessen worden, die durch cis-Konfiguration der beiden Proline verursacht werden. Für die restlichen 23% wird eine asymmetrische Konformation postuliert, in der beide Turntypen gemischt vorkommen sollen. Dieses konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden, da die geringe Löslichkeit der Verbindung ein zu geringes Messsignal im ROESY hervorruft, um genügend Abstände zu detektieren. (Das Peptid wurde im NMR-Experiment mit 0.8 mg in 0.5 ml DMSO vermessen.)

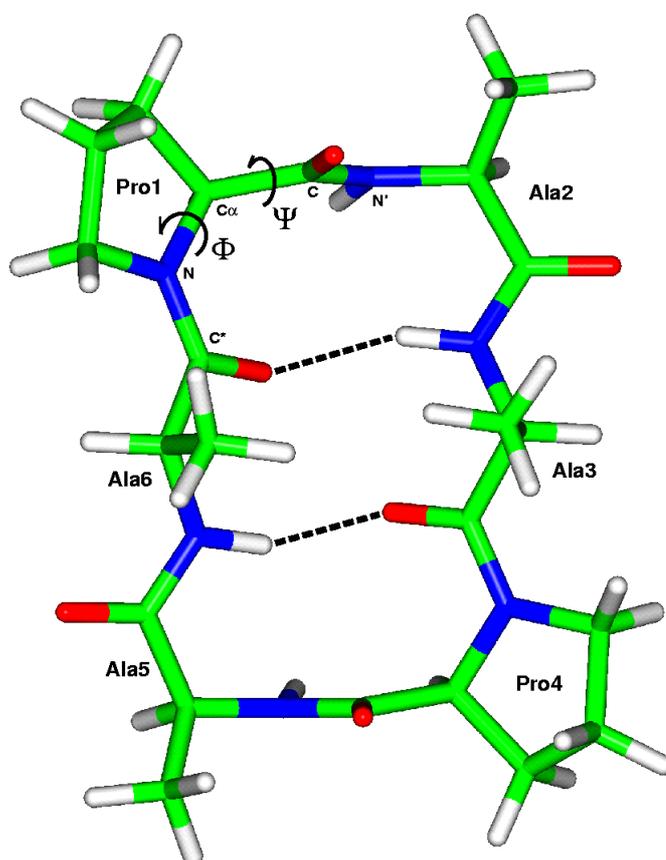


Bild 5.33: Experimentell bestimmte Konformation von cyclo-PAAPAA (Population 49% zwei β II-Turns)

Zur Übersicht sind die relevanten Winkel für das Prolin1 in der Grafik eingezeichnet. Der Phi (Φ) Winkel einer Aminosäure ist der Torsionswinkel, der an der Bindung N-C α gemessen wird, der Psi (ψ) Winkel wird an der Bindung C α -C gemessen.

Für die Konformation der zwei β II-Turns wirken die zwei intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierend (gestrichelte Linien). Die H-Brücken des β II-Turns werden jedoch übereinstimmend in der Literatur [60, 61] als nicht notwendig angesehen, sodass sie nicht als Kriterium für eine Auswertung benutzt werden sollten.

Zur Beurteilung der publizierten NMR-Struktur muss kurz die Methode beschrieben werden, mit der die NMR-Struktur gewonnen wurde.

Aus den NMR-Experimenten (bei 300-325 K) lassen sich über die Kopplungskonstanten Abstandsinformationen zwischen einzelnen Atomen gewinnen. Die Stärke des Signals korreliert dabei mit der Populationsstärke einer Konformation. Die unterschiedlichen Messtemperaturen der Probe geben eine Aussage über das Vorhandensein von H-Brücken.

Alle gewonnenen Abstandsinformationen einer Population werden dann auf die Struktur in einer „restrained“ Moleküldynamiksimulation angewendet. Dabei wird die potentielle Energie durch ein harmonisches Potenzial mit einer Kraftkonstante skaliert. Die Beschränkung durch die Kraftkonstante wird dann sukzessive aufgehoben. Im vorliegenden Beispiel wurde das folgende Protokoll mit dem GROMOS Kraftfeld verwendet.

Die Simulation wurde im Vakuum bei 1000 K für 2 ps, für 3 ps bei 500 K und für 5 ps bei 300 K mit der Kraftkonstante $4000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ durchgeführt. Danach wurde das Molekül in einer äquilibrierten Lösungsmittelbox (DMSO) bei 300 K für 70 ps mit der Kraftkonstante $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, 30 ps bei $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ und abschließend 50 ps frei simuliert. Die publizierte Struktur ist die abschließend minimierte Durchschnittsstruktur der letzten 60 ps (10 ps „restrained“ + 50 ps frei!).

5.1.3 Einfluss verschiedener MDS Parameter

Zuerst wird der Einfluss verschiedener Parameter auf die Moleküldynamiksimulation ausgehend von der experimentell bestimmten Struktur untersucht. Es wird die Simulation dabei auf das CVFF Kraftfeld abgestimmt, da es für Proteine und Peptide entwickelt wurde und in unserer Arbeitsgruppe viel Erfahrung mit diesem Kraftfeld existiert.

Im Anschluss wird die Untersuchung auf unterschiedliche (zufällige) Startstrukturen erweitert (vgl. Kapitel 5.1.4). Dieses wird notwendig, wenn Peptidsequenzen ohne bekannte 3D-Struktur simuliert und vorhergesagt werden sollen. Zusätzlich werden noch verschiedene (für Proteine und Peptide optimierte) Kraftfelder verglichen (Kapitel 5.1.7ff).

5.1.3.1 Moleküldynamiksimulationen (MDS) in Vakuum

Die ersten Moleküldynamiksimulationen werden in Vakuum bei Raumtemperatur (293 K) durchgeführt. Dabei sind zwei Cut-offs (14 \AA und 15 \AA) gesetzt. Nach einer Initialisierungsphase von 1 ps werden im Laufe einer 500 ps dauernden MDS 50

Strukturen archiviert. Diese werden anschließend mit je 50 Zyklen „steepest descent“ und 1000 Zyklen „conjugate-gradient“ minimiert (vgl. Bild 5.34).

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zu simulieren, wurden zwei Dielektrizitätskonstanten ϵ eingestellt. $\epsilon = 1$ simuliert dabei eine lipophile Lösungsumgebung (ohne abschirmenden Effekt auf die Elektrostatik), $\epsilon = 80$ entspricht dem abschirmenden Effekt des Wassers.

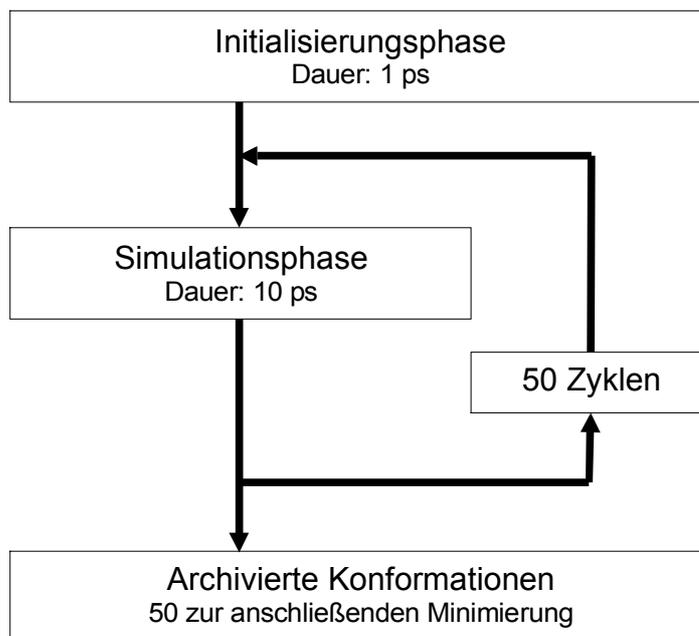


Bild 5.34: Flussdiagramm (Erläuterungen siehe Text)

5.1.3.2 MDS in Wasser

Für die Moleküldynamiksimulation in explizitem Lösungsmittel wird eine äquilibrierte Lösungsmittelbox der Größe $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 30\text{\AA}$ mit dem Standardmodul von INSIGHT/DISCOVER erstellt. Sie enthält neben dem Peptid 870 Moleküle Wasser. Als Simulationsprotokoll werden wieder 1 ps Initialisierungsphase und anschließend 500 ps Moleküldynamiksimulation gewählt. Die 50 archivierten Strukturen werden gleichfalls minimiert.

Die Simulationstemperatur wird auf Raumtemperatur (293 K) eingestellt. Zur Kontrolle des konformativen Raums wird die Simulationstemperatur auf 493 K erhöht.

5.1.3.3 MDS in modifiziertem Wasser

Da das CVFF Kraftfeld keinen expliziten Wasserstoffbrückenbindungsterm verwendet, sondern diese Wechselwirkung nur durch den elektrostatischen Term berücksichtigt, ist

die Stärke der Wasserstoffbrücken von den Partiaalladungen abhängig. Die „normalen“ Partiaalladungen des Kraftfeldes für die Atome des Wassermoleküls betragen dabei für Wasserstoff +0,41 und für Sauerstoff -0,82.

Es wird ein „modifiziertes Wasser“ eingeführt, das eine reduzierte Ladung auf dem Wasserstoff (+0,05) und auf dem Sauerstoff (-0,10) trägt. Durch diese Änderung entsteht ein hydrophiles Lösungsmittel mit reduzierter Wasserstoffbrückenbildung. Während der Moleküldynamiksimulation konnte wie erwartet das Fehlen der für Wasser typischen Clusterbildung beobachtet werden. Auch diese Simulation wird bei zwei Temperaturen (293 K und 493 K) durchgeführt.

5.1.3.4 MDS in DMSO

Da das ursprüngliche NMR-Experiment in DMSO durchgeführt wurde, darf eine Simulation in expliziter DMSO-Umgebung nicht fehlen. Das DMSO wurde dabei in der Simulationsumgebung von INSIGHT/DISCOVER [5] als Lösungsmittel neu eingeführt. Nachdem das Molekül im Builder Modul gebaut und unter Berücksichtigung quantenchemischer ab initio Berechnungen (6-31G*, SPARTAN [6]) optimiert worden ist, wurde eine Lösungsmittelbox mit 165 DMSO Molekülen zusammengestellt und äquilibriert. Die MDS mit dem Testpeptid findet wieder bei zwei Temperaturen (293 K und 493 K) statt.

5.1.3.5 Vergleichende Analyse der MDS-Parameter

Tabelle 5.4: Prozentrate der beobachteten Turn-Typen [n.k.: nicht klassifiziert]

	β I	β II	β III	β V	β VIa	n.k.
Experiment, DMSO, 300 K	-	49	-	-	28*	-
Vakuum, 293 K, $\epsilon = 1$	7	37	3	19	-	33
Vakuum, 293 K, $\epsilon = 80$	-	3	-	23	-	74
Wasser, 293 K	-	32	-	41	-	27
modifiziertes Wasser, 293 K		5	35	2	30	28
Wasser, 493 K	-	32	-	17	-	51
modifiziertes Wasser, 493 K	17	53	2	6	-	19
DMSO, 293 K	13	21	17	11	-	50
DMSO, 493 K	21	15	20	4	-	60

* die β VIa-Turns werden experimentell mit cis-Prolinen (Ala5-Ala5-Pro1-Ala2 und Ala2-Ala3-Pro4-Ala5) beobachtet. Bei den Moleküldynamiksimulationen konnten unter den gegebenen Bedingungen keine cis-Proline beobachtet werden. Auf eine Optimierung der Simulation für β VIa-Turns wurde in diesem Stadium verzichtet, da es die deutlich kleinere Population im Experiment ist.

Tabelle 5.4 fasst die durchgeführten Simulationen zusammen. Die experimentellen Daten zeigen für cyclo-PAAPAA eine Hauptpopulation (49%) als β II-Turn. Die Simulation im Vakuum (rechentechnisch die einfachste und schnellste Methode) bei niedriger Dielektrizitätskonstante (ϵ) findet entsprechend als Hauptpopulation diese Konformation, allerdings nur zu 37%. Die Vergrößerung des ϵ auf 80 (den Wert in einer wässrigen Umgebung) verschlechtert die Wiederfindungsrate der Konformation auf 3%.

Interessanterweise steigt die Rate in einer wässrigen Umgebung (mit expliziten Wassermolekülen) fast auf den ursprünglichen Wert der Vakuumsimulation, auf über 30%. Als Hauptpopulation wird jedoch der β V-Turn (41%) simuliert. Die logische Kombination aus Vakuum-Simulation und Wasserumgebung durch modifiziertes Wasser erbringt bei Raumtemperatur (293 K) erst eine Verschlechterung. Anschließend bei der künstlich erhöhten Temperatur (493 K) kann eine Wiederfindungsrate von knapp über 50% erzielt werden, die dem Experiment sehr nahe kommt. Die entwickelte Simulationsmethode mit expliziten DMSO Molekülen kann weder bei der niedrigen noch bei der hohen Temperatur eine ähnlich gute Wiederfindungsrate erzielen.

Man kann festhalten, dass Clusterbildung der Wassermoleküle verhindert, dass sich das Peptid in der Simulation realistisch verhält. Sie wird durch die starken elektrostatischen Wechselwirkungen verursacht. Eine Verringerung dieser Wechselwirkungen durch Verwendung verkleinerter Partialladungen sowie die Erhöhung der Simulationstemperatur lassen die theoretische Beschreibung (ohne experimentelle Constraints) möglich erscheinen.

Zur weiteren Untersuchung wurden die gefundenen Parameter auf unterschiedliche Startkonformationen (deren Generierung im folgenden Kapitel beschrieben wird) angewendet.

5.1.4 Generierung zufälliger Startkonformationen

5.1.4.1 Zielstellung

Bisher wurde als Ausgangskonformation für die Moleküldynamiksimulationen (MDS) immer die schon vorher bekannte reale Konformation gewählt. Für eine Simulationsmethode, die auf eine neue Sequenz mit unbekannter Konformation zur Strukturvorhersage angewendet werden soll, ist nachzuweisen, dass ihre Ergebnisse unabhängig von der Startkonformation sind.

Für die MDS lassen sich folgende Einflüsse formulieren, die methodisch die Unabhängigkeit von der Startkonformation fördern oder behindern.

Ist die Startstruktur in einem lokalen Energieminimum, so ist es schwierig über eine MDS eine andere Konformation zu generieren. Als günstige Parameter haben sich die Verlängerung der Simulationsdauer oder die Steigerung der Simulationstemperatur erwiesen. Ersteres bedeutet aber eine wesentliche Ausweitung des Rechenaufwands (besonders bei Rechnungen mit explizitem Lösungsmittel). Letzteres begünstigt unnatürliche bzw. verzerrte Strukturen, die aber durch eine Simulated Annealing

Prozedur reduziert bzw. vermieden werden können. Um die Unabhängigkeit von der Startstruktur für den Fall des cycloPAAPAA zu untersuchen, müssen erst eine Anzahl möglichst unterschiedlicher Startstrukturen generiert werden.

Dafür wird eine Methode entwickelt, die zufällige Startkonformationen generiert. Diese sollen möglichst unterschiedlich und außerdem möglichst energiearm (lokales Minimum) sein. Hierzu bietet sich die folgende Simulated Annealing MDS mit hoher Simulationstemperatur an.

5.1.4.2 Simulated Annealing Moleküldynamiksimulation

Auf die Verwendung einer Wasserbox wurde verzichtet, da durch diese Simulation nur Startkonformationen generiert werden sollen und die Berücksichtigung von Lösungsmittelmolekülen nicht nur zusätzliche Rechenzeit verbrauchen würden, sondern auch die Beweglichkeit des Peptids einschränkt. Es muss betont werden, dass die Methode keine Aussage über die „natürliche“ Konformationsverteilung des simulierten Peptids geben kann und soll. Es werden ausschließlich möglichst unterschiedliche Konformationen (lokale Minima) gesucht.

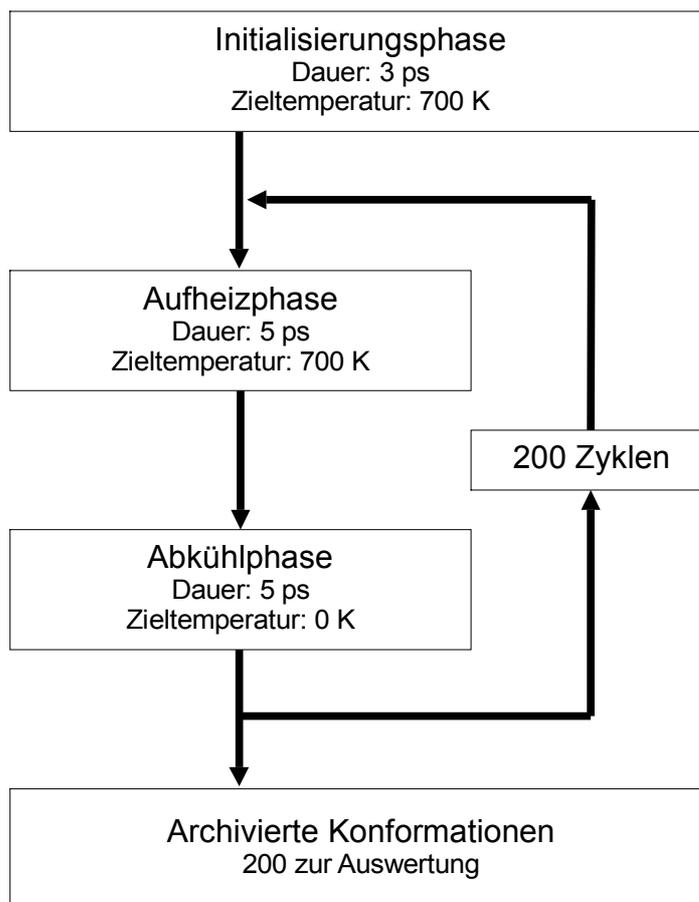


Bild 5.35: Flussdiagramm zur Generierung zufälliger Startkonformationen

Die Methode (Bild 5.35) beginnt mit einer Initialisierungsphase von 3 ps bei 700 K (Vakuum, $\epsilon = 1$). Anschließend an die Initialisierungsphase werden 200 Zyklen einer 10 ps MDS gerechnet. In jedem Zyklus wird über die ersten 5 ps auf 700 K aufgeheizt und in den folgenden 5 ps auf 0 K wieder abgekühlt. Die abschließende Konformation wird für den folgenden Vergleich archiviert.

Aus den 200 Konformationen soll eine begrenzte Anzahl energieärmer, möglichst unterschiedlicher Strukturen herausgesucht werden. Dazu werden alle 200 archivierten Strukturen paarweise verglichen (RMS-Abweichung der Nicht-Wasserstoff-Atome). Kombiniert mit dem Energiekriterium (es wird immer die energieärmere Konformation bevorzugt) konnten 13 Konformationen identifiziert werden, die eine RMS-Abweichung von mehr als 1,5 Å gegenüber allen anderen Konformationen aufweisen. Die fünf energieärmsten Konformationen (Bild 5.36) wurden für die weitere Untersuchung ausgewählt.

5.1.4.3 Auswertung der generierten Konformationen

Da bei den folgenden Simulationen immer eine große Anzahl von Konformationen generiert wird, die einen breiten Konformationsraum abdecken, erweist sich die Auswertung durch Überlagerung der Moleküle als wenig aussagekräftig und die rein

numerische als wenig anschaulich. In Anlehnung an die bei Proteinen übliche Visualisierung bestimmter Diederwinkel der einzelnen Aminosäuren in Ramachandran-Plots [90] werden im Folgenden die Diederwinkel der für die β -Turn-Unterscheidung wichtigen Aminosäuren ($i+1$ und $i+2$) (vgl. Tabelle 3.3) in zwei übereinander liegenden Ramachandran-Plots dargestellt. Dabei liegt die Darstellung für Aminosäure ($i+1$) unten und für Aminosäure ($i+2$) oben. Der Phi-Winkel (Φ) ist auf der x-Achse und der Psi-Winkel (Ψ) auf der y-Achse aufgetragen. Der Winkelbereich, der eine Konformation als β II-Turn definiert, ist in beiden Plots in grau hervorgehoben.

5.1.4.4 Die fünf Startkonformationen

Die Übersicht in Bild 5.36 zeigt, daß die Startkonformationen sich deutlich von der experimentellen Struktur (Bild 5.33) unterscheiden.

In Bild 5.37 sind die Diederwinkel für die experimentelle Struktur (orangene Dreiecke) im Vergleich mit den fünf Startstrukturen (grüne und hellblaue Kreise) im Ramachandran-Plot dargestellt. Die Dreiecke mit der Spitze nach oben und die grünen Kreise beziehen sich auf Pro2 und Ala3, die umgedrehten Dreiecke und hellblauen Kreise stellen Pro5 und Ala6 dar.

Besonders für die Aminosäure Alanin ($i+2$) wird in dieser Darstellung deutlich, dass sich die Startkonformationen wie gewünscht von der experimentell bestimmten Konformation unterscheiden. Die Methode generiert Startkonformationen, die das vollständige Psi-Winkel-Spektrum abdecken. Der Phi-Winkel Bereich ist wesentlich eingeschränkter.

Im Prolin-Plot zeigt sich, dass der Ringschluss der Seitenkette den Spielraum für den Phi-Winkel-Bereich auf -60° beschränkt und für den Psi-Winkel hauptsächlich zwei Konformationen (um 120° und um -60°) bevorzugt sind.

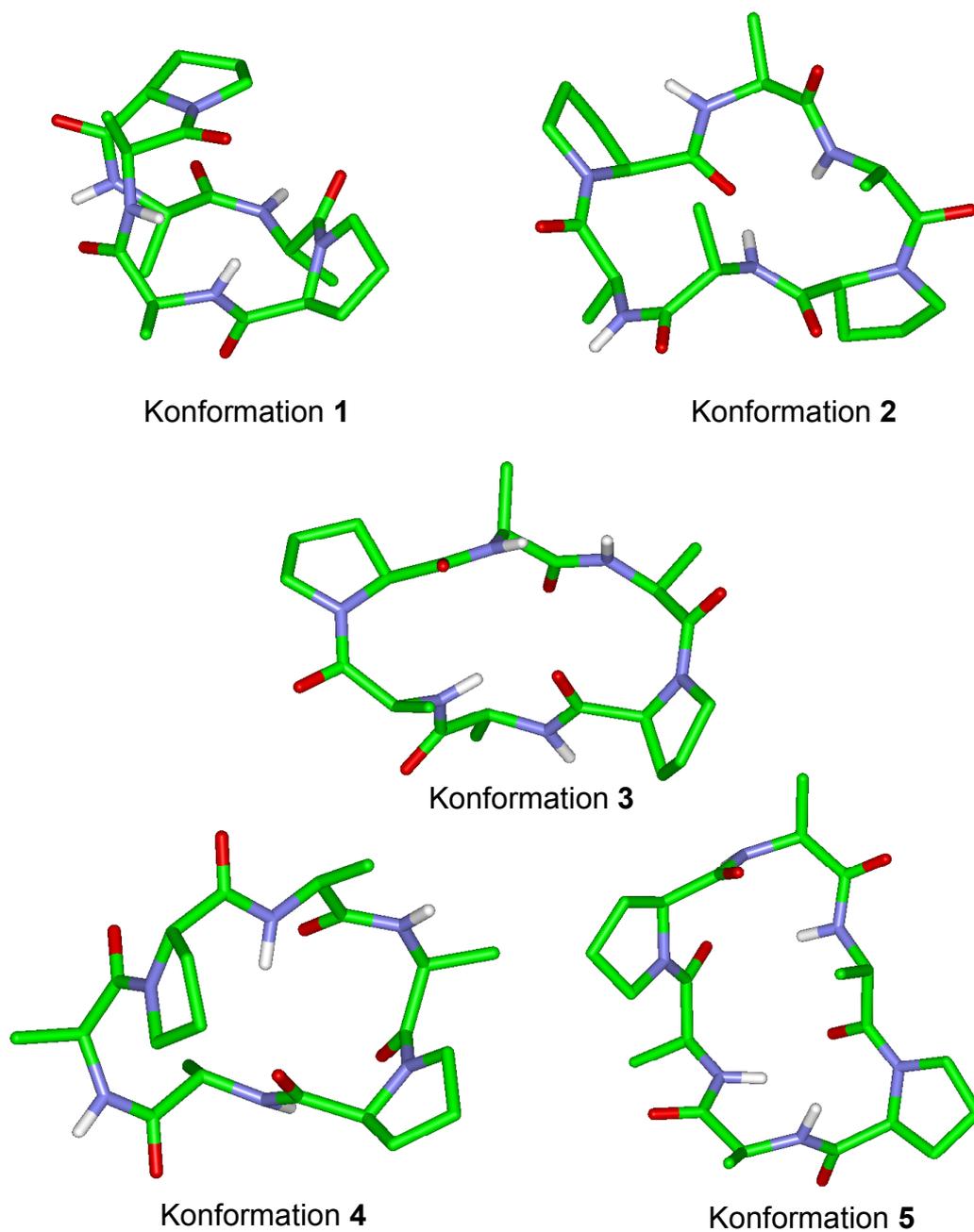


Bild 5.36: Die fünf energieärmsten Startkonformationen von cyclo-PAAPAA

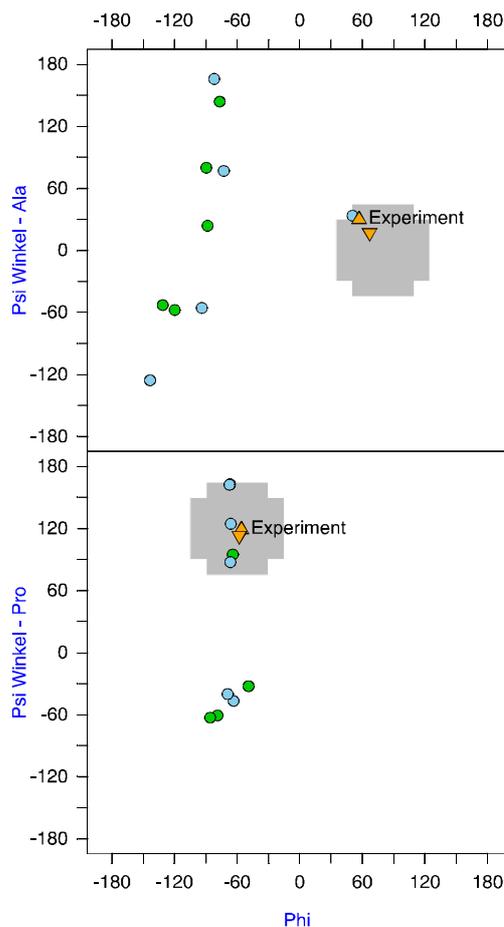


Bild 5.37: Übersicht über die Phi und Psi Winkel der Startkonformationen (Erläuterungen siehe Text)
 Pro2 und Ala3: ▲ (orange – experimentell bestimmt) ● (grün – generiert)
 Pro5 und Ala6: ▼ (orange – experimentell bestimmt) ● (blau – generiert)

5.1.5 Unabhängigkeit der MDS von der Startkonformation

Mit den in Kapitel 5.1.3.5 beschriebenen Simulationsbedingungen bzw. Parametern (modifiziertes Wasser, etc.) konnte die Unabhängigkeit des Simulationsverlaufs von der Startkonformation nicht erzielt werden. Es zeigte sich schnell, dass die Konformationen bei Temperaturen um 493 K und relativ kurzen Simulationsdauern (50 ps) in ihren lokalen Minima verweilen.

Aus den Erfahrungen mit dem Simulated Annealing Protokoll bei der Generierung der Startkonformationen wird im Folgenden die MDS um das Simulated Annealing Protokoll (vgl. Bild 5.38) erweitert und die statistische Verteilung der resultierenden β -Turns in Abhängigkeit von Startstruktur und Simulationstemperatur untersucht.

Weiterhin werden Vergleichsrechnungen durchgeführt, durch die herausgefunden werden soll, ob Unterschiede zwischen zwei Software-Implementierungen (DISCOVER und

DISCOVER3) desselben Kraftfeldes (CVFF) und zu anderen Kraftfeldern (GROMACS, CHARMM) bestehen.

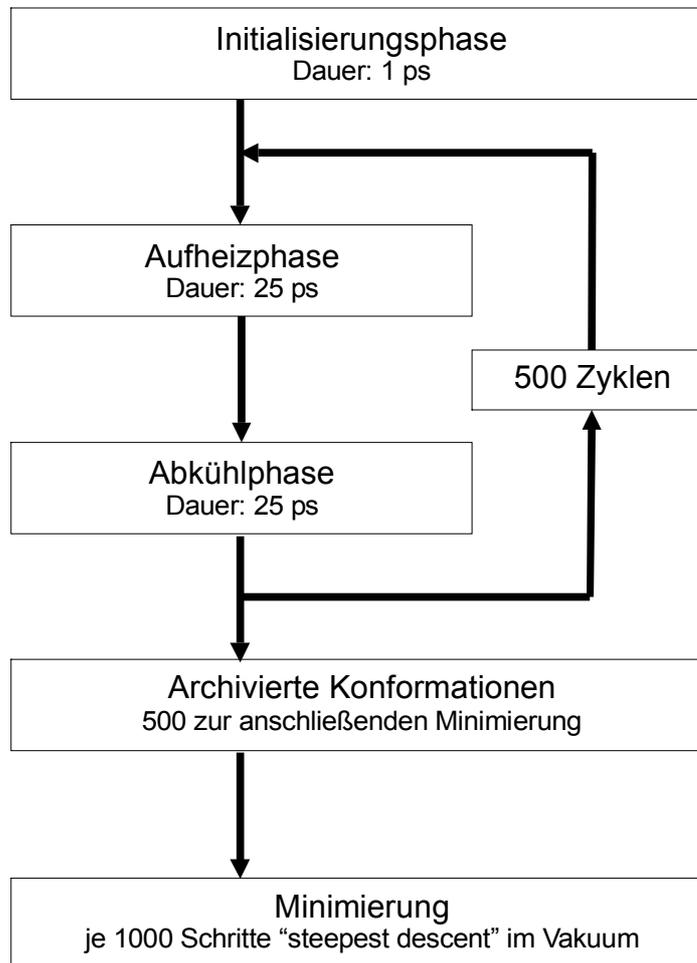


Bild 5.38: Flussdiagramm (Erläuterungen siehe Text)

Die Simulationsdauer wurde gegenüber den anfänglichen Untersuchungen für eine bessere statistische Auswahl auf 500 ps verzehnfacht. Die Rechnungen wurden in einer Wasserbox ($30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$) durchgeführt. Aus Gründen der Rechenzeit wurden die abgekühlten (0 K) und archivierten Strukturen keiner abschließenden Energieminimierung in wässriger Umgebung mehr unterzogen, sondern lediglich über 1000 Schritte „steepest descent“ im Vakuum minimiert. So sollen extrem verzerrte Strukturen reduziert werden. Exemplarische Rechnungen haben gezeigt, dass eine Minimierung der Lösungsmittelbox mit dem Peptid die Rechenzeit um mehr als das 1000-fache verlängert, die Änderungen aber hauptsächlich in der veränderten Anordnung der Lösungsmittelmoleküle liegen. Es bilden sich lokale Kristallgitter, die Konformation des Peptids ändert sich kaum messbar. Die Minimierung im Vakuum wurde durchgeführt, damit die

Anzahl evtl. auftretender, lokal verzerrter Konformationen des Peptids reduziert werden. Die vergleichende Auswertung der unminimierten Strukturen mit der minimierten Variante (nicht dargestellt) zeigte keine signifikanten Unterschiede.

5.1.6 Vergleich der fünf Startkonformationen (Discover, 1093K)

Exemplarisch für alle folgenden Auswertungen sind hier die Ramachandran-Plots der Moleküldynamiksimulation mit DISCOVER (1093 K) für alle 5 Startkonformationen (Bild 5.39 - Bild 5.41) einzeln visualisiert. Für die restlichen Simulationen sind nur repräsentative Beispieldiagramme dargestellt. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Startkonformationen sind nicht größer als in der MDS DISCOVER 1093 K.

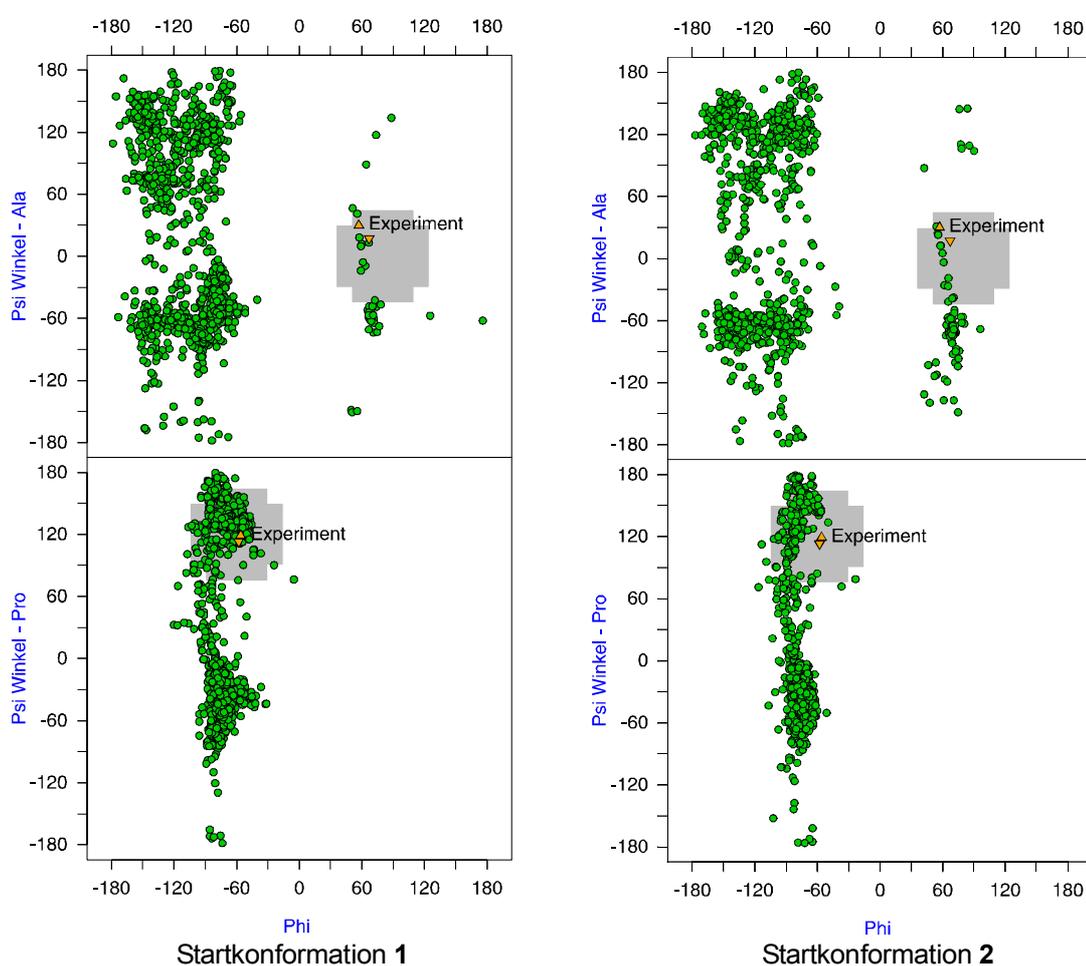


Bild 5.39: Modifizierter Ramachandran-Plot: Startkonformation 1+2 (Discover, 1093K)

Die Abbildungen (Bild 5.39 - Bild 5.41) zeigen am Beispiel der DISCOVER-Rechnungen bei 1093 K, dass eine sehr gute Übereinstimmung des Winkelmusters für alle Startkonformationen (1 bis 5) zu beobachten ist.

Die fünf ausgewählten, unterschiedlichen Startkonformationen werden jeweils dem gleichen MDS-Protokoll mit anschließender Minimierung unterworfen. Die Temperatur wurde in Schritten von 200 K (293, 493, 693, 893, 1093 und 1293 K) modifiziert. Im CVFF Kraftfeld konnte unter den gegebenen Bedingungen ab einer Temperatur von 1093 K die Gleichverteilung der Phi und Psi Winkel zwischen den Startkonformationen beobachtet werden.

In den Diagrammen werden die Diederwinkel beider Turns (Pro1-Ala2) und (Pro4-Ala5) verzeichnet. Die Einzeldarstellungen wurden zusätzlich für alle Dynamiksimulationen ausgewertet, sind hier aber aus Platzgründen nicht dargestellt, da sich keine abweichenden Erkenntnisse finden lassen (Vergleiche auch Beispiel Bild 5.42).

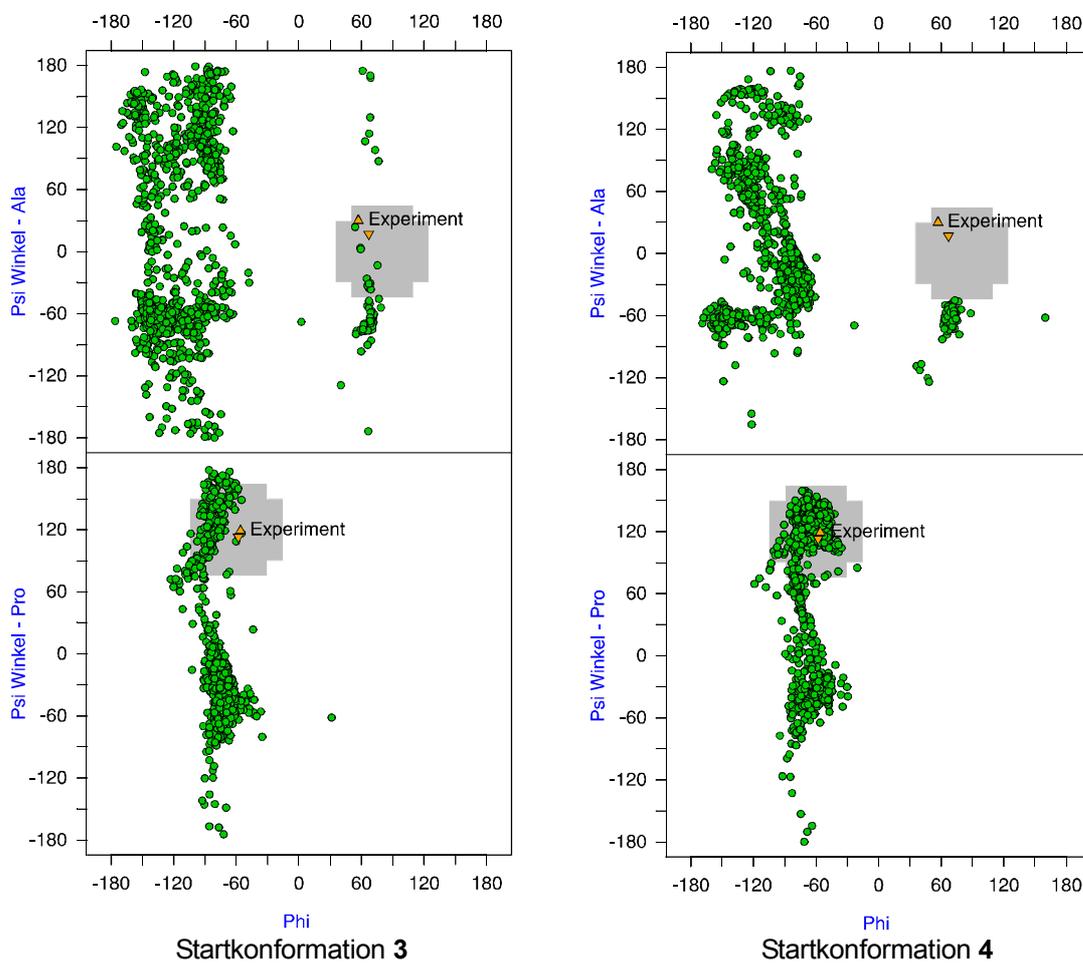


Bild 5.40: Modifizierter Ramachandran-Plot: Startkonformation 3+4 (Discover, 1093K)

5.1.7 Vergleich 1093K und 1293K (Startkonformation 5, Discover)

Die weitere Steigerung der Temperatur um 200 K auf 1293 K bedeutet keine deutliche Veränderung der Verteilung der Diederwinkel. Exemplarisch sind in Bild 5.41 die Verteilungen der Startkonformation 5 dargestellt. Es ist leicht ersichtlich, dass sich das Winkelspektrum der Phi und Psi Winkel entspricht. Die zu beobachtenden Unterschiede liegen in der natürlichen Streuung der unterschiedlichen Dynamiksimulationsläufe. Einzig im oberen Diagramm (Ala-Plot) ist ein deutlicher Trend im Winkelbereich (Phi: -150 bis -90; Psi: -60) und etwas schwächer bei (Phi: -150 bis -90; Psi: 120) zu zwei Familien zu beobachten, die sich bei 1093 K noch als zusammenhängender Cluster darstellte.

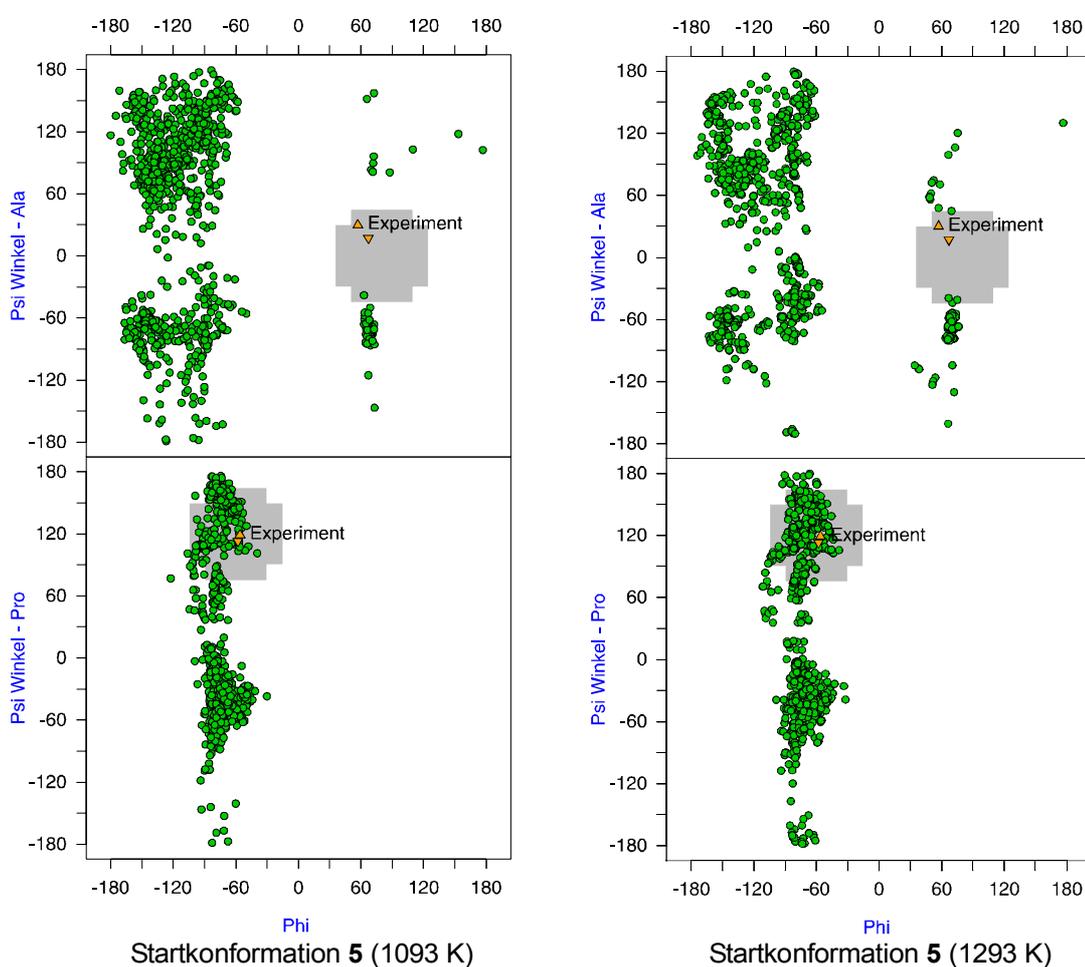


Bild 5.41: Modifizierter Ramachandran-Plot: Startkonformation 5 bei 1093 K und 1293 K (Discover)

5.1.8 Vergleich Pro1-Ala2 und Pro4-Ala5 (Startkonformation 5, Discover, 1293K)

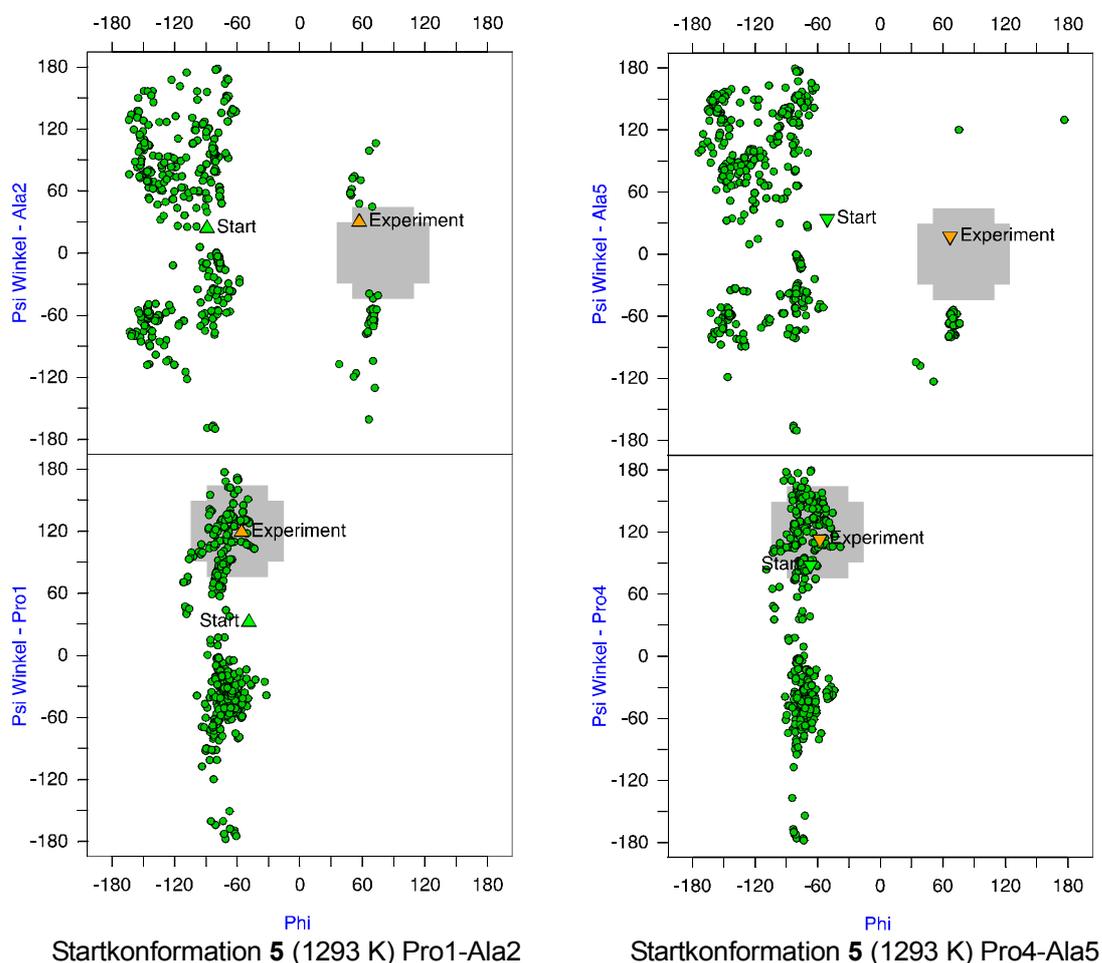


Bild 5.42: Modifizierter Ramachandran-Plot Pro1-Ala2, Pro4-Ala5 (Startkonf. 5, Discover, 1293K)

Die konsequente Gegenüberstellung und Auswertung beider Molekülteilbereiche (β -Turn über Winkel Ala4-Pro1-Ala2-Ala3 und Winkel Ala3-Pro4-Ala5-Ala6) zeigt wie erwartet in allen Moleküldynamiksimulationen eine sehr gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse des Vergleichs rechtfertigen die summarische Darstellung der Auswertungen aller Moleküldynamiksimulationen in der Arbeit.

Startkonformation 5 (Bild 5.42) beschreibt exemplarisch die durchgeführten Gegenüberstellungen. Obwohl die Moleküldynamiksimulation mit einer asymmetrischen Ausgangskonformation (kleine grüne Dreiecke) beginnt, zeigt sich in der abschließenden Auswertung der Trajektorie eine annähernde Gleichverteilung der Torsionswinkel (grüne Kreise) zwischen den beiden Molekülteilbereichen.

5.1.9 Vergleich Discover und Discover3 (Startkonformation 3, 1293K)

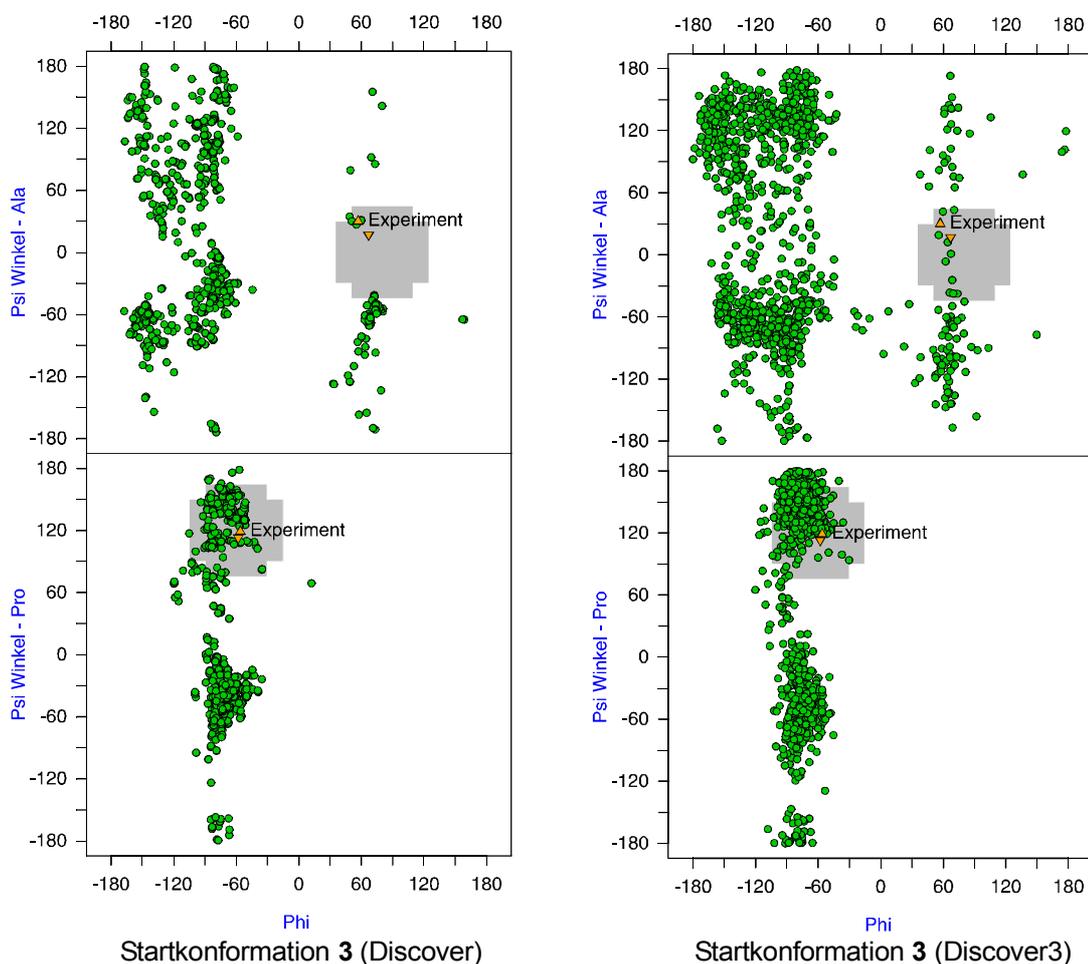


Bild 5.43: Modifizierter Ramachandran-Plot: Discover und Discover3 (Startkonf. 3, 1293K)

Wie oben erwähnt, ist DISCOVER3 eine neuere Implementierung des gleichen Kraftfeldes (CVFF). Obwohl der Hersteller (MSI) angibt, dass die gleichen mathematischen Algorithmen verwendet werden und lediglich die Programmiersprache (C statt Fortran) gewechselt wurde, zeigen sich doch kleine Unterschiede in der statistischen Verteilung. Eine gleichmäßigere Verteilung über den Konformationsraum wird beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine unterschiedliche Rechengenauigkeit (Zwischenergebnisse werden anders gerundet) oder auch eine andere Statistikfunktion (anderer Zufallsgenerator) sein.

5.1.10 Vergleich mit Gromacs (Startkonformation 3, 1093K)

Das Programm GROMACS [4] verwendet ein modifiziertes GROMOS Kraftfeld. Das Kraftfeld basiert wie das CVFF-Kraftfeld auf der klassischen „Newtonschen Mechanik“

und wurde ebenfalls für Proteine und Peptide optimiert. Der besondere Vorteil dieses Programms liegt in der Möglichkeit, längere Moleküldynamiksimulationen in Lösungsumgebung sehr recheneffizient durchzuführen.

Wie der Ramachandranplot (Bild 5.44) von Startkonfiguration 5 zeigt, scheint das GROMACS-Kraftfeld die gewünschten β II-Turns mit einer Wiederfindungsrate von etwa 50% zu bevorzugen. Leider wurde dieses Ergebnis mit den anderen Startkonformationen (1-4) nicht wiedergefunden. Die Mehrzahl der Simulationen (vgl. Startkonformation 3, 4 und 5) ergibt ein Bild, das dem CVFF Kraftfeld sehr ähnlich ist.

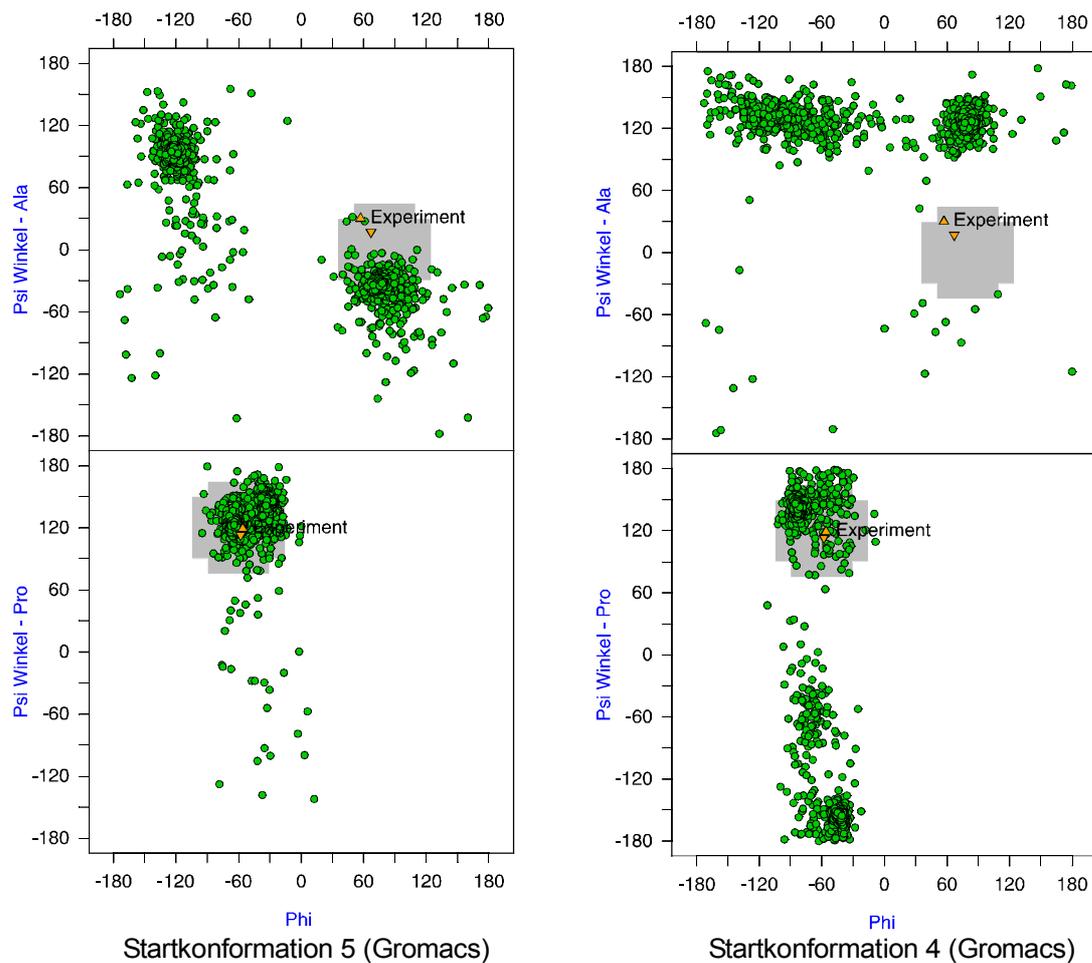


Bild 5.44: Modifizierter Ramachandran-Plot: Gromacs (Startkonf. 5 und 4)

5.1.11 Vergleich mit CHARMM (Startkonformation 3, Umbrella Sampling)

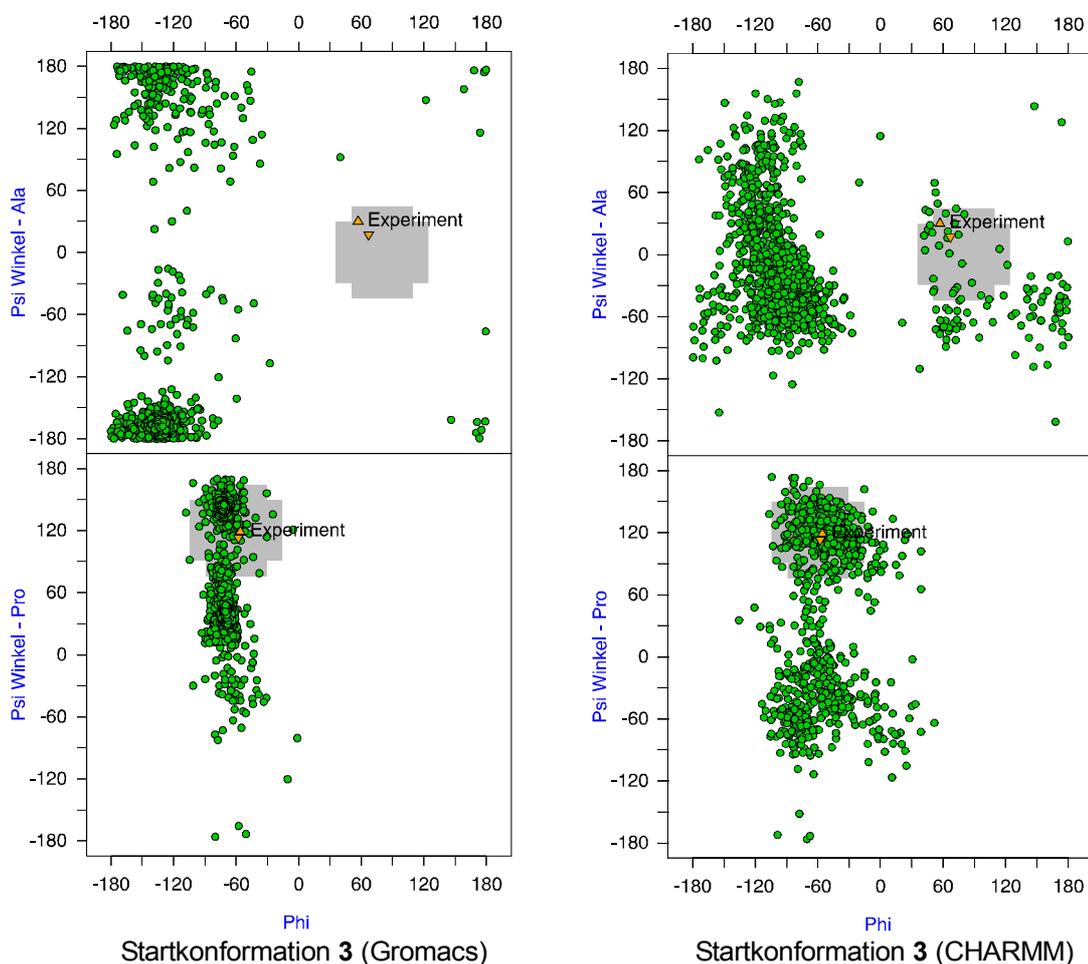


Bild 5.45: Modifizierter Ramachandran-Plot: Gromacs und CHARMM (Startkonf. 3)

Im Rahmen einer Kooperation mit Schäfer [91] konnten die Startkonformationen auch einer Umbrella Sampling Moleküldynamiksimulation mit dem CHARMM-Kraftfeld unterzogen werden. Auch dieses Kraftfeld wird bevorzugt für Proteine und Peptide verwendet. Zusätzlich entwickelten Schäfer et al. eine Methode, in dem das CHARMM Potenzial mit einem impliziten Lösungsmittel-Modell versehen wird. Dadurch wird eine fast 60fache Beschleunigung der MDS gegenüber expliziten Lösungsmittelmolekülen erreicht. Schäfer konnte in [92] zeigen, dass sich besonders Helices und β -Turns mit dieser Methode simulieren lassen.

In diesem Ansatz wurden die 5 Startkonformationen ohne Kenntnis der wahren NMR-Konformation an Schäfer übermittelt. Die 5 resultierenden Molekülensembles (je 5000 Konformationen) wurden dann zur Auswertung zurückgeliefert.

Bei der anschließenden Auswertung ergab sich die erwartete Unabhängigkeit von den Startkonformationen. Die Mehrzahl der Konformationen ($\sim 84\%$) lässt sich aber auch im CHARMM Kraftfeld keiner β -Turn-Kategorie zuordnen. Lediglich 0,2% sind β II-Turns, die Mehrzahl der einzuordnenden Turns fallen in die Klasse β III und β VIII. Im Grunde sieht die Verteilung dem CVFF Kraftfeld (DISCOVER und DISCOVER3) sehr ähnlich. Die einzelnen Bereiche sind jedoch noch etwas runder begrenzt.

5.1.12 Vergleich mit TINKER (*Diffusion Equation Method*)

Abschließend soll noch eine Methode erwähnt werden, die nicht auf dem Moleküldynamiksimulations-Ansatz basiert. Sie ist in der Arbeitsgruppe um Scheraga [93, 94, 95] entwickelt worden und in einer adaptierten Implementierung nach Ponder [7, 96] im Programmpaket Tinker verwirklicht.

Die *Diffusion Equation Method* basiert auf einem speziellen mathematischen Konzept, kombiniert mit einfachen und schnellen Minimierungsalgorithmen. Durch eine umkehrbare mathematische Funktion wird die Energiehyperfläche des Moleküls in mehreren Schritten „verbogen“. Lokale Minima werden dabei beseitigt. Das globale Minimum (tiefster Punkt auf der Hyperfläche) bleibt, wenn auch verschoben, erhalten. Am Punkt der maximalen Deformation wird minimiert (es existiert nur noch ein Minimum, ohne störende Nebenminima). Anschließend wird die Deformation schrittweise rückgängig gemacht (mit einer Minimierung auf jedem Zwischenschritt). Bild 5.46 (links) zeigt diese Prozedur schematisch. Hier wurde die Energiehyperfläche in drei Schritten geglättet (von unten nach oben) und anschließend die Funktion von oben nach unten wieder hergestellt. Die Minimierungen finden bei jedem Wiederherstellungsschritt statt.

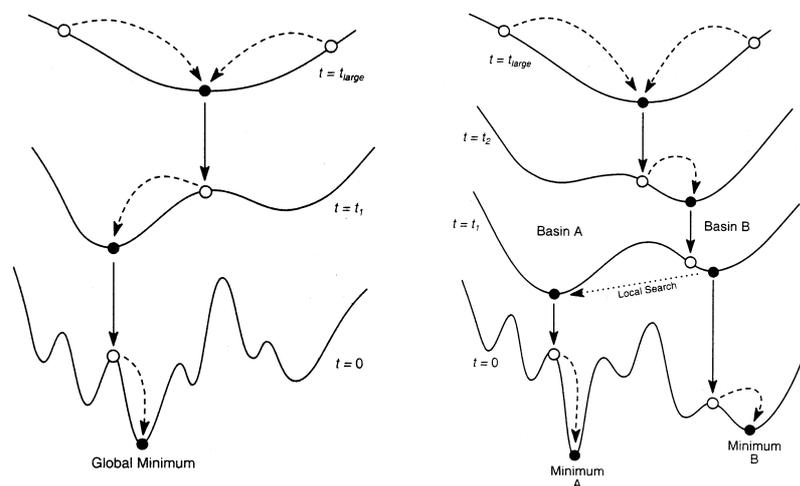


Bild 5.46: Eindimensionale, schematische Darstellung der Diffusion Equation Method [aus 96]

In der rechten Abbildung ist ein etwas schwierigerer Fall dargestellt. Er soll verdeutlichen, dass für die Minimierungen nicht nur die einfachsten Algorithmen (wie „steepest descent“) verwendet werden können (eine gewisse erweiterte Suche nach dem

Minimum ist auf jeder Stufe notwendig). Außerdem zeigt die Abbildung, dass der Erfolg der Methode (das globale Minimum zu finden) nicht garantiert ist.

Die Anwendung auf das cyclische Peptid PAAPAA zeigt Bild 5.47. Ausgehend von einer zufälligen Startkonformation wurde über 100 Schritte (exemplarisch sind 4 Schritte dargestellt) maximal deformiert und über 100 Schritte zurückverformt (inkl. Minimierung).

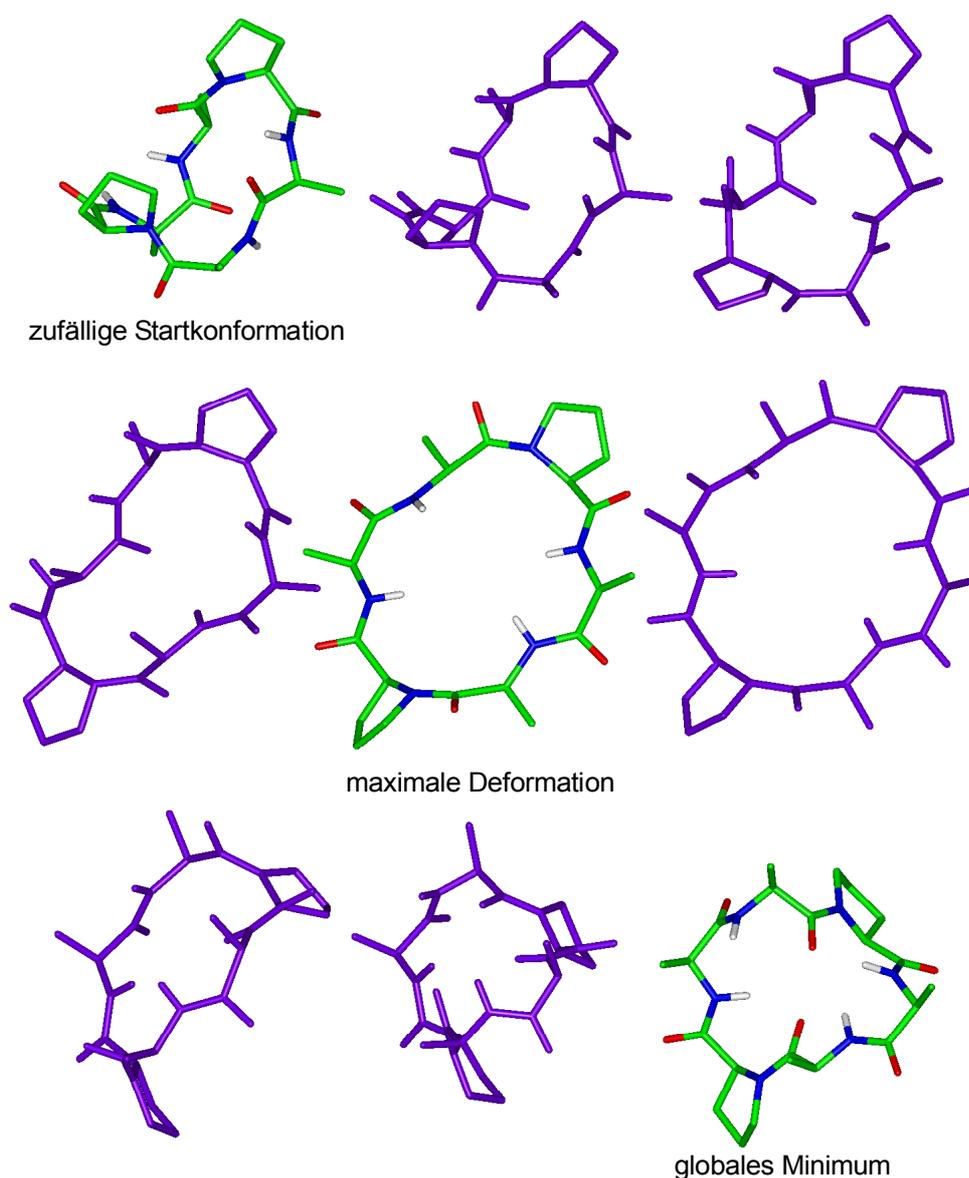


Bild 5.47: Anwendung des Programms Tinker auf PAAPAA [7], Erklärung siehe Text

Die resultierende Struktur entspricht ebenfalls nicht dem experimentellen Befund. Die Ringstruktur ist in sich noch gefaltet, fast kugelförmig und nicht so planar wie bei zwei verknüpften β II-Turns. Dieses Phänomen ist typisch für zu große intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen, die bei Vakuumrechnungen nicht kompensiert

werden. Das Molekül bildet eine möglichst geringe Oberfläche. Üblicherweise wird dieser Effekt durch umgebende Lösungsmittelmoleküle (intermolekulare Wechselwirkungen) reduziert bzw. aufgehoben. Da die Methode sich noch im experimentellen Stadium befindet, lässt das Programm Tinker für Rechnungen noch nicht eine so große Anzahl Atome zu, die für eine Simulation mit Wasser notwendig wäre.

5.1.13 Experimentell bestimmte Konformation von cyclo-GAAAA

Zur Verifizierung der gewonnenen Erkenntnisse wurden die oben beschriebenen Methoden noch auf ein weiteres einfaches cyclisches Peptid angewendet. Die Wahl fiel auf das cyclo-GAAAA. Es handelt sich dabei um ein Pentapeptid, die kleinste Einheit, die sich einfach peptidisch cyclisieren lässt. Glycin ist neben Prolin eine weitere Aminosäure, über die allgemein bekannt ist, dass sie Turn-induzierend wirkt (vgl. Kapitel 3.6.3.2). Nach Kurz [66] liegt das Peptid als β II'-Turn (Ala5-Gly1-Ala2-Ala3) vor. Der zweite Teil (Ala3-Ala4-Ala5) ist einem γ -Turn angenähert. Die peptidischen Verknüpfungen sind alle trans konfiguriert.

Auch bei dieser Struktur wird in Moleküldynamiksimulationen nicht die experimentelle Struktur wiedergefunden. Übereinstimmend wird eine Konformation (vgl. Bild 5.48) mit zwei cis-Verknüpfungen bevorzugt.

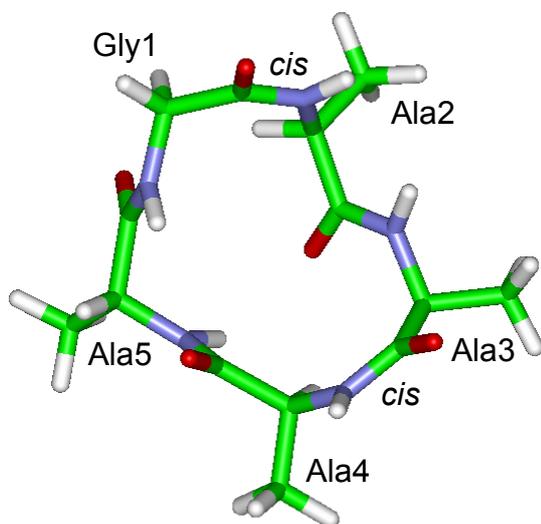


Bild 5.48: Resultierendes cyclo-GAAAA mit zwei cis-Verknüpfungen

5.1.14 Zusammenfassung

Die heutigen Kraftfelder sind noch nicht in der Lage, β -Turns in kleinen, cyclischen Peptiden ohne experimentelle „Constraints“ vorherzusagen.

Ausgefeilte mathematische Methoden wie die „diffusion equation“ suchen zwar in relativ kurzer Zeit nach dem globalen Minimum, sind zur Zeit aber nur mit begrenzten Atomzahlen (d.h. ohne explizites Lösungsmittel wie Wasser) anwendbar. Die resultierenden Konformationen repräsentieren nicht die experimentell-spektroskopisch gewonnenen Ergebnisse, da die zusätzlichen intermolekularen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel nicht berücksichtigt werden.

Positiv hervorzuheben ist die Tatsache, dass für alle Kraftfelder und Softwarepakete bei Simulation in Lösungsmittelumgebung übereinstimmende Ergebnisse unabhängig von der Startkonformation gefunden werden können. Die Wahl des Kraftfeldes ist also nicht ausschlaggebend für das Ergebnis.

Auch wird die experimentelle Struktur in allen Kraftfeldern in Moleküldynamiksimulations-Rechnungen mit Lösungsmittel wiedergefunden. Statistisch ist diese Konformation jedoch so unterrepräsentiert, dass die Methoden keine Aussage über die wahre Populationsstärke der Konformation zulassen.

Verfügt man allerdings schon über ein Templat (experimentelle Daten), das den β -Turn mit entsprechender Sequenz beschreibt, so lässt sich diese Konformation mit einer MDS auf Stabilität untersuchen. Dabei wird die experimentelle Konformation voreingestellt (hier am Beispiel der Toxin FS2 Konformation) und der Einfluss unterschiedlicher Aminosäuresequenzen oder unterschiedlicher Ringschlüsse gleicher Sequenz auf die Stabilität beobachtet. Die Sequenzen, die ihre Konformation nicht oder nur unwesentlich ändern, liegen in einer stabilen Konformation vor und werden im Design-Prozess weiter betrachtet.

Dieser Ansatz stimmt auch mit dem letzten der drei Schritte zur Gewinnung experimenteller NMR-Konformationen überein:

Dabei werden in einer MDS zuerst die Abstandsinformationen einzelner Atompaare (die direkt aus den NMR-Spektren gewonnen wurden) über eine Kraftkonstante auf eine zufällige Startkonformation angewendet.

Anschließend wird diese Kraftkonstante schrittweise verringert, bis das Molekül sich frei in der MDS bewegen kann.

Im dritten und letzten Schritt wird dann die Stabilität der Konformation beurteilt. Ändert sich die Konformation nicht mehr wesentlich, wird die Durchschnittsstruktur (oder 20 repräsentative Konformationen) der freien MDS als Ergebnis der NMR-Untersuchung betrachtet.

5.2 Design von Peptiden mit calciumantagonistischem Potenzial

5.2.1 Übersicht

Für die Entwicklung kleiner konformatorisch eingeschränkter Peptide (P), mit Wirkung am L-Typ-Calciumkanal, wird die Struktur von Toxin FS2 als Vorlage genutzt. Die

Nomenklatur dieser Peptide setzt sich aus drei Bereichen zusammen. Position eins gibt die Anzahl der Aminosäuren im Peptid an. Position zwei unterscheidet zwischen linearen (Li) und cyclischen (Cy) Peptiden und Position drei zeigt, welche Methode zur Cyclisierung verwendet worden ist. „CC“ signalisiert eine Disulfidbrücke zwischen zwei L-Cysteinen während „Cc“ eine Disulfidbrücke zwischen L-Cystein und D-Cystein beschreibt. Demzufolge verbirgt sich hinter der Bezeichnung P5CyCC ein Pentapeptid, das über zwei L-Cysteine (Cystin) cyclisiert ist.

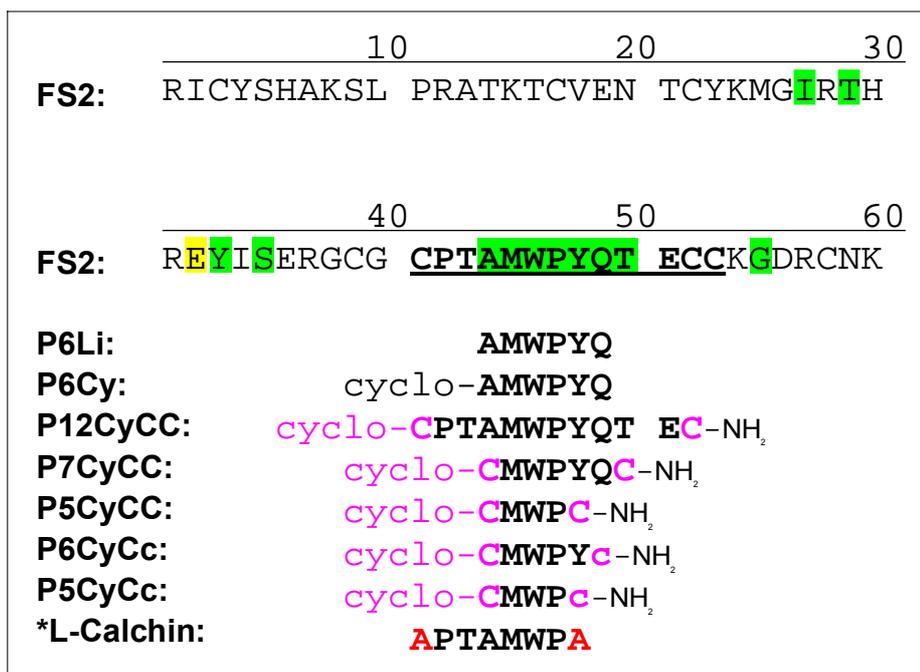


Bild 5.49: Sequenzalignment von Toxin FS2 mit den designen Peptiden und L-Calchin

Die entwickelten Peptide werden im Folgenden einzeln vorgestellt. Zur Orientierung sei auf das Sequenzalignment in Bild 5.49 verwiesen.

5.2.2 P6Li (AMWPYQ)

Nach Eingrenzung der pharmakologisch aktiven Domäne von Toxin FS2 sollte nun versucht werden, ob bereits ein lineares Peptid dieser Sequenz in der Lage ist – ohne stabilisierende „Drei-Finger“-Architektur – die bioaktive Konformation einzunehmen. Die hohe Flexibilität eines solchen Peptids ermöglicht eine optimale Anpassung an die mehr oder weniger vorgegebene Bindungsstelle („induced fit“). Beim Übergang in den geordneten Zustand der Bindung zum Rezeptor geht aber Entropieenergie verloren. Ein vorgeformter, rigider Ligand verliert diese Energie nicht. Beispiele zeigen, dass cyclische Peptide gegenüber ihren linearen Vertretern einen Aktivitätsgewinn um den

Faktor 100 haben können [97]. Im Toxin wird die Konformation durch Disulfid-Brücken in der Core-Region und die Wasserstoff-Brücken zwischen den einzelnen Loops vorgeformt und stabilisiert.

Die Beurteilung, ob das lineare Hexapeptid bevorzugt in der Wirkkonformation in Lösung vorliegt, setzt eine umfassende Konformationsanalyse voraus. Durch die hohe Anzahl frei drehbarer Bindungen erfordert diese ganz besondere Anforderungen. Es eignen sich nur massiv parallelisierte Rechner mit entsprechender Software, wenn eine solche Konformationsanalyse rein theoretisch ohne unterstützende NMR-Messungen durchgeführt werden soll. Daher wurde auf diese Analyse verzichtet und die lineare Sequenz nur für den experimentellen Vergleich mit den cyclischen (konformatorisch eingeschränkten) Derivaten berücksichtigt.

5.2.3 P6Cy (Cyclo-AMWPYQ)

Die (theoretisch) einfachste Möglichkeit das Hexapeptid zu rigidisieren, ist eine Cyclisierung über das Backbone. Die Peptidbindung ist dabei gleichzeitig Stabilisierung und Endgruppe. Allerdings erfordert die praktische Synthese besondere Erfahrung und es lässt sich nicht bei jeder Verbindung vorhersagen, ob die Ausbeute an cyclischem Peptid gegenüber einem Polymerisat aus mehreren Hexapeptidbausteinen ausreichend ist. Die besten Chancen bestehen für eine Cyclisierung in großer Verdünnung und niedriger Reaktionstemperatur [98, 99].

5.2.4 P12CyCC (Cyclo-CPTAMWPYQTEC-NH₂)

Synthetisch wesentlich einfacher zugänglich ist die Cyclisierung über eine Disulfidbrücke. Im Toxin FS2 gibt es schon eine natürliche Brücke zwischen Cys41 und Cys52 im Bereich der Core-Region. Durch die Auswahl des kompletten Loop III soll der strukturegebende Einfluss der Disulfidbrücke unabhängig von den Wechselwirkungen mit den restlichen Loops der Toxinstruktur betrachtet werden.

5.2.5 P7CyCC (Cyclo-CMWPYC-NH₂)

Um die Freiheitsgrade des Dodecapeptides einzuschränken, wurde auf ein Heptapeptid reduziert. Dieses beinhaltet die gesamte Aminosäuresequenz, die für die Wirkung des Toxins verantwortlich sein soll. Eine Cyclisierung sollte bei der geringen Ringspannung gut möglich sein.

5.2.6 P5CyCC (Cyclo-CMWPC-NH₂)

Eine weitere Reduzierung auf ein Pentapeptid erlaubt zwar eine klarere Aussage über den Pharmakophor, erhöht aber die Ringspannung derart, dass eine schwierigere Synthese zu erwarten ist. Bei Pentapeptiden sind die Seitenketten der zwei Cysteine so orientiert, dass durch einen Ringschluss nur die ungewünschte Änderung der Ringkonformation möglich ist.

5.2.7 P6CyCc (Cyclo-CMWPYc-NH₂)

Da alle Peptide eine möglichst große Ähnlichkeit mit der Bindungsdomäne von Toxin FS2 besitzen sollten, wurde ein Hexapeptid konstruiert, bei dem das zweite L-Cystein (Cys49) in der Disulfidbrücke durch ein unnatürliches D-Cystein ersetzt ist (Bild 5.50). Die Seitenketten der beiden L-Cysteine (grün) liegen auf unterschiedlichen Seiten des Peptids. Durch die Substitution eines L-Cysteins gegen ein D-Cystein (orange) ragen beide Thiole auf die selbe Seite und eine Brückenbildung (gepunktete Linie) wird ohne große Konformationsänderung des Backbones möglich.

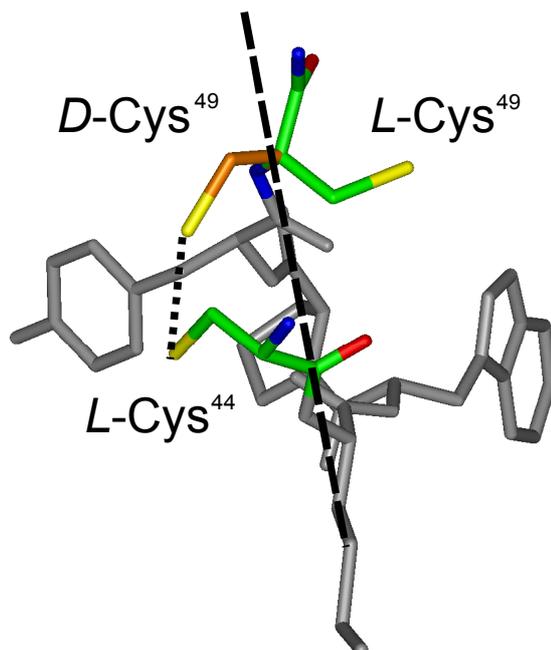


Bild 5.50: Unterschiede für die Cyclisierung eines Hexapeptids (CMWPYC) bei Einsatz von zwei L-Cysteinen (grün) bzw. eines D-Cysteins (orange). Der geplante Ringschluss wird durch die gepunktete Linie angezeigt.

5.2.8 P5CyCc (Cyclo-CMWPc-NH₂)

Der Einfluss von D-Cystein auf die Struktur soll auch an einem Pentapeptid untersucht werden. Deshalb wurde analog zu P5CyCC (Kapitel 5.2.6) auch P5CyCc konstruiert und untersucht.

5.2.9 Geplante Charakterisierung der kleinen Peptide

Für alle cyclischen Peptide wird eine Konformationsanalyse (MDS mit „Simulated-Annealing-Protokoll“) durchgeführt, um zu beurteilen, ob sie in einer Konformation vorliegen können, die dem Schlagentoxin-Templat entspricht. Die Ergebnisse werden in Kapitel 5.5 diskutiert. Danach werden die Wechselwirkungsfelder des aussichtsreichsten Kandidaten mit dem DHP-Pharmakophor und mit Toxin FS2 verglichen (Kapitel 5.6ff).

5.3 L-Calchin (L-type Calcium channel inhibitor)

1995 entwickelten Kini und Evans eine Theorie zur Vorhersage von Protein-Protein Interaktionen ausschließlich aufgrund der Primärsequenz von Proteinen [100]. Ihr Kriterium ist das häufige Vorkommen von Prolin als flankierende Aminosäure in Protein-Protein-Interaktions-Regionen. Sie suchten nach kurzen Peptidsequenzen (3-7 Aminosäuren) zwischen zwei Prolinen und publizierten Ergebnisse an RGD- (Arg-Gly-Asp)-enthaltenden Peptiden [101].

Erst im späten Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit (1998) wurde auch Calciseptin bzw. Toxin FS2 untersucht [102]. Im Schlangentoxin FS2 liegen drei Proline – Pro11, Pro42 und Pro47 – (Bild 2.10) vor. Die Proline 42 und 47 passten so gut auf die Auswahlkriterien, dass die Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen zur Überprüfung ihrer Theorie anstellte. Nachdem für Calciseptin und FS2 [48, 49] der spezifische Block des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals nachgewiesen wurde, synthetisierten Kini et al. das lineare Peptid L-Calchin (L-type Calcium channel inhibitor). Die Sequenz (APTAMWPA) entspricht exakt den zwischen Pro42 und Pro47 eingeschlossenen Aminosäuren. Als Anfangs- und Endaminosäure wurden noch Alanine angehängt. Zur Überprüfung wurde zusätzlich S-Calchin (scrambled calchin) mit der Sequenz TAPAPWMA synthetisiert. Die Überprüfung der Ergebnisse fand an zwei biologischen Systemen statt.

Im ersten Fall wurde L-Calchin am isolierten Langendorff-Herz getestet. Inhibitoren des L-Typ-Calciumkanals verschlechtern die mechanische Auswurfleistung des linken Herzventrikels. Im Test gegen Diltiazem entsprach eine 5µM Lösung L-Calchin einer 1µM Lösung Diltiazem. Der entwickelte Druck des linken Ventrikels nahm bei beiden um etwa 20% ab. L-Calchin wirkt damit etwa fünf Mal schwächer als Diltiazem.

Um den Effekt direkt am L-Typ-Calciumkanal messen zu können, wurde der Calciumeinstrom mit der so genannten „whole-cell patch clamp“-Methode an ventrikularen Myocytenzellen gemessen. Bei einer Konzentration von 100µM reduzierte L-Calchin den Calciumeinstrom auf 46%. Verglichen wurden damit Ergebnisse von Calciseptin, das bei A7r5-Zellen eine 50% Reduktion des Calciumflusses bei einer Konzentration von 430 nM erreichte. L-Calchin ist also in A7r5-Zellen etwa 230 Mal schwächer wirksam als Calciseptin/FS2. Für die zufällige Sequenz S-Calchin („scrambled calchin“) konnte keine Wirkung gemessen werden.

Der Nachweis der Wirksamkeit von L-Calchin auf den L-Typ-Calciumkanal bedeutet für diese Arbeit schon vorab die experimentelle Bestätigung, dass die Wirkung im postulierten Bereich des Loops III von Toxin FS2 liegt.

5.4 Durchführung der Moleküldynamiksimulationen (MDS)

5.4.1 Moleküldynamiksimulation in Wasserbox

Die generierten cyclischen Peptide werden einer Moleküldynamiksimulation in einer Wasserbox unterworfen. Die Größe der Wasserbox beträgt $33 \times 33 \times 33 \text{ \AA}$ bzw. $44 \times 44 \times 44 \text{ \AA}$ für P12CyCC. Nach van Gunsteren [103] sollte die Ausdehnung der Simulationsbox mindestens das Doppelte der größten Ausdehnung des zu untersuchenden Moleküls betragen. Das Peptid wird in der Startkonformation in der Box zentriert und mit der im Programm INSIGHT implementierten Füllmethode mit Wassermolekülen aufgefüllt (Bild 5.51). INSIGHT greift dabei auf eine äquilibrierte Wasserbox zurück und löscht alle Wassermoleküle, deren van-der-Waals-Radien mit denen des Peptides überlappen. So können auch Hohlräume in Proteinen mit Wasser gefüllt werden und die Äquilibrationszeit der kompletten Wasserbox (mit Zielmolekül) wird deutlich reduziert.

Die anschließende Berechnung (Minimierung und MDS) wird mit periodischen Randbedingungen durchgeführt. Dabei wird zur Reduzierung von Randeffekten die Box von Kopien ihrer selbst umgeben. Für eine quader- bzw. würfelförmige Box werden 26 Kopien benötigt [103]. Die resultierende Periodizität ist vergleichbar mit der eines Kristalls. Bei einer realen Lösung kommt diese Periodizität nicht vor; sie ist ein Artefakt. Um keine unphysiologischen Bedingungen zu schaffen, müssen in der Simulation für alle weiterreichenden Wechselwirkungen Abbruchkriterien gesetzt werden. Der Radius der Abbruchkriterien darf dabei höchstens die Hälfte der Kantenlänge der Box betragen. Das Protein/Peptid kann so nicht mit seinem „Double“ wechselwirken, wodurch Artefakte weitgehend verhindert werden.

Alle Moleküle, die im Laufe der Dynamik aus der zentralen Box wandern, werden mit unveränderter Geschwindigkeit auf der gegenüberliegenden Seite des „translatierten“ Abbildes wieder zurückgeführt.

In der Moleküldynamiksimulation von Peptiden, die über ein freies Amin am N-Terminus verfügen, ist der Protonierungsgrad vor der Simulation einzustellen. In der hier vorliegenden Simulation wurde die ungeladene Form gewählt.

Eigentlich weisen einzelne freie Aminosäuren an der Aminofunktion einen pK_S -Werte von 9-10 auf. Das heißt, sie liegen in wässriger Lösung hauptsächlich protoniert vor (99-99,9%) und müssten folgerichtig in geladener Form simuliert werden. In der Literatur finden sich jedoch für den N-Terminus kurzer Peptide pK_S -Werte bis zu 7,2 [104, 105, 106]. Für diese Derivate liegt die protonierte und unprotonierte Form annähernd im Gleichgewicht vor. Hinzu kommt, dass Untersuchungen von permanent geladenen Dihydropyridinen darauf schließen lassen, dass die Bindungsstelle 11-14 \AA innerhalb der lipophilen Membran liegt. DHPs mit der permanenten Ladung zu nahe am DHP-Ring (Spacer von 2 C-Atomen) erwiesen sich als unwirksam [107, 108]. Die Bindungsstelle kann wahrscheinlich nur in ungeladener Form erreicht werden. Zieht

man diese Erkenntnis in Betracht und berücksichtigt zudem, dass in lipophiler Umgebung die Tendenz zur Ausbildung formaler Ladungen abnimmt, so erscheint eine Simulation in ungeladener Form notwendig.

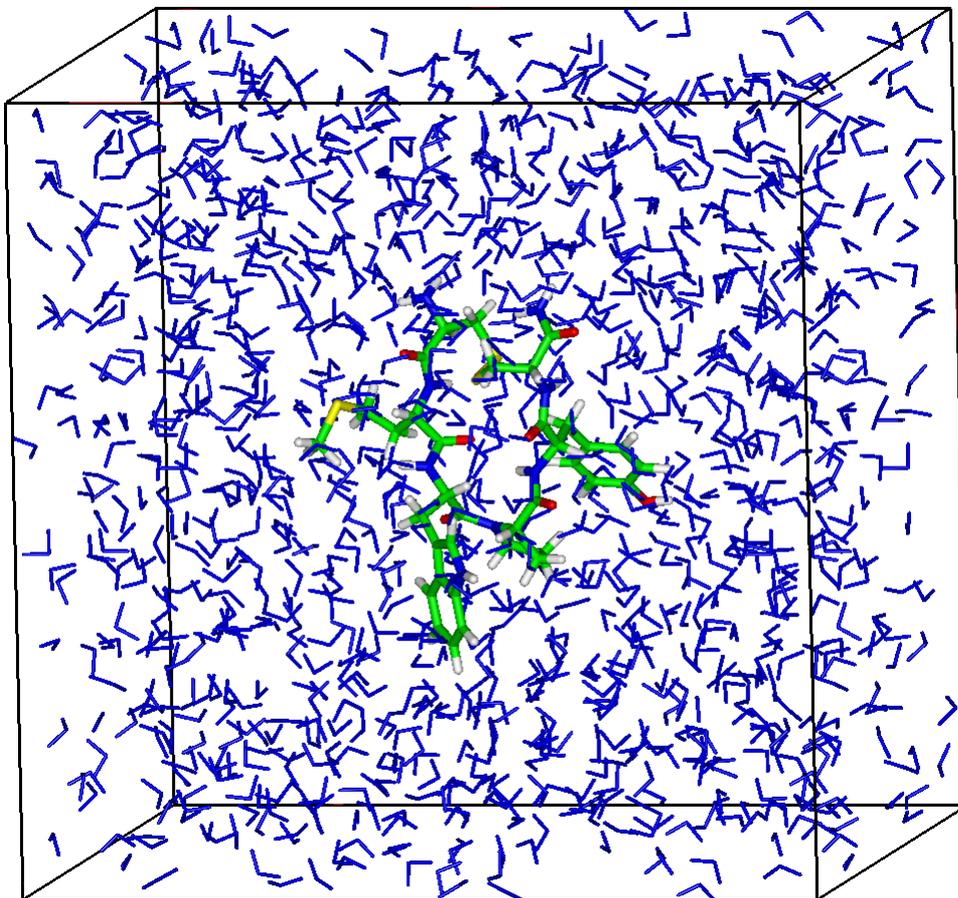


Bild 5.51: Moleküldynamiksimulation von P6CyCc in Wasser (blau) in einer Box von $33 \times 33 \times 33 \text{ \AA}$

5.4.2 Initialisierungsphase

Die mit Wasser und dem entsprechenden Peptid gefüllte Box wird kurz minimiert, um schlechte van-der-Waals-Kontakte zu entfernen. Lokale Energiemaxima, die zu einem Abbruch der folgenden Dynamik führen könnten, werden so ausgeschlossen. Nach 500 Zyklen „steepest descent“ und 250 Zyklen „conjugate gradient“ wird mit der Initialisierungsphase, einer Moleküldynamiksimulation über 2500 fs (2,5 ps) bei 293 K, begonnen.

5.4.3 Simulated-Annealing-Protokoll

Nach der Initialisierungsphase wird ein Simulated-Annealing-Protokoll für die MDS gestartet und von jedem simulierten Peptid 200 Strukturen zur Auswertung gesammelt. Für jede Struktur wird dabei über 2500 fs auf 800 K aufgeheizt, um danach über die gleiche Zeitspanne auf 0 K abzukühlen (Bild 5.52). Am Ende jedes Zyklus wird die Konformation des Peptids und der Wassermoleküle gespeichert und die Kraftfeldenergie bezogen auf das Peptid registriert. Die hohe Temperatur von 800 K ist notwendig, um aus möglichen lokalen Minima herauszukommen und einen möglichst großen Konformationsraum zu erfassen. Man verhindert so auch eine Abhängigkeit der MDS von der Startstruktur des Systems.

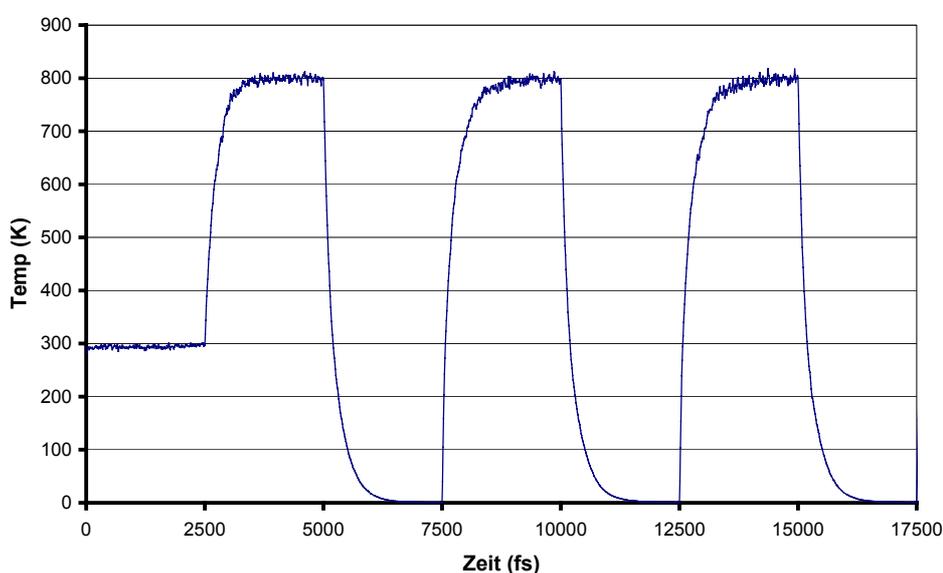


Bild 5.52: Temperaturverlauf der MDS (Simulated-Annealing-Protokoll) – Ausschnitt der Initialisierungsphase (2500 fs) und von drei Simulationszyklen (je 5000 fs)

5.4.4 Temperaturverlauf

Die Temperatursteuerung von DISCOVER wird an ein Temperaturbad gekoppelt. Dadurch treten die Änderungen der Temperatur verzögert auf. Diese Kopplung lässt sich über den Faktor TIMTMP (Einheit: ps) beeinflussen, der als Halbwertszeit zu verstehen ist. Der Wert wird vom System noch mit dem Faktor $1/(2 \ln 2)$ skaliert, um eine exponentielle Anpassung (Zunahme oder Abnahme) der Temperatur an die Zieltemperatur zu errechnen [109, S. E-111].

In Bild 5.52 ist der Temperaturverlauf dargestellt. Während der Initialisierungsphase bleibt die Temperatur konstant. Zum Zeitpunkt 2,5 ps wird die neue Zieltemperatur auf 800 K eingestellt. Durch die verzögerte Anpassung ($\text{TIMTMP} = 0,15 \text{ ps}$) braucht das System etwa 1,25 ps, um die Zieltemperatur zu erreichen. Bei 5 ps wird die

Zieltemperatur auf 0 K gesetzt. Nach einer exponentiellen Abnahme wird die Struktur bei 7,5 ps (0 K) zur Analyse gespeichert. Alle folgenden Zyklen brauchen für die Aufheizphase und das anschließende Abkühlen jeweils 2,5 ps. Diese Programmschleife generiert insgesamt 200 Strukturen.

5.4.5 Energieminimierung

Durch das langsame Abkühlen auf 0 K wird ein energetisch günstiger Zustand für das ganze System erreicht. Um zu prüfen, ob wirklich eine Minimumstruktur erreicht worden ist, wurden exemplarisch noch einige der generierten Strukturen weiter minimiert. Es zeigte sich jedoch, dass dabei keine weiteren Unterschiede auftreten und so konnte für die folgenden Rechnungen auf die zeitintensive Minimierung der Einzelstrukturen verzichtet werden. Jeder generierten Struktur wird die entsprechende Kraftfeld-Energie zugeordnet. Diese besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten, der intramolekularen und den intermolekularen Energie. Die Werte werden vom Kraftfeld in kcal/mol berechnet. Für die intermolekulare Energie wird nur die nichtbindende Energie ausgegeben, da keine kovalenten Bindungen zum umgebenden Wasser auftreten. Die Gesamtenergie lässt eine Aussage über die Häufigkeit des Auftretens dieser Konformation in seiner Wasserumgebung zu. Um die einzelnen Konformationen der Peptide weiter zu untersuchen (Clusteranalyse), werden zur einfacheren Handhabung die umliegenden Wassermoleküle entfernt.

5.4.6 Clusteranalyse

Die 200 archivierten Strukturen müssen auf Ähnlichkeit überprüft werden. Wenn Konformationsfamilien vorliegen, wird der Vertreter mit der geringsten Kraftfeldenergie als Familienrepräsentant ausgewählt. Um diese Familieneinteilung vorzunehmen, müssen alle Konformere miteinander verglichen werden. Bei 200 Strukturen werden also 40000 (200^2) Vergleiche durchgeführt. Unter der Prämisse, dass Familienvertreter möglichst geringe Kraftfeldenergien aufweisen sollen und nur zu einer Familie gehören dürfen, lässt sich die hohe Zahl der notwendigen Vergleiche deutlich unter die Hälfte reduzieren, wenn man die Strukturen vorher nach ihren potenziellen Energien aufsteigend sortiert. Wird der Vergleich mit der energieärmsten Struktur begonnen, ist sie per Definition der erste Familienvertreter und man kann alle Mitglieder der ersten Familie herausuchen. Diese Mitglieder stehen dann nicht als weitere Familienvertreter zur Verfügung und müssen auch nicht für weitere Vergleiche herangezogen werden. Die energetisch nächstgünstigste Struktur, die nicht zur ersten Familie gehört, ist dann der Familienvertreter für die zweite Familie, usw.

5.4.6.1 Superpositionierung

Zum Vergleich müssen die Strukturen räumlich übereinander gelegt (superpositioniert) werden. Das Programm INSIGHT vergleicht dabei die Position von vorher definierten Atomen und führt einen „least square fit“ durch. Das bedeutet, das zu vergleichende Molekül wird so lang im Raum bewegt, bis der RMS-Wert (root mean square)

möglichst klein ist. Dabei sollten nur solche Atome ausgewählt werden, die möglichst bei allen Strukturen kleine Abweichungen erzeugen, damit alle Strukturen vergleichbar bleiben. Dagegen wird als Kriterium für die Einteilung in unterschiedliche Strukturfamilien eine möglichst große RMS-Abweichung ausgewählter Atome verwendet. Es wird nicht mehr nach dem kleinsten, sondern nach dem größten Unterschied gesucht.

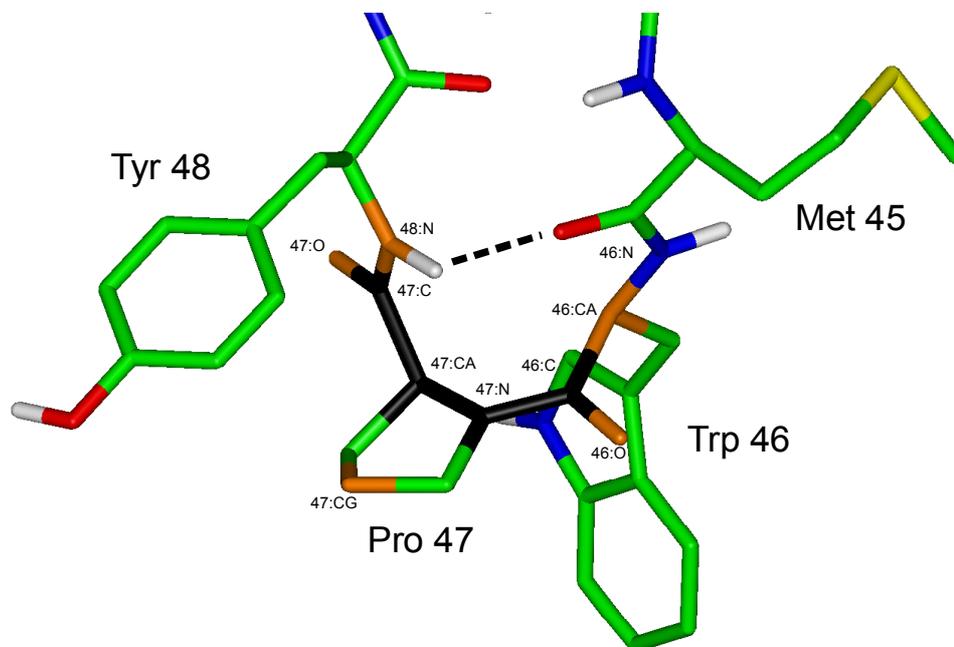


Bild 5.53: Toxinsequenzabschnitt (AS 45-48) mit Kriterien für RMS-Abweichung (siehe Text)

Im Fall der untersuchten Peptide wird über vier Atome des Backbones superpositioniert (Bild 5.53; schwarz dargestellt): der Carbonylkohlenstoff des Trp46 sowie Stickstoff-, C-alpha- und Carbonylkohlenstoff-Atom des Pro47.

Die anschließende RMS-Berechnung für die Einteilung erfolgt über die fünf in Bild 5.53 orange dargestellten Atome: Carbonylsauerstoff und C-alpha des Trp46, Carbonylsauerstoff des Pro47, Stickstoff des Tyr48 sowie der äußerste Kohlenstoff des Prolinrings. Diese Atome werden ausgewählt, weil eine Konformationsänderung im Backbone (Abweichung vom Turn-Typ βVIa) durch einen hohen RMS-Wert dieser Atome besonders gut wiedergegeben wird.

5.4.6.2 Bewertungskriterien für die Familieneinteilung

Konformationen mit einer RMS-Abweichung kleiner als $0,6 \text{ \AA}$ wurden in einer Familie zusammengefasst. Außerdem durfte die Differenz der totalen Kraftfeldenergie (intramolekulare und intermolekulare mit dem umgebenen Wasser) nicht größer als 20 kcal/mol sein. Die Ergebnisse wurden zusätzlich noch visuell bewertet. Dabei ist zu beachten, dass die absoluten Grenzwerte für die Auswertung sich nur auf diesen speziellen Fall der Turnstruktur beziehen. Im Histogramm der RMS-Abweichungen

zwischen den Strukturen liegt eine große Anzahl zwischen 0,5 Å und 0,6 Å. Der nächste Cluster folgt erst ab einem RMS-Abstand von 0,8 Å. Damit ist eine natürliche Grenze zwischen innerfamiliärer RMS-Abweichung ($<0,6$ Å) und interfamiliärer RMS-Abweichung ($>0,8$ Å) gezogen. Diese Grenze muss jedoch beim Vergleich anderer Turnstrukturen neu bestimmt werden.

5.4.6.3 cis-Prolin

Es lässt sich beobachten, dass nur in einigen Konformationen die experimentell gefundene cis-Konfiguration des Pro47 erhalten bleibt. Dieses Kriterium lässt die Beurteilung der Einheitlichkeit der Familien zu und gibt einen direkten ersten Hinweis auf die Ähnlichkeit zur Toxinstruktur.

5.4.6.4 Visuelle Auswertung

Bei der anschließenden visuellen Betrachtung wurde beurteilt, ob die Konformationen des Backbones ähnlich sind. Dazu ließ sich besonders die Orientierung des Carbonylsauerstoffs von Met45 und der NH-Wasserstoff des Tyr48 heranziehen. Im optimalen Fall eines β VIa-Turns bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen diesen Funktionen (Bild 5.53).

5.4.6.5 Konformation der Seitenketten

Die Seitenketten der Aminosäuren Met45, Trp46 und Tyr48 liegen im Toxin lösungsmittlexponiert vor (vgl. Bild 5.54) und sie können frei rotieren. Für die Betrachtung der Familieneinteilung in den cyclischen Peptiden wurde die Konformation der Seitenketten daher nicht weiter ausgewertet.

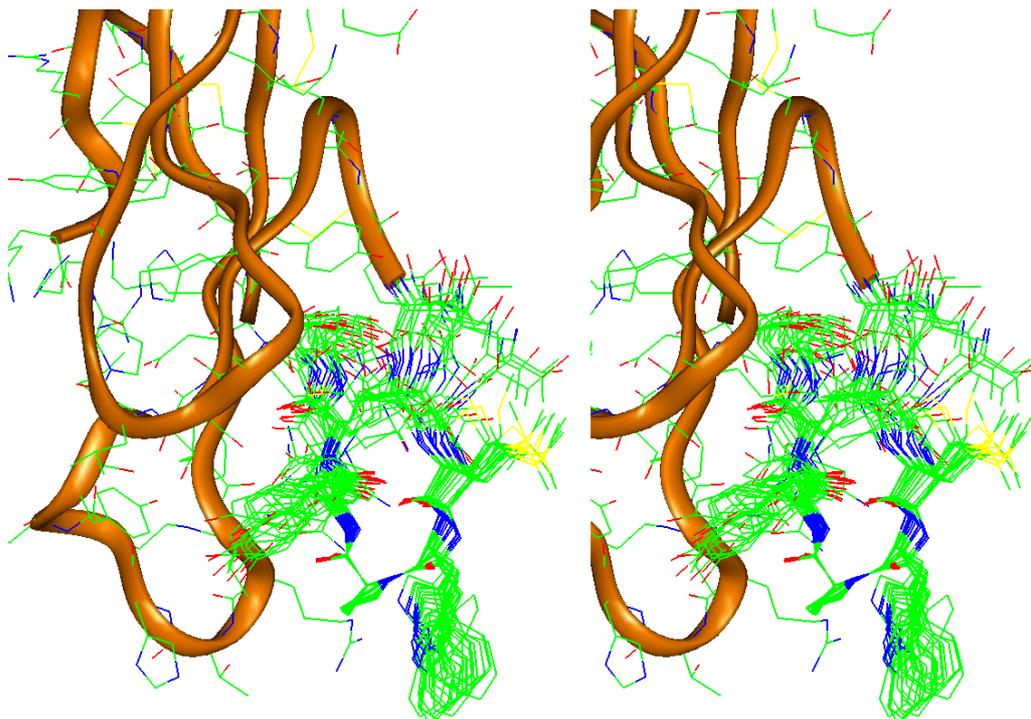


Bild 5.54: Stereobild der Seitenkettenkonformationen von Toxin FS2

5.4.6.6 Lokale Minima

Das „Simulated Annealing“-Protokoll wurde angewendet, um aus lokalen Minima herauszukommen und einen möglichst großen Konformationsraum zu erfassen. Die Verteilung der Strukturen sollte im Verlauf der Dynamik zufällig erfolgen. Durch eine graphische Auswertung lässt sich zeigen, dass die Abfolge von energetisch günstigen und ungünstigen Konformationen rein zufällig ist. Auch die energetisch günstigsten Konformationen sind gleichmäßig über den Simulationszeitraum verteilt (Bild 5.55).

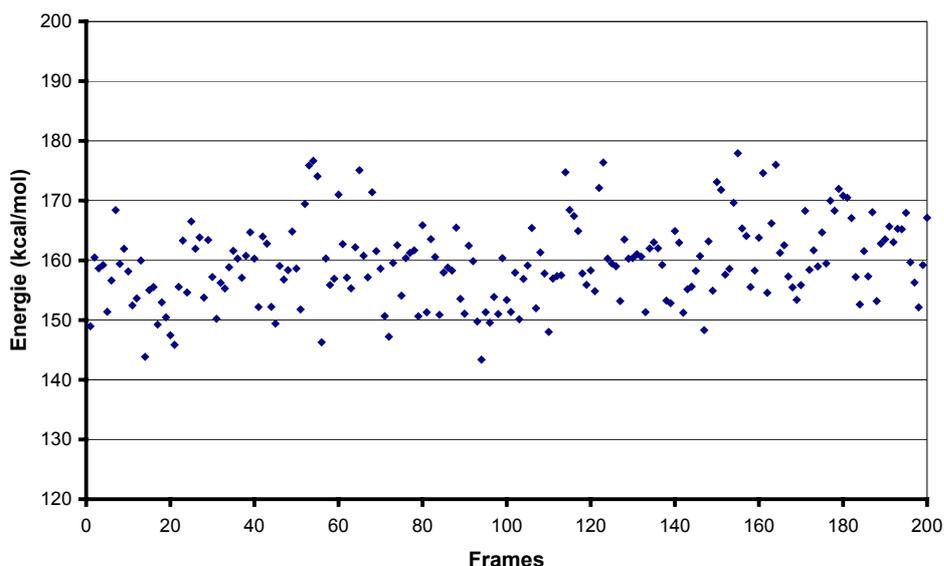


Bild 5.55: Energien der archivierten Konformationen im Verlauf der MDS – Simulated-Annealing-Protokoll (Bsp. P6CyCc)

5.4.6.7 Familienvertreter

Für die 200 archivierten Konformationen ergeben sich je nach Peptid etwa 15 Familien mit Häufigkeiten von 1-2 bis hin zu 50-80 Vertretern. Im Bereich der hohen Energiewerte tauchen „Familien“ mit nur einer einzigen Struktur auf, die zum Teil aber nur wegen des Energiedifferenzkriteriums von 20 kcal/mol resultieren. Sie wurden nicht für die weitere Familienauswertung berücksichtigt, da anzunehmen ist, dass diese Konformationen energetisch so ungünstig sind, dass sie keine bevorzugten Strukturen für die Peptide darstellen. Am Beispiel des Hexapeptides P6CyCc sind die Strukturen nach Familien sortiert gegen die entsprechenden Energiewerte aufgetragen (Bild 5.56). Aus allen Konformationen einer Familie wurde das Konformer mit der kleinsten Kraftfeldenergie als Familienrepräsentant ausgewählt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

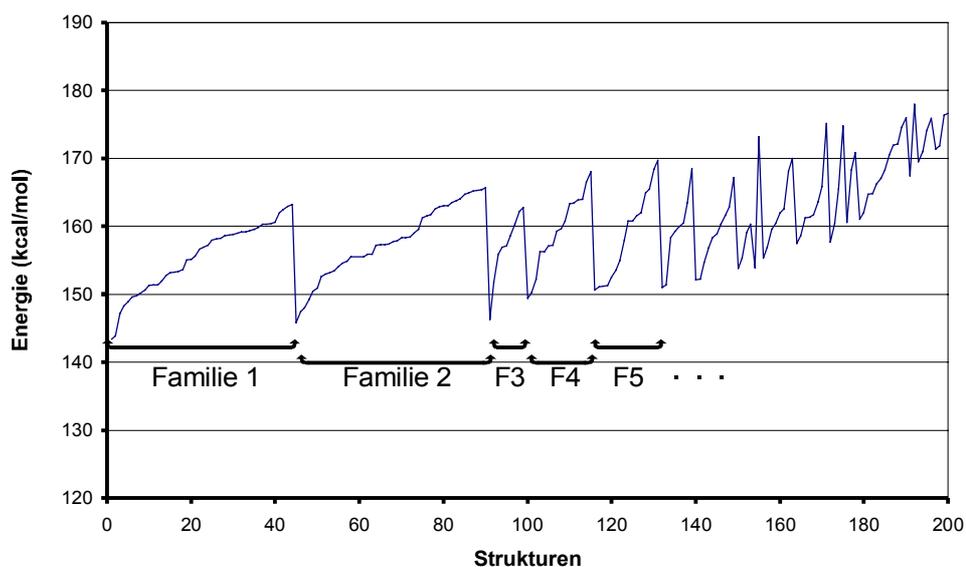


Bild 5.56: Energien der archivierten Konformationen sortiert nach Familien (Bsp. P6CyCc)

5.4.7 Vergleich von Peptid- zur Toxin-Konformation

Die experimentelle Referenzstruktur (Toxin FS2, Struktur 16) wird auf jeden Familienrepräsentanten der Peptide superpositioniert (analog Kapitel 5.4.6.1) und der RMS-Wert über neun Atome (Trp46:O,CA,C; Pro47:N,O,CA,C,CG; Tyr48:N) bestimmt. Die resultierenden RMS-Abweichungen zeigen, wie gut eine Familie die Toxinstruktur repräsentiert. Die Kraftfeldenergie und die Anzahl der Familienmitglieder geben an, wie häufig das Peptid in dieser Konformation vorliegt. Fasst man alle Ergebnisse zusammen, erhält man ein Bewertungskriterium für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Familienvertreter die Toxindomäne simulieren kann.

Die einzelnen NMR-Strukturen des Toxins weichen von der Referenzstruktur 16 um weniger als $0,5 \text{ \AA}$ ab. Für einen sinnvollen Vergleich der Familienvertreter wurden nur solche als ähnlich zum Toxin betrachtet, deren durchschnittliche Abweichung des RMS-Wertes maximal $0,6 \text{ \AA}$ beträgt. Weiterhin wurde für die abschließende Beurteilung des Peptids bewertet, wie groß die Familie ist und mit welcher Kraftfeldenergie, relativ zur energieärmsten Struktur (dem Familienrepräsentanten der ersten Familie), der Familienvertreter verzeichnet wird. Damit konnten die Unterschiede zwischen den einzelnen neuen Peptiden dargestellt und der aussichtsreichste Kandidat zur Nachahmung des Toxins am Rezeptor ausgesucht werden.

5.5 Auswertung der Moleküldynamiksimulationen

Zur Beurteilung der Ergebnisse und zum einfachen Vergleich der Peptide untereinander werden die Zahlen graphisch in je einem Diagramm pro Peptid gezeigt (Bild 5.57 und Bild 5.59 - Bild 5.63).

Auf der X-Achse sind Energiedifferenzen der Familienrepräsentanten zur energieärmsten Familie für diesen MDS-Lauf aufgetragen, auf der Y-Achse sind es die RMS-Werte der Familienrepräsentanten zur Toxin FS2-Referenzstruktur. Der genaue Wert ist zusätzlich neben den Messpunkten verzeichnet.

Die „Fehlerbalken“ geben die Anzahl der Konformere in einer Familie wieder. Als Referenz ist die Länge eines Balkens aufgetragen, die 10 Konformeren entspricht. Bei den 200 Konformeren pro Peptid werden die 15 energieärmsten Familien ausgewertet.

Zur Interpretation sollen folgende Kriterien verwendet werden:

- Familien mit Ähnlichkeit zur Referenzstruktur der Toxins haben einen kleinen RMS-Wert (nahe der X-Achse).
- Sie sollten möglichst nahe an der energieärmsten Struktur liegen (also möglichst nahe der Y-Achse).
- Die Familie sollte möglichst viele der 200 Strukturen enthalten (große „Fehlerbalken“)

5.5.1 P6Cy (Cyclo-AMWPYQ)

Die Analyse des ersten Peptids (Backbone-Cyclisierung) liefert als energetisch günstigste Familie (45 Strukturen) eine Konformation, die deutlich von der des Toxins abweicht (RMS = 1,32 Å). Die zweite Familie (F2), bestehend aus 26 Strukturen, zeigt nur kleine Abweichungen zum Toxin (RMS = 0,54 Å) und zeichnet sich zudem durch eine nur geringfügig höhere potenzielle Energie ($\Delta E = 3,2$ kcal/mol) im Vergleich zur energiegünstigsten Familie (F1) aus. Dies lässt ein häufiges Auftreten der Konformation vermuten.

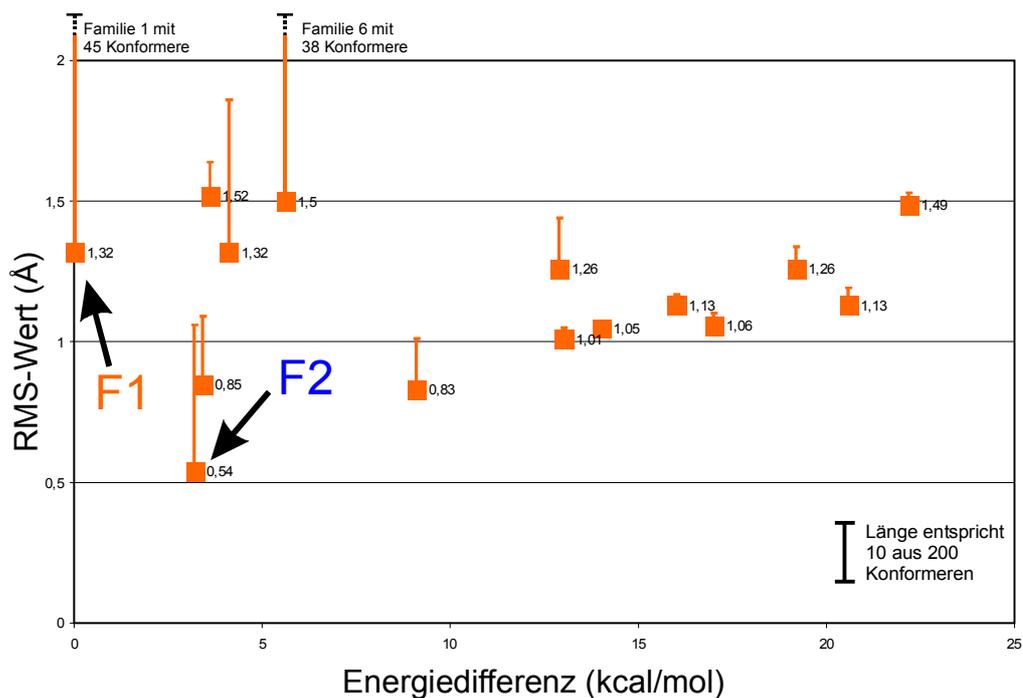


Bild 5.57: Auswertung der Clusteranalyse P6Cy: die X-Achse stellt die Energiedifferenz zur energieärmsten Struktur dar; die Y-Achse gibt den RMS-Wert des Familienrepräsentanten zur Toxin-Referenzstruktur an; die „Fehlerbalken“ zeigen die Größe der Familie.

Bild 5.58 zeigt exemplarisch die visuelle Auswertung der ersten zwei Familien. Die Unterschiede und Ähnlichkeiten der Konformationen im Vergleich zur Toxin-Referenzstruktur lassen sich gut erkennen. Familie 1 (orange) ist durch ein trans-Prolin und ein cis-Tyrosin gekennzeichnet, während in Familie 2 (blau) nur Prolin cis konfiguriert (wie im Toxin) vorliegt. Die NH-Funktion ist aber aus der Turnebene herausgedreht und kann dadurch nicht mehr durch eine H-Brücke stabilisierend wirken.

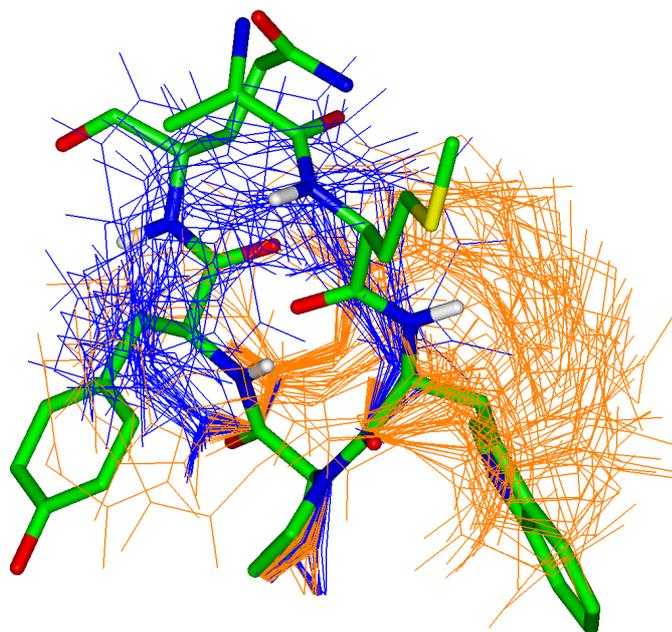


Bild 5.58: Superpositionierung des jeweiligen Peptidbackbones der Familie 1 (orange) und Familie 2 (blau) von P6Cy auf die aktive Domäne von Toxin FS2 (farbkodiert)

5.5.2 P12CyCC (Cyclo-CPTAMWPYQTEC-NH₂)

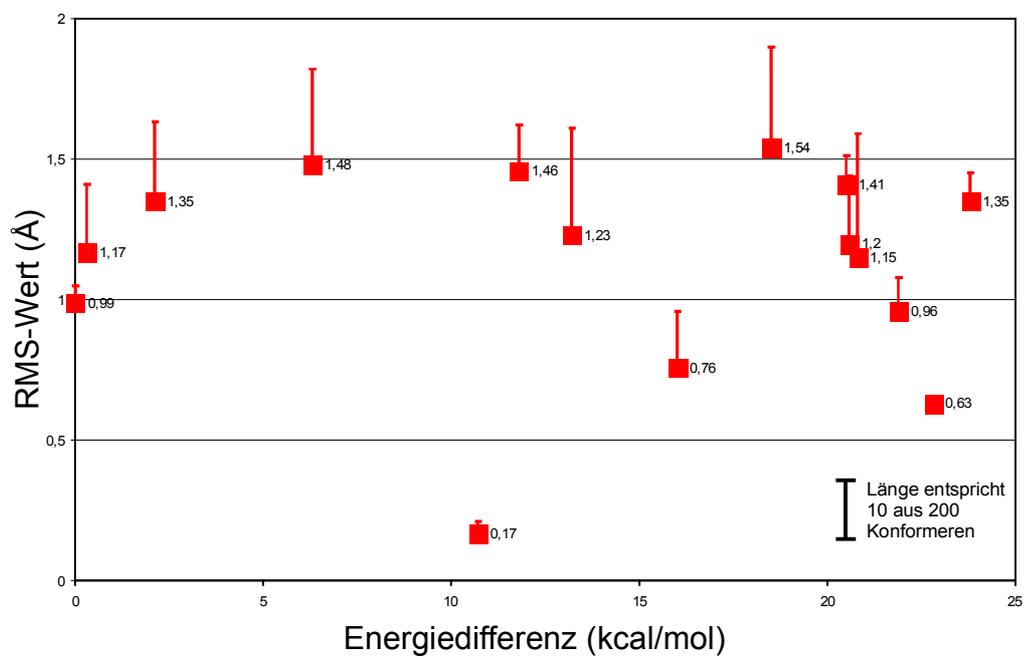


Bild 5.59: Auswertung der Clusteranalyse von P12CyCC

Die Konformationsanalyse des cyclischen Dodecapeptids liefert, bedingt durch die zahlreichen Freiheitsgrade, eine Vielzahl kleiner Familien (maximal 22 Familienvertreter). Familie 5, die dem Toxin am ähnlichsten ist (RMS-Wert 0,17 Å), besteht nur aus 2 Familienmitgliedern und besitzt eine sehr hohe potenzielle Energie (ΔE 10,7 kcal/mol zu F1).

5.5.3 P7CyCC (Cyclo-CMWPYC-NH₂)

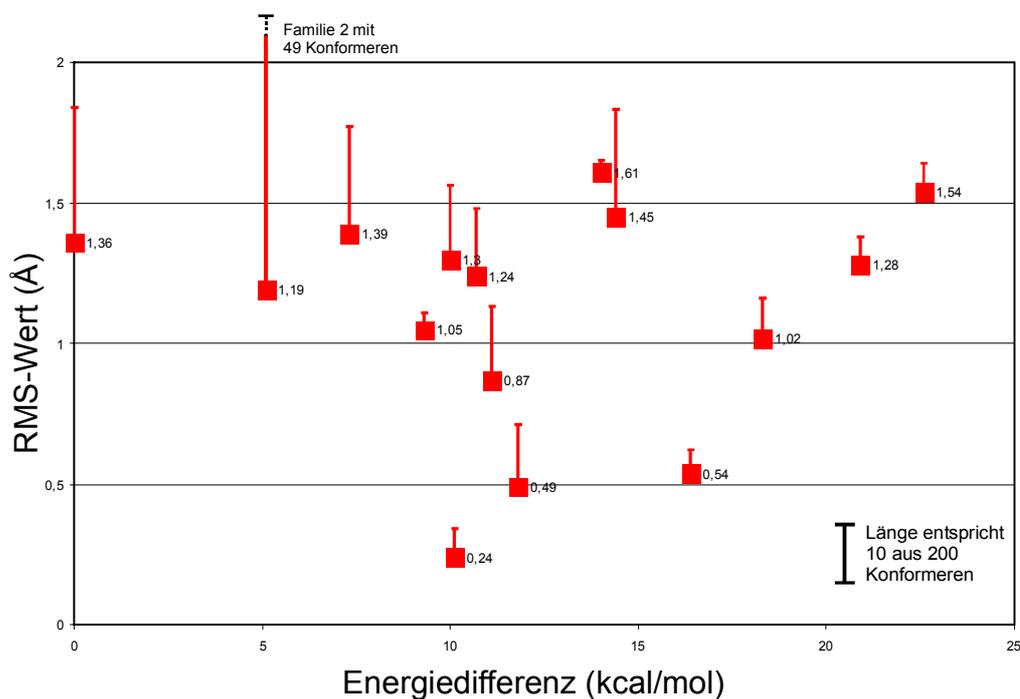


Bild 5.60: Auswertung der Clusteranalyse von P7CyCC

Die Verkürzung von Loop III auf ein Heptapeptid mit Disulfid-Brücke führt wie erwartet zu einer Einschränkung des Konformationsraumes. Die gefundenen Familien werden größer. Familie 1 zählt 24, Familie 2 sogar 49 Vertreter. Die Konformation, die dem Toxin am ähnlichsten ist, bildet Familie 6 (RMS-Wert 0,24 Å). Allerdings deutet die hohe Energiedifferenz relativ zu Familie 1 (ΔE 10,1 kcal/mol) auf ein eher seltenes Vorkommen hin.

5.5.4 P5CyCC (Cyclo-CMWPC-NH₂)

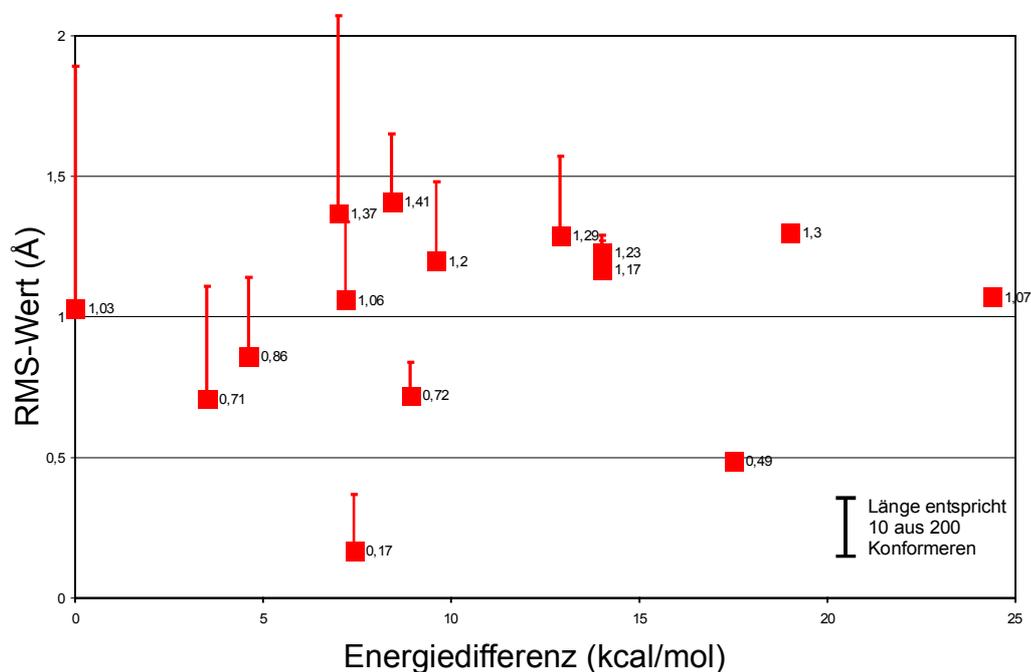


Bild 5.61: Auswertung der Clusteranalyse von P5CyCC

Bei P5CyCC hat sich die Anzahl der Strukturen in Familie 1 deutlich erhöht. Familie 6 (RMS-Wert = 0,17 Å) liegt nur noch 7,4 kcal/mol über der energieärmsten Struktur (F1) und besteht bereits aus zehn Familienmitgliedern.

5.5.5 P6CyCc (Cyclo-CMWPYc-NH₂)

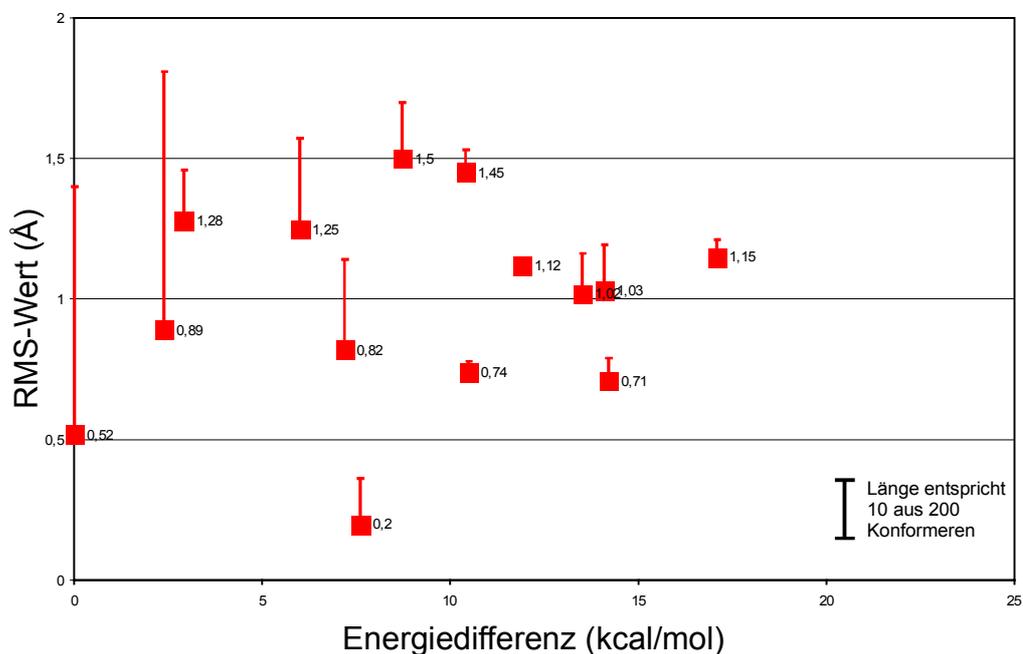


Bild 5.62: Auswertung der Clusteranalyse von P6CyCc

Durch Ersatz des zweiten L-Cysteins gegen ein D-Cystein konnte die Konformation im Vergleich zu P6CyCC deutlich in Richtung Zielstruktur modifiziert werden. Der RMS-Wert von Familie 1 (44 Strukturen) liegt jetzt bei 0,52 Å. Daneben finden sich in Familie 6 (8 Strukturen) Konformere, die fast identisch zum Toxin-Templat sind (RMS = 0,2 Å), jedoch energetisch nicht so günstig wie die Konformation der F1 zu betrachten sind ($\Delta E = 7,6$ kcal/mol).

5.5.6 P5CyCc (Cyclo-CMWPC-NH₂)

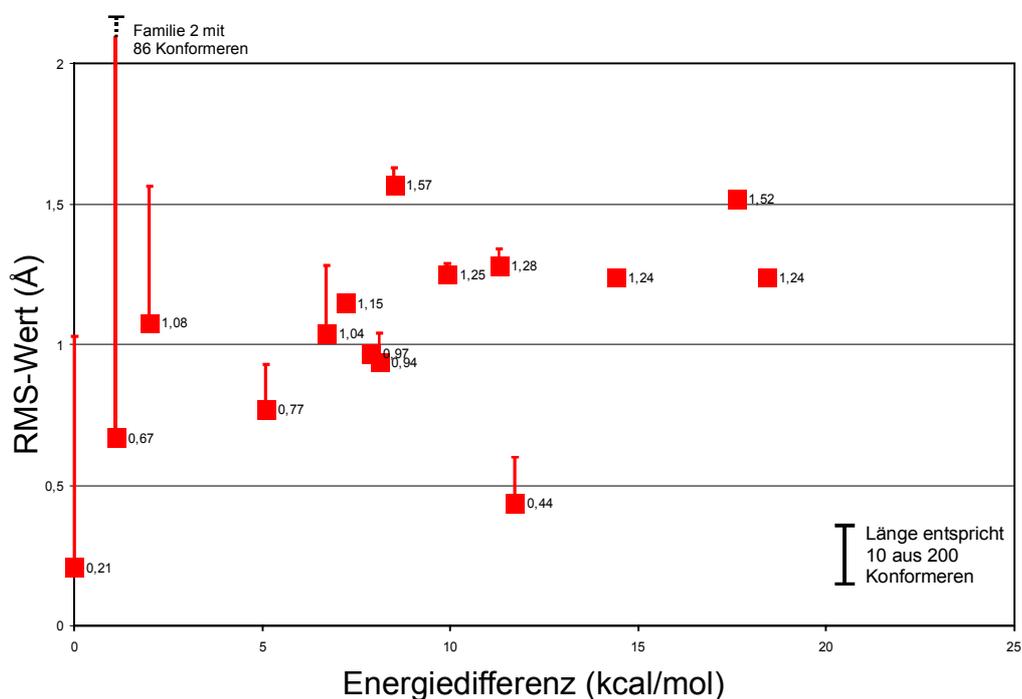


Bild 5.63: Auswertung der Clusteranalyse von P5CyCc

Erst beim cyclischen Pentapeptid P5CyCc (mit D-Cystein) ist die energieärmste Familie (F1 mit 41 Vertretern) der Toxinkonformation am ähnlichsten. Daneben zeigt Familie 2 (86 Vertreter) eine nur sehr geringe Energiedifferenz ($\Delta E = 1,1$ kcal/mol) zu F1.

5.5.7 Vergleich der cyclischen Peptide

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ringgröße bei P12CyCC zu einer Vielzahl von kleinen Konformationsfamilien führt, von denen nur eine der Toxinkonformation ähnlich ist. Das Toxin FS2 benötigt also höchstwahrscheinlich zur Stabilisierung der Turn-Konformation in Loop III die Wechselwirkungen zum angrenzenden Loop II.

Die Verkürzung der Sequenz auf fünf bis sieben Aminosäuren und die Cyclisierung sowohl über Disulfidbrücken als auch über eine peptidische Bindung reduziert die Zahl der relevanten Konformationsfamilien deutlich. Die Anzahl der Konformere einzelner Familien steigt.

Die Cyclisierung über die Peptidbindung im Backbone (P6Cy) führt in der Moleküldynamiksimulation zu einer Familie (F2; RMS-Wert = 0,54 Å), die der Toxinkonformation gut entspricht.

Die beiden Peptide mit ausschließlich L-Aminosäuren zeigen nur mäßige Ähnlichkeit mit der gewünschten Konformation. Dabei generiert das Pentapeptid kleinere RMS-Werte zur Toxin-Referenzstruktur als das Heptapeptid.

Durch Ersatz eines L-Cysteins mit einem D-Cystein in der Disulfidbrücke konnte die Konformation soweit geändert werden, dass die energieärmste Struktur (F1) große Ähnlichkeit mit der Toxin-Referenzstruktur aufweist. Das Pentapeptid zeigt im Vergleich zum Hexapeptid den kleineren RMS-Wert ($\Delta\text{RMS} = 0,31\text{Å}$). Daneben taucht beim Pentapeptid eine zweite energetisch günstige Konformationsfamilie (F2 mit 86 Strukturen) auf, die bei geringfügigem Energieunterschied (1,1 kcal/mol) mehr als doppelt so häufig ist aber eine geringere Ähnlichkeit zur Referenzstruktur (RMS = 0,67) besitzt. Für die Anordnung der pharmakophoren Strukturen ergeben sich allerdings keine großen Unterschiede.

Da das Hexapeptid im Vergleich zum Pentapeptid geringfügig mehr Strukturen in der energetisch günstigsten Konformation besitzt (44 zu 41), wurde es exemplarisch detaillierter mit dem DHP-Pharmakophor verglichen.

5.6 P6CyCc als potenzieller Calciumantagonist

5.6.1 Auswertung der GRID Felder

Zum Vergleich physikochemischer Eigenschaften zwischen den Peptiden und dem DHP-Pharmakophor bietet sich eine Überlagerung über gemeinsame Interaktionsfelder an. In den folgenden Abbildungen (Bild 5.64 bis Bild 5.66) sind Wechselwirkungsfelder des Isradipins als „Wolken“, die Felder des Peptids als Gitternetzlinien zu erkennen.

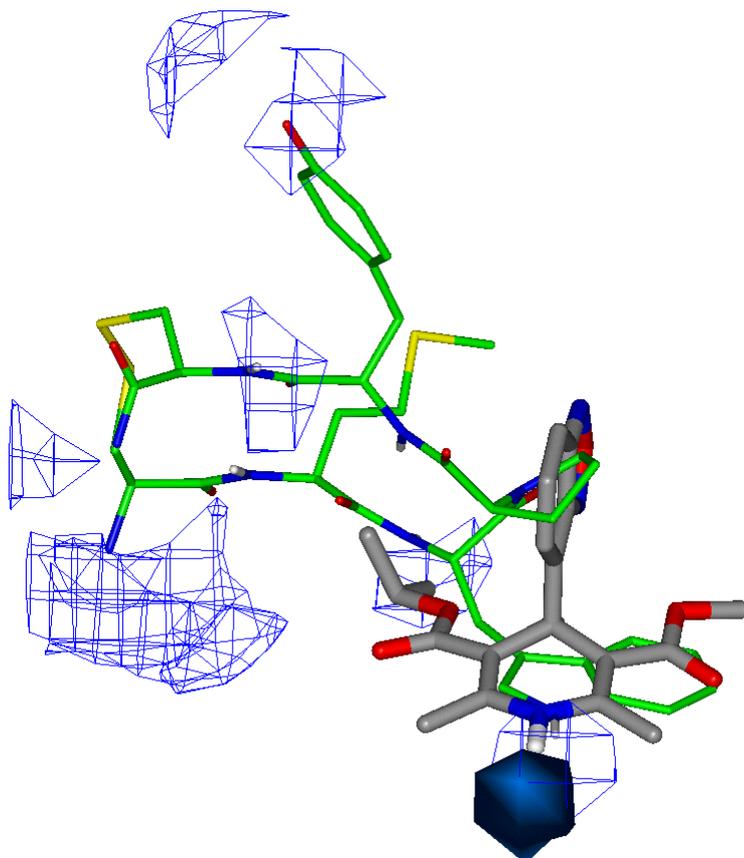


Bild 5.64: Wechselwirkungsfelder mit O-Probe: P6CyCc (Gitterdarstellung); S-Isradipin („Wolke“); Energie-Level bei $-3,0$ kcal/mol

Das mit der O-Probe (Carbonylsauerstoff) dargestellte Wasserstoffbrücken-Donor-Feld des N1-Pyridinstickstoffs entspricht in der Lage und Orientierung dem Feld des Indolstickstoffs. Im Vergleich zum kompletten Toxin FS2 ist das Feld absolut frei zugänglich und wird nicht durch die Seitenketten von Loop II beeinflusst.

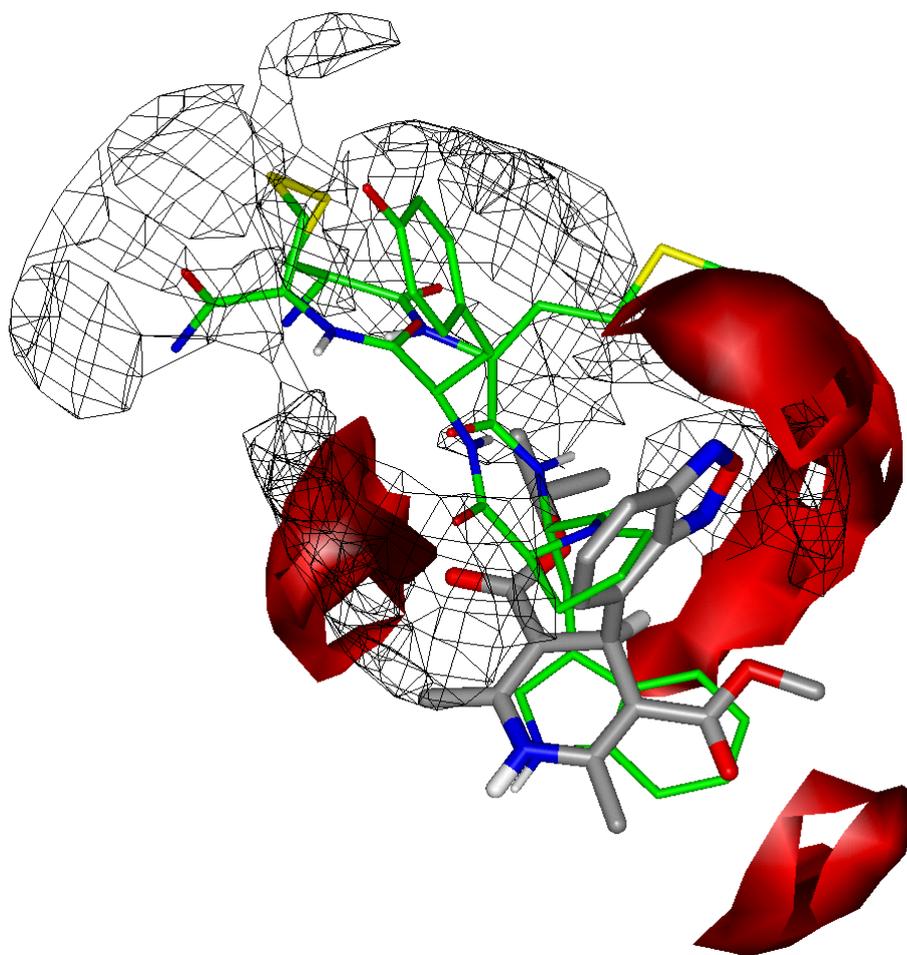


Bild 5.65: Wechselwirkungsfelder mit der N-Probe: P6CyCc (Gitter); S-Isradipin (rotes Feld); Energie-Level bei $-3,5$ kcal/mol

Zwei der drei Felder, die durch die N-Probe (amidische NH-Funktion) beim S-Isradipin detektiert werden, findet man auch beim Hexapeptid P6CyCc. Dabei ist das für die linke Seite des Isradipinesters zuständige Feld in seiner Ausdehnung größer als beim Isradipin. Es wird durch zwei Carbonylfunktionen (Carbonylsauerstoff von Met45 und Pro47) erzeugt. Das dem 4-Aryl-Substituenten entsprechende Feld wird vom Carbonylsauerstoff des Trp46 erzeugt. Es ist etwas kleiner als das Feld des Oxodiazolrings. Dabei ist zu beachten, dass auch DHP-Derivate ohne H-Brücken-Akzeptor-Funktion am 4-Aryl-Substituenten biologisch wirksam sind.

Die fehlende Entsprechung der dritten H-Brücken-Akzeptor-Funktion auf der rechten Seite des Isradipins, die auch bei Toxin FS2 nicht vorhanden ist, könnte für dessen geringere Aktivität verantwortlich sein.

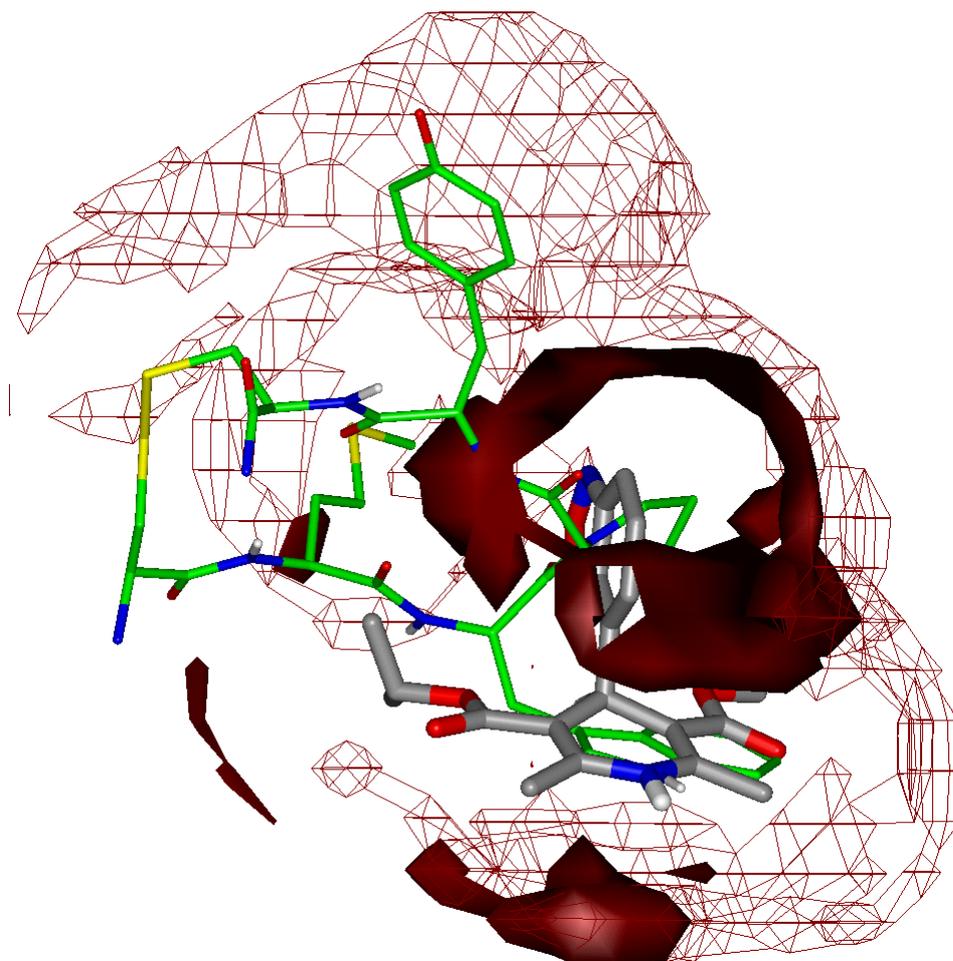


Bild 5.66: Wechselwirkungsfelder mit der DRY-Probe: P6CyCc (Gitter); S-Isradipin (gefüllt); Energie-Level bei $-0,5$ kcal/mol

Die DRY-Probe, die die hydrophoben Wechselwirkungen veranschaulicht, zeigt für das Isradipin drei relevante Felder (Bild 5.66). Das Feld unterhalb des DHP-Rings überlappt mit dem Feld unterhalb des Indolrings. Mit der größeren Fläche des Indolrings wird auch der hydrophobe Wechselwirkungsbereich entsprechend vergrößert. Mit Thiophen anellierte DHP-Derivate zeigen aber, dass eine Vergrößerung des Ringsystems und die daraus folgenden Vergrößerung der hydrophoben Wechselwirkung vom Rezeptor toleriert werden (s. Bild 4.18).

Die Wechselwirkung um den Prolinring entspricht in Form und Gestalt der des 4-Aryl-Substituenten. Lediglich auf der linken Seite ist der Bereich zugunsten des größeren H-Brücken-Akzeptor-Bereichs etwas eingeschränkt.

Ähnliche Wechselwirkungsbereiche findet man für den Isopropylrest und die Seitenkette des Met45. Hierbei spiegelt das statische Gridfeld den unter dynamischen (physiologischen) Bedingungen verfügbaren Wechselwirkungsbereich nicht vollständig wider. Die NMR-Strukturen von Toxin FS2 zeigen, dass sich die Met45-Seitenkette im Toxin frei bewegen kann. Dies sollte auch bei dem kleinen Peptid möglich sein und wird durch die Ergebnisse der MDS gestützt. Dadurch werden diese Regionen noch

ähnlicher, auch wenn die statischen Dimensionen nur einen kleineren Bereich darstellen.

5.6.2 Auswertung des MEP

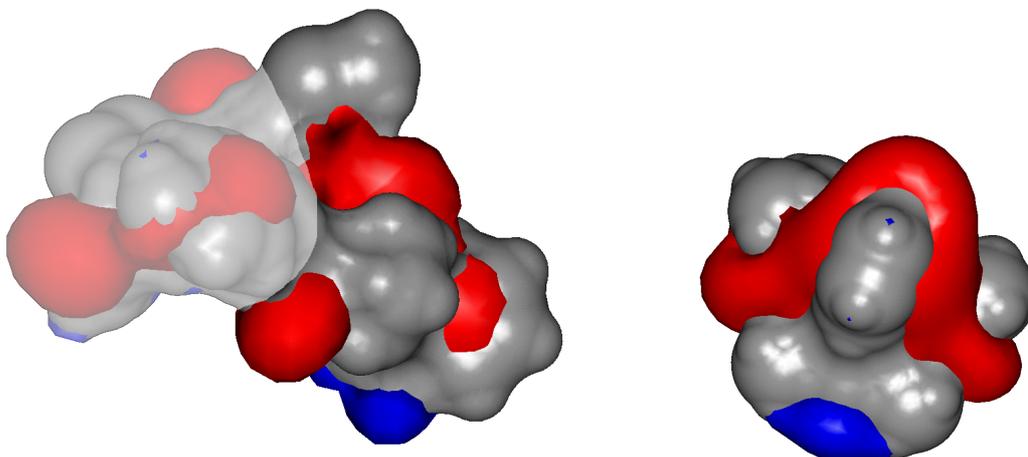


Bild 5.67: MEP-Felder P6CyCc (links) und S-Isradipin (rechts) – der für den direkten Vergleich unwichtige Teil wurde bei P6CyCc ausgeblendet

Die Berechnungen des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP) zeigen noch deutlicher die Ähnlichkeit der beiden Moleküle (vgl. Kapitel 4.2.3.2). Speziell das positive Potenzial (blau) ist bei beiden Molekülen in Lage und Größe äquivalent.

Das negative Potenzial bildet beim Isradipin einen zusammenhängenden Bereich, der sich schlängelförmig vom linken Carbonylsauerstoff des Isopropylesters über den Oxadiazolring bis hin zum rechten Carbonylsauerstoff des Methylesters erstreckt. Beim Hexapeptid liegt das linke negative Potenzial etwas höher und ist nicht mit dem vorderen Potenzial verbunden. Die Abschirmung des negativen MEPs vorne links ist durch die voluminöse Seitenkette des Methionin stärker ausgeprägt als beim Isopropylester.

Die vorderen negativen MEPs entsprechen sich in der Größe. Dagegen ist auf der rechten Seite beim P6CyCc nur ein kleines Feld auf der Oberfläche des Indolringsystems angedeutet.

5.7 Design von Peptiden als potenzielle Calciumagonisten

5.7.1 Cyclo-CQWPYc-NH₂

Calciumagonisten vom DHP-Typ binden am L-Typ-Calciumkanal an derselben Bindungsstelle wie die DHP-artigen Calciumantagonisten. Sie unterscheiden sich, wie Höltje und Marrer schon 1987 postulierten [82], von den Antagonisten wahrscheinlich nur durch die fehlende Abschirmung eines negativen MEPs auf der linken Seite des DHP-Rings. Typisches Beispiel für einen Agonisten ist *S*-BAY K 8644. Ein direkter Vergleich der MEPs von *S*-BAY K 8644 und Isradipin (Bild 5.68) verdeutlicht die qualitativen Unterschiede.

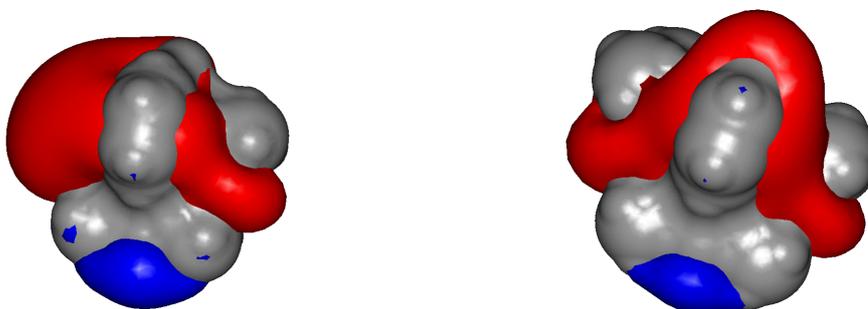


Bild 5.68: Direkter Vergleich der MEPs eines Calciumagonisten (*S*-BAY K 8644 – links) und eines Calciumantagonisten (*S*-Isradipin – rechts), dem das negative MEP auf der linken Seite fehlt

Bei den entwickelten Peptiden wird das negative MEP an dieser Stelle von der Seitenkette des Met45 abgeschirmt. Es bietet sich nun an, diese Aminosäure durch eine andere mit stark negativem molekularem elektrostatischen Potenzial zu ersetzen. Hierfür kommen besonders Gln oder Glu in Frage, da sie eine ähnliche räumliche Ausdehnung wie Met haben. Glu würde jedoch eine negative Ladung einführen und so wahrscheinlich die Aktivität deutlich verringern und die Erreichbarkeit der Bindungsstelle verschlechtern. Zwei DHP-Derivate mit einer freien Säurefunktion zeigten in einer Untersuchung von Zheng einen 1000-fach schlechteren EC₅₀-Wert als die entsprechenden Methylester-Derivate [110]. In Untersuchungen an permanent positiv geladenen Dihydropyridinen wird gezeigt, dass diese Derivate die Bindungsstelle nicht erreichen, bzw. nur dann, wenn die Ladung sich an einer längeren Seitenkette befindet [86]. Es bietet sich daher der Ersatz von Met durch Gln an. Die Strukturüberlagerung des entsprechenden Cyclo-CQWPYc-NH₂ (P6CyCc(Gln)) mit *S*-BAY K 8644 wird in Bild 5.69 gezeigt.

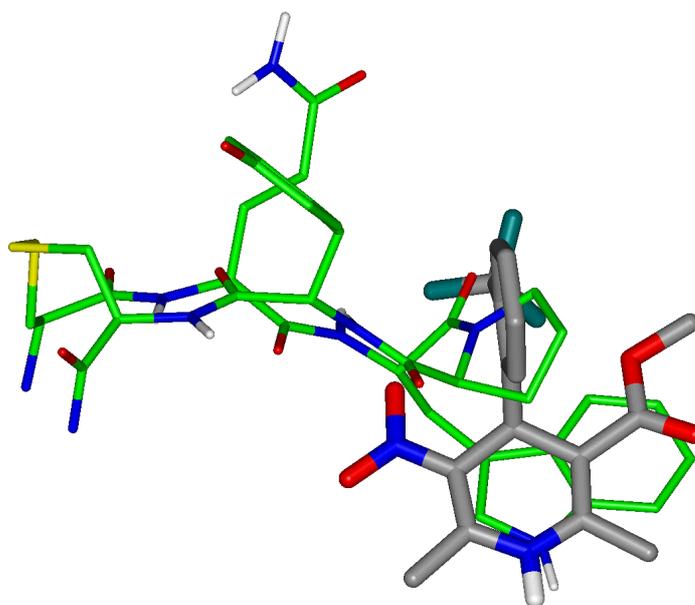


Bild 5.69: Überlagerung von P6CyCc(Gln) und S-BAY K 8644

Den Vergleich der berechneten MEPs zeigt Bild 5.70. Das negative MEP für die Nitro-Gruppe des BAY K 8644 entspricht dem Potenzial, das durch den Sauerstoff im Gln erzeugt wird (Pfeil). Durch die Flexibilität der Seitenkette ist außerdem anzunehmen, dass die real-existierende Ähnlichkeit noch größer ist als es bei der Betrachtung nur einer Konformation zu erkennen ist.

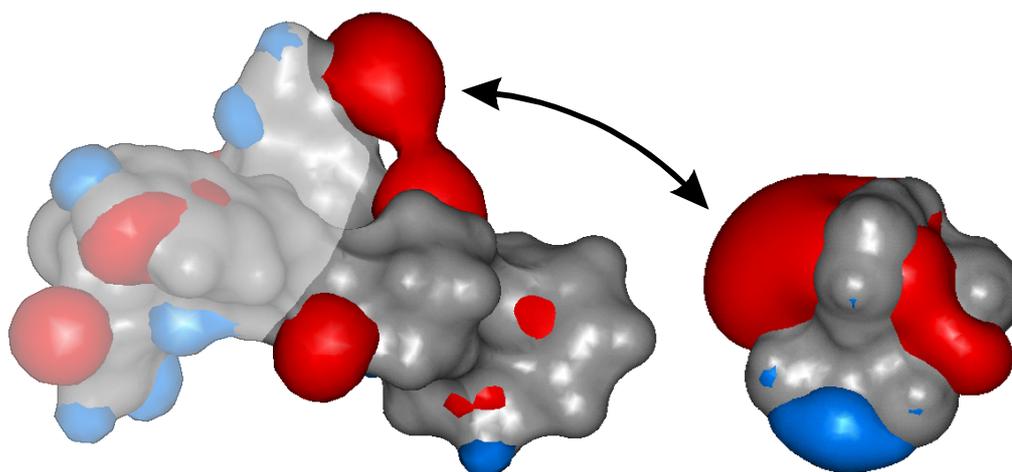


Bild 5.70: MEP von P6CyCc(Gln) (links) und S-BAY K 8644 (rechts) – der für den direkten Vergleich unwichtige Teil wurde bei P6CyCc(Gln) ausgeblendet

Die Wechselwirkung der Dihydropyridine an ihrer Bindungsstelle lässt sich in zwei Teilbereiche trennen. Eine Komponente ist für die Affinität (Wirkquantität) verantwortlich, die andere für die Aktivität (Wirkqualität). Letztere wird durch das Fehlen der

hydrophoben Wechselwirkung (und der daraus resultierenden elektrostatischen Abschirmung) vorne links verändert. Aus dem Calciumantagonisten wird ein Calciumagonist. Die Met2Gln Substitution soll bei dem neu entwickelten Peptid genau diese Veränderung der Wirkqualität simulieren.

Entsprechende Berechnungen (nicht abgebildet) der Grid-Felder, die für die Affinität zum Rezeptor verantwortlich sind, zeigen keine Unterschiede zu den Wechselwirkungsfeldern in Kapitel 5.6.

5.8 Möglichkeiten zur experimentellen Bestätigung des Modells

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde eine Serie von kleinen Peptiden mit potenziell Calciumkanal-modulatorischen Eigenschaften vorgeschlagen und auf molekularer Ebene charakterisiert. Molecular Modelling Arbeiten basieren im Allgemeinen auf experimentellen Daten, die zur Entwicklung eines theoretischen Modells verwendet werden, das die experimentellen Ergebnisse möglichst vollständig erklärt. Im günstigsten Fall sollte dieses Modell (diese Theorie) auf einen neuen Sachverhalt hinweisen oder sogar Vorhersagen für zukünftige Experimente liefern.

Im Folgenden sollen die Strategie und der eingeschlagene Weg zur experimentellen Bestätigung des Modells aufgezeigt werden.

5.8.1 Synthese der Peptide

Einige der untersuchten Peptide sollten in Kooperation mit Dr. Hoffmann vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ, Universität Düsseldorf) hergestellt werden. Ausgewählt wurden P6Li, P6Cy, P12CyCC, P6CyCc, P5CyCc und L-Calchin.

Das Synthetisieren einer linearen Peptidsequenz ist normalerweise unproblematisch. Die Synthese erfolgt an der Festphase z.B. mit einem Peptidsyntheseautomaten (SyroII der Firma Multisynthtech Witten). Mit diesem Gerät lassen sich bis zu 48 Peptide im 20 µmol Maßstab herstellen. Wie erwartet konnten P6Li und L-Calchin in der für die Testung (vgl. Kapitel 5.8.2) benötigten Menge (5 µmol) zügig hergestellt werden.

Die Backbone-Cyclisierung von P6Cy gelang jedoch trotz mehrerer Versuche nur in analytischen Mengen. Für die Cyclisierung über Cystinbrücken (P6CyCc und P5CyCc) wurden die Ansatzmengen verdreifacht. Die angestrebte Ausbeute (5 µmol) konnte nur knapp erreicht werden. Die benötigte Menge an P5CyCc wurde nur als Summe drei aufeinander folgender Synthesen erreicht. Die Hauptnebenprodukte waren vermutlich längerkettige Polymerisate der Sequenzen, die sich aber gut abtrennen ließen.

Die Reinheit der Syntheseprodukte wurde durch eine RP-HPLC gewährleistet. Die Synthese-Endprodukte wurden abschließend noch mit MALDI-Massenspektroskopie (matrix-assisted laser desorption ionization) auf Identität und Reinheit überprüft.

Zum Transport wurden die Peptide aus der sauren HPLC-Lösung (TFA – pH 2) gefriergetrocknet und dann zur Testung nach Innsbruck weitergeleitet. Aufgrund der geringen Mengen konnten jedoch keine zusätzlichen Untersuchungen über die Löslichkeit bei pH 7 (physiologische Bedingungen) gemacht werden.

5.8.2 Testung an Froscheizellen

Die Arbeitsgruppe von Prof. Hering am Institut für Biochemische Pharmakologie (Innsbruck, Österreich, Leiter: Prof. Glossmann) ist eine erfahrene und weltweit anerkannte Gruppe auf dem Gebiet der Elektrophysiologie. Sie beschäftigt sich u. a. mit der strukturellen Charakterisierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle, im Besonderen des L-Typ-Calciumkanals. Hierfür werden biochemische, molekularbiologische und elektrophysiologische Untersuchungsmethoden eingesetzt. Besonders hervorzuheben ist die funktionelle Expression von Calciumkanaluntereinheiten aus Säugetierzellen in *Saccharomyces cerevisiae* und in *Xenopus laevis* Oocyten.

Die Froscheizellen von *Xenopus laevis* eignen sich besonders für die Expression und Untersuchung der Calciumkanäle. Sie besitzen im natürlichen Zustand keine Calciumkanäle und sind mit einem Durchmesser von etwa 1 mm leicht zu handhaben [111]. Die Arbeitsgruppe in Innsbruck konnte mit den *Xenopus* Oocyten eine Microperfusions-Methode etablieren, bei der sehr geringe Lösungsmittel- und damit verbunden auch Substanzmengen elektrophysiologisch vermessen werden können. Es reichen etwa 50 µl bis 100 µl für eine Applikation aus. Die einzelnen Oocyten können für eine Vielzahl von Messungen verwendet werden, wodurch individuelle Unterschiede von Eizellen keinen Einfluss auf das Ergebnis haben [112].

Die synthetisierten Peptide wurden an einem exprimierten L-Typ-Calciumkanal im Konzentrationsbereich von 1-100 µM getestet. In diesem Modellsystem konnte keine Hemmung des Calciumeinstroms im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Tabelle 5.5). Allerdings wird auch für L-Calchin (in der Literatur [113, 102] ist eine etwa 50%ige Hemmung des Calciumionenflusses bei einer Konzentration von 100 µM beschrieben) keine Wirkung beobachtet.

Zum Vergleich: Nach de Weille et al. [48] liegt in A7r5-Zellen die Hemmung des Calciumflusses von Toxin FS2 bei 0,430 µM (IC₅₀) und ist damit vergleichbar mit der Hemmung von Calciseptin [49].

Über die Gründe für die Unwirksamkeit des L-Calchins kann nur spekuliert werden. Der wahrscheinlichste Grund liegt in einer mangelnden Sensitivität der in Oocyten exprimierten Kanäle gegenüber peptidischen Calciumkanalblockern.

Auch eine Beeinflussung der Oocyten durch den sauren pH-Wert der Peptid-Lösung lässt sich nicht ausschließen. Der pH-Wert von 2 war jedoch notwendig, da keine Aussagen über die Löslichkeit der cyclischen Peptide in wässrigen Lösungen bei pH 7 gemacht werden konnten und die Peptide aus saurer Lösung gefriergetrocknet wurden.

Eine andere Problematik ist die Lipophilie der Peptide. Dr. Hoffmann vermutet, dass sich die Peptide auf den lipophilen Gefäßwänden der Kunststoff-Eppendorf-Gefäße oder der Teflon-Messapparatur verteilen könnten und damit die effektive Konzentration der Testlösung geringer als berechnet wäre. Aufgrund der geringen Substanzmengen konnte jedoch nicht mit höheren Konzentrationen als 100 μM gearbeitet werden.

Tabelle 5.5: Ergebnisse der pharmakologischen Tests

Peptid	Synthese (Dr. Hoffmann)	Ausbeute (mg)	Ausbeute (μmol)	Testung (Literatur)	Testung (Dr. Hering)
FS2				✓	
P6Li	✓	5,2	6,55		-
P6Cy	-	-	-		-
P12CyCC	✓	7,7	5,40		-
P6CyCc	✓	3,7	4,63		-
P5CyCc	✓	2,1	3,30		-
L-Calchin	✓	5,8	6,88	✓	-

In weiteren pharmakologischen Untersuchung (Prof. Hering) soll die Aktivität der Peptide an sensitiveren L-Typ-Calciumkanälen in Zellen des Myocards überprüft werden. Diese Zellen entsprechen eher den Zellen von Kini et al. [102] an denen die Wirkung von L-Calchin nachgewiesen wurde.

5.8.3 NMR-Spektroskopische Untersuchung der Peptide

Ein anderer wichtiger Aspekt zur experimentellen Überprüfung des beschriebenen Modells ist die tatsächlich vorliegende Konformation der Peptide in Lösung. Durch Moleküldynamiksimulationen lässt sich nur eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Existenz einer bestimmten Konformation treffen. Bei der Cyclisierung während der Synthese hängt die endgültige Konformation entscheidend von den Reaktionsbedingungen ab. Nach erfolgtem Ringschluss kann die für die Wirkung essentielle bioaktive Konformation eventuell für das Ringsystem nicht mehr erreichbar sein. Die notwendige Aktivierungsenergie könnte so hoch liegen, dass bei Raumtemperatur keine Umwandlung zwischen verschiedenen Konformationen stattfindet.

Zur Überprüfung der Konformation bietet sich die Kernresonanzspektroskopie an, die Konformationen (sofern sie genügend stabil vorliegen) in Lösung beobachten kann. Da für die elektrophysiologischen Untersuchungen die Peptide jedoch vollständig gelöst wurden, konnten in dieser Syntheserieihe keine NMR-Messungen mehr vorgenommen

werden, obwohl sich Frau Dr. C. Mrestani-Klaus (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie), eine ausgewiesene Expertin auf diesem Gebiet, zur Mitarbeit bereit erklärt hatte.

6 Diskussion

6.1 Vorbemerkung

Mit Methoden des Molecular Modellings sollten im Rahmen dieser Arbeit kleine peptidische Liganden mit Calciumkanal-modulatorischer Aktivität entwickelt und untersucht werden. Quasi als Schablone könnten sie die Suche nach endogenen Liganden des DHP-Rezeptors erleichtern oder die Entwicklung neuer nichtpeptidischer und nicht auf DHP basierender Leitstrukturen ermöglichen.

Die größte Schwierigkeit bei der Entwicklung neuer Liganden liegt darin, dass bis heute die dreidimensionale Struktur des Calciumkanals nicht aufgeklärt wurde. Dadurch verschließt sich uns die Einsicht über spezifische Ligand/Rezeptor Wechselwirkungen und ein direkter Ansatz zum Beispiel über Docking-Methoden scheidet aus. Für einen indirekten Ansatz lässt sich aber durch die zahlreichen bekannten Dihydropyridine ein detailliertes Pharmakophor-Modell als Grundlage für die Wechselwirkungen an der Bindungsstelle nutzen.

Die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren stehen im Körper als begrenzter Bausatz für peptidische Liganden zur Verfügung. Trotzdem zeigt unsere gesamte biologische Vielfalt, welche universellen Möglichkeiten in diesem Bausatz stecken. Das bezieht sich auch auf den Konformationsraum von linearen Peptiden.

Für Molecular Modelling Untersuchungen ergeben sich aber gerade aus der hohen konformativen Flexibilität Schwierigkeiten, die tatsächlich vorliegende Konformation einer bestimmten Peptidsequenz vorherzusagen. Die Grenze für die zuverlässige Berechnung des globalen Minimums im Kraftfeld liegt bei der heutigen Rechnerkapazität trotz neuer Rechenalgorithmen bei etwa fünf bis sechs Aminosäuren [96, 94, 95]. Durch die Bildung eines Zyklus besitzen die in dieser Arbeit betrachteten Peptide zwar eine geringere Anzahl von Konformationen, andererseits werden dadurch aber auch die Möglichkeiten zur Konformationsanalyse eingeschränkt.

6.2 Strukturuntersuchung der cyclischen Peptide

Für die Simulation und Strukturvorhersage cyclischer Peptide sind Berechnungen im Vakuum mit den heutigen Kraftfeldern nicht geeignet. Elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls werden vom Kraftfeld so stark überbewertet, dass meistens globuläre Peptidkonformationen resultieren, die nicht mehr der experimentell bestimmten Konformation entsprechen. Fehlen die intermolekularen Wechselwirkungen mit dem Solvens (z. B. Wasser), fallen die Peptide regelrecht zusammen („kollabieren“). Als Ausweg aus dem Dilemma gibt es neben einem experimentell-basierten Ansatz zwei theoretische Vorgehensweisen.

Im experimentell-basierten Ansatz werden „Constraints“ (Beschränkungen) in die Simulation eingeführt, die aber nur durch Synthese geeigneter Peptide mit anschließender NMR-Aufklärung gewonnen werden können.

Bei der einfacheren theoretischen Vorgehensweise werden die Wechselwirkungen der interagierenden Aminosäuren durch Änderung von Parametern verringert. Das hat aber den Nachteil, dass auch eventuell auftretende günstige, weil stabilisierende Interaktionen nicht richtig wiedergegeben werden. Außerdem sollte man für die Evaluierung auf eine Vielzahl von experimentellen Daten zurückgreifen können, um die Skalierung der Abschwächung optimieren zu können.

Die zweite Vorgehensweise, um realistischere Strukturen zu erhalten, bezieht den Einfluss des Lösungsmittels ein. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Simulation in Wasser lässt das Peptid durch Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel soviel Stabilität gewinnen, dass die globuläre Konformation nicht mehr bevorzugt wird. Diese Art der Simulation kommt der Realität auch wesentlich näher. Nachteilig ist der hohe, zusätzliche Rechenbedarf durch die Wassermoleküle.

Da die Vergleichsstruktur (Toxin FS2) kernresonanzspektroskopisch in D₂O aufgeklärt wurde, scheint es legitim, auch die kleinen Peptide in einer Wasserumgebung zu simulieren, solange keine weiteren Informationen über die genaue Umgebung in der Bindungsstelle bekannt sind.

Bei NMR-Messungen an cyclischen Peptiden in Wasser stellt man häufig fest, dass nicht nur eine einzige Konformation bevorzugt eingenommen wird. Oft liegen zwei, drei oder mehr stabile Konformationen nebeneinander vor. Experimentell misst man dann verschiedene Resonanzspektren unterschiedlicher Intensität, die sich nicht in einer Struktur vereinen lassen. Aus den Intensitäten lässt sich die Population der einzelnen Konformationen berechnen [66].

Eigentlich sollte die simulierte Population (=Häufigkeit des Auftretens einer Konformation in einem Konformerengemisch) nur vom Energiegehalt dieser Konformation abhängen. Da jedoch die Energieberechnung in Vakuum die vielen Interaktionen mit den Lösungsmittelmolekülen vernachlässigt und da andererseits die Energieberechnung im Lösungsmittel sich rechentechnisch nur auf das gesamte System (inkl. aller LM-Moleküle) durchführen lässt, wurde die Auswahl einer bevorzugten Konformation nicht mehr ausschließlich über das Energiekriterium getroffen. Die Populationsgröße wurde direkt durch die Anzahl der Vertreter in einer Familie berücksichtigt.

Das Ensemble der Toxin FS2 Strukturen, das mit Constraints aus den NMR-Messungen gewonnen wurde, zeigt eine einheitlich stabile Konformation von Loop III, die vermutlich auf die H-Brücken zu Loop II zurückzuführen ist.

Die Simulation des isolierten, nicht stabilisierten Loop III (vgl. Kapitel 5.5.2) zeigt ein anderes Bild. Hier entstehen viele kleine Konformationsfamilien mit geringen Energieunterschieden. Selbst bei der Simulation der rigidesten cyclischen Pentapeptide tauchen noch mehrere Konformationsfamilien auf.

Bei der Bindung an einen Rezeptor kann man zusätzlich noch von einem „induced fit“ ausgehen. Der Begriff beschreibt die gegenseitige Anpassung des Liganden und des Rezeptors beim Andocken. Aus entropischen Gründen ist die Bindungsaffinität umso größer, je mehr die vorgeformte Konformation des Liganden seiner Bindungskonformation ähnelt.

Da alle cyclischen Peptide mit derselben Methode bearbeitet worden sind, ist davon auszugehen, dass die vergleichenden Analysen eine Aussage über die Bevorzugung einer Konformation zulassen.

6.3 Strukturvorschlag peptidischer Calciumantagonisten

Nachdem eine Methode zur strukturellen Untersuchung cyclischer Peptide entwickelt und angewendet worden ist, konnte der Vergleich zur Spitze des dritten Loops von Toxin FS2 durchgeführt werden. Dabei wurden die Ergebnisse der parallel laufenden Synthesen mit berücksichtigt. P6Cy (das über das Backbone cyclisierte Hexapeptid) wurde im Laufe der Untersuchungen ausgeschlossen, da es sich mit den Methoden unserer Kooperationspartner als präparativ nicht darstellbar erwies.

Für den weiteren Vergleich kommen besonders P6CyCc und P5CyCc in Frage. Da die energiegünstigste Familie des Hexapeptids etwas größer als beim Pentapeptid ist und letzteres eine besonders große dem Toxin weniger ähnliche Konformationsfamilie (F2) besitzt, wurde der Vergleich zum Dihydropyridin-Pharmakophor mit P6CyCc durchgeführt. Außerdem bereitete das Pentapeptid extreme Schwierigkeiten bei der Synthese (Cyclisierung).

Aus der Aminosäure-Zusammensetzung und den Erfahrungen der Synthese lässt sich ableiten, dass es sich bei dem Peptid P6CyCc um eine für kleine Peptide sehr lipophile Substanz handelt. Diese Eigenschaft passt gut zu den meisten starkwirksamen Dihydropyridinen. Durch Experimente mit Dihydropyridinen, die eine geladene Seitenkette besitzen, vermuten Baidur et al. [87, 86] die DHP-Bindungsstelle 11-14 Å vom äußeren Rand der Zellmembran in einem hydrophoben Bereich. Diese wird auch durch aktuelle Untersuchungen von Triggle et al. unterstützt [107, 108]. Das Peptid sollte durch Abstreifen des Protons vom N-terminalen Ende diesen Bereich dann erreichen können.

Eine wichtige Frage ist die Abschätzung der Wirkstärke für das neu entwickelte Peptid. Da im ersten Testsystem für keines der Peptide eine Aktivität gemessen werden konnte und die Ergebnisse des zweiten, sensibleren Tests noch ausstehen, muss auf die pharmakologischen Daten von Toxin FS2/Calciseptin, L-Calchin und der zwei bekannten Calciumkanal-modulatorischen Peptide zurückgegriffen werden.

FS2 und Calciseptin unterscheiden sich nur durch zwei Aminosäuren (vgl. 2.7.3.2). Ihre Wirkstärke kann also als äquivalent betrachtet werden. Die Konzentration von Calciseptin in A7r5-Zellen für eine 50-prozentige Reduktion des Calciumflusses liegt bei 0,43 µM [48].

L-Calchin als lineares Peptid besitzt eine etwa 230fach geringere Wirkung [113]. Damit ergibt sich ein theoretischer IC_{50} -Wert von $100 \mu\text{M}$. Für RGD-Peptide konnten Aumailley et al. durch Cyclisierung linearer Peptide eine Wirkungsverstärkung um den Faktor 20 bis 100 erreichen [97]. Gilt dieser Zusammenhang auch für die Calciumkanal-modulatorischen Peptide, sollte man IC_{50} -Werte im Bereich von $1\text{-}5 \mu\text{M}$ erwarten, also fast in der Größenordnung des FS2/Calciseptin Toxins.

Rovnyak misst für das DHP-Derivat Nifedipin an Ratten-Aorta einen IC_{50} -Wert von etwa 19 nM [83]. Der IC_{50} -Wert von *S*-Isradipin ist noch kleiner. Nachdem für calcium-antagonistische Peptide bis heute kein IC_{50} -Wert in dieser Größenordnung bekannt geworden ist, errechnet sich aus obiger Schätzung, daß die Peptide etwa um den Faktor 50 bis 100 schlechter wirken sollten als die zugelassenen Dihydropyridine.

6.4 Struktur endogener peptidischer Calciumagonisten?

Für den in Kapitel 2.7.3.1 erwähnten „endogenen Faktor“ wurde eine calciumagonistische Wirkung an Aorten-Ring-Muskulatur bei Konzentrationen von $1\text{-}10 \text{ nM}$ gemessen [43, 44]. Entsprechende Werte für BAY K 8644 liegen nach Rovnyak bei 46 nM [83]. Diese Werte zeigen, dass es auch potente Peptide mit Wirkkonzentrationen im nanomolaren Bereich gibt.

Strukturell lässt sich der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene peptidische Calciumagonist folgendermaßen beschreiben. Er besitzt (durch Trp) eine Wasserstoff-Donor-Funktion und zwei relevante Wasserstoff-Akzeptor-Funktionen (durch die Backbone-Carbonylfunktionen Ala44/Met45 und die Backbone-Carbonylfunktion von Trp45). Räumlich fixiert werden diese Funktionen durch einen stabilen βVIa -Turn, der die richtige Orientierung (ausgestreckt) der Seitenketten gewährleistet. Die endständige Amidfunktion (CO) des Gln produziert das für den agonistischen Effekt notwendige MEP.

Vergleicht man, was über die beiden strukturell nicht aufgeklärten Peptide („hypertensiver Faktor“ und „endogenes Peptid“ – vgl. Kapitel 2.7.3.1) bekannt ist, so resultiert ein recht einheitliches Bild.

In beiden Peptiden kommen sowohl Asp/Asn als auch Glu/Gln vor. Die Unterscheidung zwischen dem Amid und der freien Säure ist häufig nicht ganz einfach, da bei der Peptid-Analyse die Amide hydrolysiert werden. Unabhängig davon deuten diese Aminosäuren darauf hin, dass ein starkes negatives MEP für die calciumagonistische Wirkung benötigt wird. Im Modellpeptid P6CyCc-Gln wurde deshalb Gln (ähnliche Kettenlänge wie Met) eingesetzt.

Daneben fällt auf, dass in einem Peptid ein Ser und im anderen ein Thr vorhanden ist. Beide Aminosäuren besitzen eine Hydroxylgruppe in der Seitenkette, die sowohl Wasserstoff-Akzeptor als auch – besonders wichtig – Wasserstoff-Donorfunktion übernehmen kann. Wenn man davon ausgeht, dass für die gute Bindung eine Wasserstoff-Donor-Funktion in einer Peptidseitenkette nötig ist (NH-Funktion in den DHP und im

Modellpeptid durch die NH-Funktion im Indolring), dann können sowohl Ser als auch Thr diese Funktion zur Verfügung stellen.

Glycin ist in beiden Peptiden vorhanden. Im hypertensiven Faktor kommen mit hoher Wahrscheinlichkeit sogar vier Glycine vor. Aus dem Molekulargewicht von etwa 700-800 Dalton kann man von 8 bis 9 AS ausgehen. Die große Anzahl an Glycinen deutet stark auf eine Turnstruktur hin, da Gly in vielen Turns (Typ II-, Typ II'- und Typ I'-Turn) eine wichtige Rolle spielt. Vielleicht kann man sogar auf den Typ I' spekulieren, der besonders häufig mit zwei aufeinanderfolgenden Gly (vgl. Kapitel 3.6.3.2) gebildet wird.

Die beiden Wasserstoff-Akzeptor-Funktionen können auch in einem anderen β -Turn von den Backbone-Carbonylfunktionen simuliert werden.

Es lassen sich also alle relevanten Funktionen für die Bindung an den DHP-Rezeptor in den Sequenzen der beiden endogenen Peptide finden. Trotzdem wäre es spekulativ, aus der Zusammensetzung der Aminosäuren auf die exakte Sequenz und die dazugehörige Struktur schließen zu wollen.

6.5 Ausblick

Da Molecular Modelling Untersuchungen immer nur theoretische Modelle generieren können, werden entsprechende Ergebnisse häufig als Theorie ohne praktische Bedeutung verstanden. Um diesem „Schicksal“ zu entgehen, wurden schon in einer frühen Phase der Arbeit zwei Kooperationen zur experimentellen Überprüfung der theoretischen Ergebnisse eingegangen.

Bei der Synthese zeigte sich, dass Backbone-Cyclisierungen mit kurzen Peptiden wie bei P6Cy sehr schwierig sind. Auch bei den Cyclisierungen über Disulfidbrücken konnte beobachtet werden, dass Peptide mit kurzer Kettenlänge (5 und 6 AS) sich schlechter und mit wesentlich geringerer Ausbeute cyclisieren lassen als längere Peptide (12 AS). Die resultierenden cyclischen Peptide erwiesen sich als sehr lipophil.

Bei der elektrophysiologischen Testung trat dann die Schwierigkeit auf, dass die Sensibilität des verwendeten Testsystems auch für das nachweislich wirksame lineare Referenzpeptid (L-Calchin) nicht ausreichte. Die Testergebnisse für ein sensibleres Testsystem stehen noch aus.

Falls sich experimentell bestätigen lässt, dass eines der Peptide mit β VIA-Turn-Struktur an der DHP-Bindungsstelle angreift, so ergeben sich für die Forscher am L-Typ-Calciumkanal und die medizinischen Chemiker drei unterschiedliche, gleichermaßen interessante Perspektiven.

6.5.1 Suche nach endogenen Liganden

Die „Kanalforscher“ könnten die Suche nach den endogenen Liganden noch einmal intensivieren. Dabei wäre es neben der Suche in Zellextrakten nach kleineren

Peptiden/Bestandteilen auch interessant, die Sequenz des Calciumkanals mit den entsprechenden Untereinheiten (β , $\alpha_2\delta$ oder γ) auf Turn-enthaltende Loops oder kurze Sequenzabschnitte zu untersuchen.

Für den Ryanodin-Rezeptor (intrazellulärer Calciumkanal im sarkoplasmatischen Retikulum) ist beispielsweise ein Peptidloop bekannt, der direkt in die Regulation dieses Kanals eingreift und Calciumfreisetzung auslöst. Dieser Loop liegt auf der α_1 -Untereinheit des DHP-Rezeptors (L-Typ-Calciumkanal) zwischen Repeat II und III. Die Sequenz konnte von anfänglich 20 Aminosäuren (als Peptid A bezeichnet) auf die 10 C-terminalen Aminosäuren reduziert werden [114]. Am selben Peptid konnten Casarotto et al. durch Modifikationen zeigen, dass synthetische Peptide mit geordneter Sekundärstruktur stärker wirken als solche, die eher eine ungeordnete „random coil“ Konformation einnehmen [115].

6.5.2 Ersatz der DHP durch andere β -Turn-Mimetika

Ein zweiter Aspekt betrifft den Ersatz der Dihydropyridine als Calciumantagonisten. Simulierten sie nur einen β_{VIa} -Turn, so ließen sie sich leicht ersetzen. Prinzipiell könnten entsprechende Peptide direkt als Arzneistoffe eingesetzt werden. Die Applikation erfordert aber einen Zugang zum Wirkort ohne enzymatischen Abbau. Die meisten Peptide werden daher parenteral appliziert. Um diesen unangenehmen Zugang für die Dauertherapie zu umgehen, werden z.B. für Insulin die nasale Applikation oder die inhalative Therapie erprobt [116, 117]. Ein entsprechender Einsatz eines Peptidnasensprays anstelle der heute gebräuchlichen Dihydropyridintabletten könnte man sich noch vorstellen, eine Therapie, bei der häufig injiziert werden muss, wird sicher keine Akzeptanz finden.

Interessanter ist jedoch der Einsatz anderer β -Turn-Mimetika anstelle der Dihydropyridine. So werden z.B. Lactame, bicyclische Thiazolidine, bicyclische Spiroverbindungen und auch pharmazeutisch so bekannte Strukturen wie Benzodiazepine [118, 119] als Peptidomimetika verwendet. Eine Übersicht wird von Hruby und Balse in [120] und den darin referierten Übersichtsartikeln gegeben. Gerade die bekannteren Strukturen besitzen den Vorteil, dass schon viele Informationen über Synthese und Toxikologie existieren, die genutzt werden können. Mit neuen Substituenten könnten so attraktive Calciumantagonisten entstehen. Aber auch bisher unbekannte Turnmimetika sind interessant, da sie noch nicht patentiert sind.

6.5.3 Dihydropyridine als β -Turn-Mimetika

Der dritte Aspekt betrifft die Möglichkeit, dass man auch die Dihydropyridine anstelle anderer β -Turn-Mimetika einsetzen könnte. Ripka et al. stellen in [118] die Klasse der Benzodiazepine als allgemeines β -Turn-Mimetikum dar. Für Benzodiazepin-Analoga wurden neben der anxiolytischen Aktivität noch Wirkung im Bereich der Analgesie, der Phospholipase A₂ Hemmung, des Cholecystinin (CCK) Antagonismus, der Plättchenaktivierender Faktor (PAF) Antagonisten, der Cholesterin-reduzierenden Aktivität, der

antifungalen, antitumoralen, antibiotischen, antihypertensiven und anti-HIV Aktivität beobachtet. Könnte die β -Turn imitierende Fähigkeit der Dihydropyridine festgestellt werden, ergäbe sich eine Vielzahl neuer Indikationsgebiete. Die Vorteile liegen in der einfachen Synthese und in den bekannten pharmakologischen Daten.

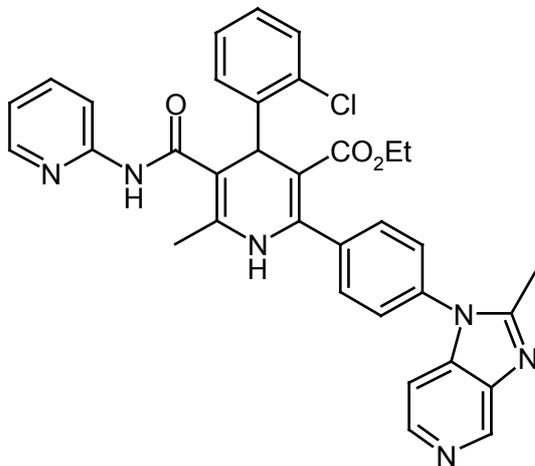


Bild 6.71: UK-74,505 – ein potenter PAF-Antagonist von DHP-Typ

Auf dem Gebiet des Plättchen-aktivierenden Faktors wurde 1992 von Cooper et al. [121] eine Serie von Dihydropyridinen synthetisiert. Das UK-74,505 stellte sich als stärkster Vertreter der Serie und sehr potenter PAF-Antagonist heraus.

Auch eine Reihe selektiver und potenter Adenosin-A₃-Rezeptor-Antagonisten vom DHP-Typ konnten in den letzten Jahren entwickelt werden [122, 123]. Dabei wurde besonderer Wert darauf gelegt, dass die Dihydropyridine an den Adenosin Rezeptor binden ohne eine gleichzeitige Bindungsfähigkeit am L-Typ Calciumkanal zu besitzen.

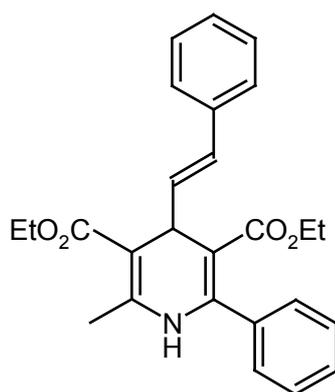


Bild 6.72: MRS 1097 – ein potenter Adenosin-A₃-Rezeptor-Antagonist von DHP-Typ

Zur Wirkung der Dihydropyridine sei noch erwähnt, dass bereits 1943 ein Patent an die Firma Wellcome für 4-Chinolin-substituierte 1,4-Dihydropyridine mit analgetischer, Morphin-agonistischen und spasmolytischen Eigenschaften vergeben wurde [25].

Obwohl diese Derivate nicht weiterentwickelt wurden, zeigt sich doch der universelle Charakter der Dihydropyridin-Grundstruktur.

Die den DHPs ähnlichen Dihydropyrimidinone besitzen neben ihrer calciumantagonistischen Wirkung recht spezifische, antagonistische Wirkung am α_{1a} -adrenergen Rezeptor. Sie könnten daher zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH) als Ersatz für die nicht selektiven α_1 -Rezeptorantagonisten (Bsp. Terazosin) eingesetzt werden [124].

Als weiteres Beispiel für die Dihydropyrimidinthionderivate sei noch Monastrol genannt. Es hemmt das Mitosekinesin Eg5 und kann damit als Mitosehemmstoff in der Krebstherapie eingesetzt werden [124].

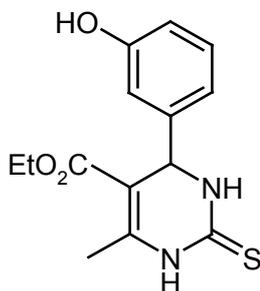


Bild 6.73: Monastrol – ein potenter Mitosehemmstoff

In der heutigen Arzneistoffentwicklung scheint das gezielte Design von Peptiden mit therapeutischem Potenzial ein eher ungewöhnlicher Weg zu sein, besonders wenn für das Target schon hochaktive nicht-peptidische Derivate bekannt sind. Ungewöhnlich, weil normalerweise das Design immer weg von Peptiden und hin zu metabolisch stabileren nicht-peptidischen Wirkstoffen geleitet wird.

Die genaue Kenntnis über die möglichen natürlichen Liganden und die Struktur der Rezeptoren stellen jedoch eine wichtige Voraussetzung für das vollständige Verständnis der Wirkung und des Wirkmechanismus einer Arzneistoffklasse dar. In dieser Arbeit wurde sich zwar auf die Calciumkanal-modulierende Wirkung der Dihydropyridine und ihres β -Turn-Templates beschränkt. Die allgemeine Relevanz steht jedoch außer Frage und sollte zu weiterer Forschung nicht nur auf dem Gebiet der Calciumkanal-Modulatoren inspirieren.

7 Zusammenfassung

Die verschiedenen Dihydropyridin-Derivate besitzen als Modulatoren (Kanalblocker und Kanalöffner) eine sehr hohe Affinität zum L-Typ-Calciumkanal. Diese Tatsache führte nicht nur zur Entdeckung und Isolierung des Calciumkanals, sondern lässt heute die Vermutung zu, dass endogene Liganden, vergleichbar z.B. mit den Endorphinen als Liganden für den Opioid-Rezeptor, für die DHP-Bindungsstelle existieren könnten.

Berichte über einen „hypertensiven Faktor“ und ein „endogenes Peptid“ unterstützen diese Vermutung und geben Anlass sich mit der Struktur von Peptiden zu beschäftigen, die am L-Typ-Calciumkanal angreifen.

Das Schlangentoxin FS2 ist wie andere Angusticeps-Typ-III-Toxine als Peptid (60 AS) am L-Typ-Calciumkanal als Kanalblocker aktiv. Es greift dabei an der DHP-Bindungsstelle an. Durch die vorhandene NMR-Struktur ist eine genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Toxins gegeben. Trotz der erfolgsversprechenden Veröffentlichung der Kristallstruktur des Kaliumkanals liegt eine Struktur des Calciumkanals und damit der genaue molekulare Aufbau der DHP-Bindungsstelle noch in weiter Ferne.

Der Sequenzabschnitt, der für die Wirkung am Calciumkanal verantwortlich ist, konnte durch Vergleich der molekularen Ähnlichkeit zu dem aktuellen Pharmakophor der Dihydropyridine isoliert und beschrieben werden. Diese Sequenz bestätigte experimentell eine unabhängige Arbeitsgruppe auf ihrer Suche nach pharmakologischer Aktivität in kurzen Sequenzabschnitten zwischen Prolinen.

Aus der Toxin-Sequenz wurden kleine cyclische Peptide entwickelt und strukturell mit moleküldynamischen Methoden untersucht. Von diesen wurden zwei Peptide ausgewählt, die der FS2-Konformation des entsprechenden Sequenzabschnitts sehr ähnlich sind. Für sie wird erwartet, dass sie wie Toxin FS2 als Calciumkanalblocker aktiv sind.

Durch einfachen Austausch der Aminosäure Methionin (Met) durch Glutamin (Gln) konnten die molekularen Eigenschaften eines der Peptide so modifiziert werden, dass aus dem potenziellen Calciumkanalblocker P6CyCc ein potenzieller Calciumkanalöffner P6CyCc(Gln) wird.

Die vorgeschlagenen Calciumkanalblocker und entsprechende Referenzpeptide wurden im Rahmen einer Kooperation synthetisiert.

Die pharmakologischen Tests im Rahmen einer zweiten Kooperation ergaben an L-Typ-Calciumkanälen in Froscheizellen (*Xenopus* Oocyten) keinen Befund. Das Ergebnis im verwendeten Testsystem fiel aber nicht nur für die neu entwickelten Peptide, sondern auch für das Referenzpeptid L-Calchin negativ aus. Dieses System scheint also nicht geeignet für die Evaluierung der kleinen peptidischen Calciumantagonisten. Warum dies so ist, kann momentan nicht beantwortet werden. Möglicherweise liefern die

Ergebnisse eines zweiten – zur Zeit noch ausstehenden – Tests an sensibleren kardialen Zellen eine Erklärung.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer Jr., E. E., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M.: »The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures« *J Mol Biol* **112** (1977), 535-542
- [2] Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E.: »The Protein Data Bank« *Nucleic Acids Res* **28** (2000), 235-242
- [3] GRIN/GRID: Molecular Discovery Ltd., West Way House, Elms Parade, Oxford OX2 9LL, U.K., (Version 16)
- [4] GROMACS: BIOSON Research Institute and Laboratory of Biophysical Chemistry, 9747 AG Groningen, The Netherlands, (Version 1.6)
- [5] INSIGHT II/DISCOVER: Accelrys ehemals Molecular Simulations Inc. (MSI), 9685 Scranton Road, San Diego CA 92121-27777, USA, (Version 98)
- [6] SPARTAN: Wavefunction, Inc., Irvine, California, USA, (Version 5.0)
- [7] TINKER: Prof. J. W. Ponder, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO 63110, USA, (Version 3.6 February 1998)
- [8] IUPAC-IUB: »IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Corrections to recommendations 1983« *Eur J Biochem* **213** (1993), 2
- [9] IUPAC-IUB: »IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983 [published erratum appears in *Eur J Biochem* 1993 Apr 1;213(1):2]« *Eur J Biochem* **138** (1984), 9-37
- [10] Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., MacKinnon, R.: »The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity [see comments]« *Science* **280** (1998), 69-77
- [11] Hille, B.: »The Sharpey-Schafer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles« *Q J Exp Physiol* **74** (1989), 785-804
- [12] Goldstein, A.: »Interactions of narcotic antagonists with receptor sites« *Adv Biochem Psychopharmacol* **8** (1973), 471-481

- [13] Kosterlitz, H. W., Hughes, J.: »Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand« *Life Sci* **17** (1975), 91-96
- [14] Hughes, J., Kosterlitz, H. W., Leslie, F. M.: »Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics« *Br J Pharmacol* **53** (1975), 371-381
- [15] Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A., Morris, H. R.: »Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity« *Nature* **258** (1975), 577-580
- [16] Huang, B. S., McCumbee, W. D., Wright, G. L.: »Bay K 8644-like contractile effects of a peptide isolated from spontaneously hypertensive rats« *Can J Physiol Pharmacol* **66** (1988), 332-336
- [17] Hodgkin, A. L., Huxley, A. F.: »A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve« *J Physiol* **117** (1952), 500-544
- [18] Hille, B., Armstrong, C. M., MacKinnon, R.: »Ion channels: from idea to reality« *Nat Med* **5** (1999), 1105-1109
- [19] Catterall, W. A.: »Structure and function of voltage-gated ion channels« *Annu Rev Biochem* **64** (1995), 493-531
- [20] Schleifer, K. J.: »Voltage-dependent L-type calcium channels--inhibition, function and modulation« *Pharm Unserer Zeit* **26** (1997), 179-186
- [21] Mikala, G., Bahinski, A., Yatani, A., Tang, S., Schwartz, A.: »Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca²⁺ channel pore« *FEBS Lett* **335** (1993), 265-269
- [22] Walker, D., De Waard, M.: »Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function« *Trends Neurosci* **21** (1998), 148-154
- [23] »Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie« (W. Forth; D. Henschler; W. Rummel; K. Starke, Hrsg.), 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998
- [24] Mannhold, R.: »Calcium antagonists of the dihydropyridine type: pharmaceutical chemistry and molecular pharmacology« *Pharm Unserer Zeit* **24** (1995), 137-153
- [25] Goldmann, S., Stoltefuss, J.: »1,4-Dihydropyridine: Einfluß von Chiralität und Konformation auf die Calcium-antagonistische und -agonistische Wirkung« *Angew Chem* **103** (1991), 1587-1605

- [26] Mutschler, E.: »Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie«, 6. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1991
- [27] Tsien, R. W., Ellinor, P. T., Horne, W. A.: »Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels« *Trends Pharmacol Sci* **12** (1991), 349-354
- [28] Alexander, S. P. H., Peters, J. A.: »1997 Receptor and ion channel nomenclature supplement« *Trends Pharmacol Sci* **Suppl** (1997), 1-84
- [29] De Waard, M., Gurnett, C. A., Campbell, K. P.: »Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels« *Ion Channels* **4** (1996), 41-87
- [30] Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., et. al.: »The naming of voltage-gated calcium channels« *Neuron* **13** (1994), 505-506
- [31] Xi, Q., Angus, J. A.: »Evidence against an action of mibefradil at N-type voltage-operated calcium channels« *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **364** (2001), 430-436
- [32] Berjukow, S., Marksteiner, R., Gapp, F., Sinnegger, M. J., Hering, S.: »Molecular mechanism of calcium channel block by isradipine. Role of a drug-induced inactivated channel conformation« *J Biol Chem* **275** (2000), 22114-22120
- [33] Handrock, R., Rao-Schymanski, R., Klugbauer, N., Hofmann, F., Herzig, S.: »Dihydropyridine enantiomers block recombinant L-type Ca²⁺ channels by two different mechanisms« *J Physiol (Lond)* **521 Pt 1** (1999), 31-42
- [34] Grun, G., Fleckenstein, A.: »Electromechanical uncoupling of vascular smooth muscle as the basic principle of coronary dilatation by 4-(2'-nitrophenyl-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid dimethyl ester (BAY a 1040, Nifedipine). 1. The significance of Ca ++ ions for the bioelectrical and mechanical activity of smooth muscle« *Arzneimittelforschung* **22** (1972), 334-344
- [35] Fleckenstein, A., Kammermeier, H., Doring, H. J., Freund, H. J.: »On the action mechanism of new coronary dilators with simultaneous oxygen saving myocardial effects, Prenylamine and Iproveratril. 1.« *Z Kreislaufforsch* **56** (1967), 716-744
- [36] Auterhoff, H., Knabe, J., Höltje, H.-D.: »Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie«, 14. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999

- [37] »Rote Liste Win 2000/II« (ROTE LISTE Service GmbH, Hrsg.), ECV Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 2000
- [38] Triggle, D. J.: »Calcium, calcium channels, and calcium channel antagonists« *Can J Physiol Pharmacol* **68** (1990), 1474-1481
- [39] Glossmann, H., Striessnig, J.: »Molecular properties of calcium channels« *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **114** (1990), 1-105
- [40] Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M. J., Glossmann, H.: »Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels« *Trends Pharmacol Sci* **19** (1998), 108-115
- [41] Triggle, D. J., Langs, D. A., Janis, R. A.: »Ca²⁺ channel ligands: structure-function relationships of the 1,4-dihydropyridines« *Med Res Rev* **9** (1989), 123-180
- [42] Wright, G. L., McCumbee, W. D.: »A hypertensive substance found in the blood of spontaneously hypertensive rats« *Life Sci* **34** (1984), 1521-1528
- [43] McCumbee, W. D., Johnson, P., Kasvinsky, P. J., Wright, G. L.: »An endogenous peptide that stimulates lanthanum-resistant calcium uptake in vascular tissue« *Can J Physiol Pharmacol* **65** (1987), 1991-1995
- [44] Simmons, M. A., Johnson, E. C., Becker, J. B., Todd, D. G., Reichenbecher, V. E., McCumbee, W. D., Wright, G. L.: »An endogenous 'hypertensive factor' enhances the voltage-dependent calcium current« *FEBS Lett* **254** (1989), 137-140
- [45] Callewaert, G., Hanbauer, I., Morad, M.: »Modulation of calcium channels in cardiac and neuronal cells by an endogenous peptide« *Science* **243** (1989), 663-666
- [46] Sanna, E., Hanbauer, I.: »Isolation from rat brain tissue of an inhibiting activity for dihydropyridine binding sites and voltage-dependent CA²⁺ uptake« *Neuropharmacology* **26** (1987), 1811-1814
- [47] Albrand, J. P., Blackledge, M. J., Pascaud, F., Hollecker, M., Marion, D.: »NMR and restrained molecular dynamics study of the three-dimensional solution structure of toxin FS2, a specific blocker of the L-type calcium channel, isolated from black mamba venom« *Biochemistry* **34** (1995), 5923-5937
- [48] de Weille, J. R., Schweitz, H., Maes, P., Tartar, A., Lazdunski, M.: »Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel« *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (1991), 2437-2440

- [49] Watanabe, T. X., Itahara, Y., Kuroda, H., Chen, Y. N., Kimura, T., Sakakibara, S.: »Smooth muscle relaxing and hypotensive activities of synthetic calciseptine and the homologous snake venom peptide FS2« *Jpn J Pharmacol* **68** (1995), 305-313
- [50] Yasuda, O., Morimoto, S., Chen, Y., Jiang, B., Kimura, T., Sakakibara, S., Koh, E., Fukuo, K., Kitano, S., Ogihara, T.: »Calciseptine binding to a 1,4-dihydropyridine recognition site of the L-type calcium channel of rat synaptosomal membranes« *Biochem Biophys Res Commun* **194** (1993), 587-594
- [51] Favre, I., Moczydlowski, E., Schild, L.: »On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel« *Biophys J* **71** (1996), 3110-3125
- [52] Saunders, M., Houk K., N., Wu, Y.-D., Still, W., C., Lipton, M., Chang, G., Guida, W., C.: »Conformations of Cycloheptadecane. A Comparison of methods for Conformational Searching« *J Am Chem Soc* **112** (1990), 1419-1427
- [53] Höltje, H.D., Folkers, G.: »Molecular Modeling: Basic Principles and Applications«, in: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* (R. Mannhold; H. Kubinyi; H. Timmermann, Hrsg.), 1. Aufl., Bd. 5, VCH, Weinheim, 1996
- [54] Goodford, P. J.: »A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules« *J Med Chem* **28** (1985), 849-857
- [55] Boobbyer, D. N., Goodford, P. J., McWhinnie, P. M., Wade, R. C.: »New hydrogen-bond potentials for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure« *J Med Chem* **32** (1989), 1083-1094
- [56] Karlson, P.: »Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler«, 13. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1988
- [57] Stryer, L.: »Biochemie«, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1991
- [58] Richardson, J. S., Richardson, D. C.: »Principles and Patterns of Protein Conformation«, in: *Prediction of protein structure and the principles of protein conformation* (G. D. Fasman, Hrsg.), 1. Aufl., Plenum Press, New York, 1989
- [59] Venkatachalam, C. M.: »Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units« *Biopolymers* **6** (1968), 1425-1436

- [60] Rose, G. D., Gierasch, L. M., Smith, J. A.: »Turns in peptides and proteins« *Adv Protein Chem* **37** (1985), 1-109
- [61] Richardson, J. S.: »The anatomy and taxonomy of protein structure« *Adv Protein Chem* **34** (1981), 167-339
- [62] Hurle, M. R., Matthews, C. R.: »Proline isomerization and the slow folding reactions of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Escherichia coli*« *Biochim Biophys Acta* **913** (1987), 179-184
- [63] Brandts, J. F., Halvorson, H. R., Brennan, M.: »Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues« *Biochemistry* **14** (1975), 4953-4963
- [64] Müller, Gerhard: »Molecular Modelling Techniken zum Studium von Konformations-Aktivitätsbeziehungen im Rahmen eines zielgerichteten Wirkstoffdesigns (Diss.)«, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München, München, 1992
- [65] Finsinger, D., Kessler, H.: »Cyclische Peptide als pharmazeutische Wirkstoffe« *PdN-Ch.* **3/45** (1996), 2-6
- [66] Kurz, Michael: »Cyclische Modellpeptide als Template für ein konformationell orientiertes Peptiddesign (Diss.)«, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München, München, 1991
- [67] Müller, G., Gurrath, M., Kurz, M., Kessler, H.: »Beta VI turns in peptides and proteins: a model peptide mimicry« *Proteins* **15** (1993), 235-251
- [68] Wang, H., Sung, S. S.: »Effects of turn residues on beta-hairpin folding - a molecular dynamics study« *Biopolymers* **50** (1999), 763-776
- [69] Sung, S. S.: »Monte Carlo simulations of beta-hairpin folding at constant temperature« *Biophys J* **76** (1999), 164-175
- [70] »Discover 2.9.7/95.0/3.00 Forcefield Simulations User Guide, Part 1«, Biosym/MSI, San Diego, October 1995
- [71] Levitt, M., Lifson, S.: »Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure« *J Mol Biol* **46** (1969), 269-279
- [72] Hagler, A. T., Huler, E., Lifson, S.: »Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals« *J Am Chem Soc* **96** (1974), 5319-5327
- [73] Hagler, A. T., Lifson, S.: »Energy functions for peptides and proteins. II. The amide hydrogen bond and calculation of amide crystal properties« *J Am Chem Soc* **96** (1974), 5327-5335

- [74] Hagler, A. T., Lifson, S.: »The amide hydrogen bond in energy functions for peptides and proteins«, in: Peptides, Polypeptides and Proteins (E. R. Blout, Hrsg.), Wiley, New York, 1974, S. 35-48
- [75] Loev, B., Goodman, M. M., Snader, M. K., Tedeschi, R., Macko, E.: »"Hantzsch-type" dihydropyridine hypotensive agents. 3« J Med Chem **17** (1974), 956-965
- [76] Schleifer, K. J.: »Quantum chemical generation of a nifedipin pharmacophore model« Pharm Pharmacol Lett **5** (1995), 162-165
- [77] Arrowsmith, J. E., Campbell, S. F., Cross, P. E., Stubbs, J. K., Burges, R. A., Gardiner, D. G., Blackburn, K. J.: »Long-acting dihydropyridine calcium antagonists. 1. 2-Alkoxyethyl derivatives incorporating basic substituents« J Med Chem **29** (1986), 1696-1702
- [78] Goldmann, S., Stoltefuss, J., Born, L.: »Determination of the absolute configuration of the active amlodipine enantiomer as (-)-S: a correction« J Med Chem **35** (1992), 3341-3344
- [79] Peterson, B. Z., Johnson, B. D., Hockerman, G. H., Acheson, M., Scheuer, T., Catterall, W. A.: »Analysis of the dihydropyridine receptor site of L-type calcium channels by alanine-scanning mutagenesis« J Biol Chem **272** (1997), 18752-18758
- [80] Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., Sharp, E., Tanada, T. N., Scheuer, T., Catterall, W. A.: »Construction of a high-affinity receptor site for dihydropyridine agonists and antagonists by single amino acid substitutions in a non-L-type Ca²⁺ channel« Proc Natl Acad Sci U S A **94** (1997), 14906-14911
- [81] Schleifer, K. J.: »Stereoselective characterization of the 1,4-dihydropyridine binding site at L-type calcium channels in the resting state and the opened/inactivated state« J Med Chem **42** (1999), 2204-2211
- [82] Höltje, H. D., Marrer, S.: »A molecular graphics study on structure-action relationships of calcium-antagonistic and agonistic 1,4-dihydropyridines« J Comput Aided Mol Des **1** (1987), 23-30
- [83] Rovnyak, G. C., Kimball, S. D., Beyer, B., Cucinotta, G., DiMarco, J. D., Gougoutas, J., Hedberg, A., Malley, M., McCarthy, J. P., Zhang, R., et, a. I.: »Calcium entry blockers and activators: conformational and structural determinants of dihydropyrimidine calcium channel modulators« J Med Chem **38** (1995), 119-129
- [84] Schleifer, K. J.: »Comparative molecular modelling study of the calcium channel blockers nifedipine and black mamba toxin FS2« J Comput Aided Mol Des **11** (1997), 491-501

- [85] Sutcliffe, M. J., Jaseja, M., Hyde, E. I., Lu, X., Williams, J. A.: »Three-dimensional structure of the RGD-containing neurotoxin homologue dendroaspin« *Nat Struct Biol* **1** (1994), 802-807
- [86] Baidur, N., Rutledge, A., Triggle, D. J.: »A homologous series of permanently charged 1,4-dihydropyridines: novel probes designed to localize drug binding sites on ion channels« *J Med Chem* **36** (1993), 3743-3745
- [87] Bangalore, R., Baidur, N., Rutledge, A., Triggle, D. J., Kass, R. S.: »L-type calcium channels: asymmetrical intramembrane binding domain revealed by variable length, permanently charged 1,4-dihydropyridines« *Mol Pharmacol* **46** (1994), 660-666
- [88] Yao, J., Feher, V. A., Espejo, B. F., Reymond, M. T., Wright, P. E., Dyson, H. J.: »Stabilization of a type VI turn in a family of linear peptides in water solution« *J Mol Biol* **243** (1994), 736-753
- [89] Yao, J., Dyson, H. J., Wright, P. E.: »Three-dimensional structure of a type VI turn in a linear peptide in water solution. Evidence for stacking of aromatic rings as a major stabilizing factor« *J Mol Biol* **243** (1994), 754-766
- [90] Kleywegt, G. J., Jones, T. A.: »Phi/psi-chology: Ramachandran revisited« *Structure* **4** (1996), 1395-1400
- [91] Schaefer, M.: »persönliche Mitteilung«
- [92] Schaefer, M., Bartels, C., Karplus, M.: »Solution conformations and thermodynamics of structured peptides: molecular dynamics simulation with an implicit solvation model« *J Mol Biol* **284** (1998), 835-48
- [93] Scheraga, H. A.: »Predicting Three-Dimensional Structures of Oligopeptides« *REVIEWS IN COMPUTATIONAL CHEMISTRY 3 VOL 3* (1992), 73-142
- [94] Kostrowicki, J., Scheraga, H. A.: »Some Approaches to the Multiple-Minima Problem in Protein Folding« *DIMACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science* **23** (1996), 123-132
- [95] Kostrowicki, J., Scheraga, H. A.: »Application of the Diffusion Equation for Global Optimization to Oligopeptides« *J Phys Chem* **96** (1992), 7442-7449
- [96] Pappu, R. V., Marshall, G. R., Ponder, J. W.: »A potential smoothing algorithm accurately predicts transmembrane helix packing [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1999 Feb;6(2):199]« *Nat Struct Biol* **6** (1999), 50-55

- [97] Aumailley, M., Gurrath, M., Müller, G., Calvete, J., Timpl, R., Kessler, H.: »Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1« *FEBS Lett* **291** (1991), 50-54
- [98] Hsieh, H. P., Wu, Y. T., Chen, S. T., Wang, K. T.: »Direct solid-phase synthesis of octreotide conjugates: precursors for use as tumor-targeted radiopharmaceuticals« *Bioorg Med Chem* **7** (1999), 1797-1803
- [99] Brady, S. F., Varga, R. M., Freidinger, R. M., Schwenk, D. A., Mendlowski, M., Holly, F. W., Veber, D. F.: »Practical Synthesis of Cyclic Peptides, with an example of Dependence of Cyclization Yield upon Linear Sequence« *J Org Chem* **44** (1979), 3101-3105
- [100] Kini, R. M., Evans, H. J.: »A hypothetical structural role for proline residues in the flanking segments of protein-protein interaction sites« *Biochem Biophys Res Commun* **212** (1995), 1115-1124
- [101] Kini, R. M., Evans, H. J.: »A novel approach to the design of potent bioactive peptides by incorporation of proline brackets: antiplatelet effects of Arg-Gly-Asp peptides« *FEBS Lett* **375** (1995), 15-17
- [102] Kini, R. M., Caldwell, R. A., Wu, Q. Y., Baumgarten, C. M., Feher, J. J., Evans, H. J.: »Flanking proline residues identify the L-type Ca²⁺ channel binding site of calciseptine and FS2« *Biochemistry* **37** (1998), 9058-9063
- [103] van Gunsteren, W. F., Berendsen, H. J. C.: »Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie« *Angew Chem* **102** (1990), 1020-1055
- [104] Fang, X., Fernando, Q., Ugwu, S. O., Blanchard, J.: »An improved method for determination of acid dissociation constants of peptides« *Pharm Res* **12** (1995), 1423-1429
- [105] Kubal, G., Sadler, P. J., Tucker, A.: »pH-induced structural changes in human serum apotransferrin. pKa values of histidine residues and N-terminal amino group determined by 1H-NMR spectroscopy« *Eur J Biochem* **220** (1994), 781-787
- [106] Hefford, M. A., Evans, R. M., Oda, G., Kaplan, H.: »Unusual chemical properties of N-terminal histidine residues of glucagon and vasoactive intestinal peptide« *Biochemistry* **24** (1985), 867-874

- [107] Peri, R., Padmanabhan, S., Rutledge, A., Singh, S., Triggle, D. J.: »Permanently charged chiral 1,4-dihydropyridines: molecular probes of L-type calcium channels. Synthesis and pharmacological characterization of methyl(omega-trimethylalkylammonium) 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylate iodide, calcium channel antagonists« *J Med Chem* **43** (2000), 2906-2914
- [108] Lacinova, L., An, R. H., Xia, J., Ito, H., Klugbauer, N., Triggle, D., Hofmann, F., Kass, R. S.: »Distinctions in the molecular determinants of charged and neutral dihydropyridine block of L-type calcium channels« *J Pharmacol Exp Ther* **289** (1999), 1472-1479
- [109] »Discover 2.9.7 Forcefield Simulations User Guide, Part 2«, Biosym/MSI, San Diego, October 1995
- [110] Zheng, W., Stoltefuss, J., Goldmann, S., Triggle, D. J.: »Pharmacologic and radioligand binding studies of 1,4-dihydropyridines in rat cardiac and vascular preparations: stereoselectivity and voltage dependence of antagonist and activator interactions« *Mol Pharmacol* **41** (1992), 535-541
- [111] Shih, T. M., Smith, R. D., Toro, L., Goldin, A. L.: »High-level expression and detection of ion channels in *Xenopus* oocytes« *Methods Enzymol* **293** (1998), 529-556
- [112] Hering, S.: »Small-volume and rapid extracellular solution exchange around *Xenopus* oocytes during voltage-clamp recordings« *Pflugers Arch* **436** (1998), 303-307
- [113] Kini, R. M.: »Proline brackets and identification of potential functional sites in proteins: toxins to therapeutics« *Toxicon* **36** (1998), 1659-1670
- [114] Lamb, G. D., El-Hayek, R., Ikemoto, N., Stephenson, D. G.: »Effects of dihydropyridine receptor II-III loop peptides on Ca²⁺ release in skinned skeletal muscle fibers« *Am J Physiol Cell Physiol* **279** (2000), C891-905
- [115] Casarotto, M. G., Gibson, F., Pace, S. M., Curtis, S. M., Mulcair, M., Dulhunty, A. F.: »A structural requirement for activation of skeletal ryanodine receptors by peptides of the dihydropyridine receptor II-III loop« *J Biol Chem* **275** (2000), 11631-11637
- [116] Hinchcliffe, M., Illum, L.: »Intranasal insulin delivery and therapy« *Adv Drug Deliv Rev* **35** (1999), 199-234
- [117] Patton, J. S., Bukar, J., Nagarajan, S.: »Inhaled insulin« *Adv Drug Deliv Rev* **35** (1999), 235-247

- [118] Ripka, W. C., DeLucca, G. V., Bach II, A. C., Pottorf, R. S., Blaney, J. M.: »Protein beta-turn mimetics I - Design, synthesis, and evaluation in model cyclic peptides.« *Tetrahedron* **49** (1993), 3593-3608
- [119] Ripka, W. C., DeLucca, G. V., Bach II, A. C., Pottorf, R. S., Blaney, J. M.: »Protein beta-turn mimetics II - Design, synthesis, and evaluation in the cyclic peptide Gramicidin S.« *Tetrahedron* **49** (1993), 3609-3628
- [120] Hruby, V. J., Balse, P. M.: »Conformational and topographical considerations in designing agonist peptidomimetics from peptide leads« *Curr Med Chem* **7** (2000), 945-970
- [121] Cooper, K., Fray, M. J., Parry, M. J., Richardson, K., Steele, J.: »1,4-Dihydropyridines as antagonists of platelet activating factor. 1. Synthesis and structure-activity relationships of 2-(4-heterocyclyl)phenyl derivatives« *J Med Chem* **35** (1992), 3115-3129
- [122] Jiang, J. L., van Rhee, A. M., Melman, N., Ji, X. D., Jacobson, K. A.: »6-phenyl-1,4-dihydropyridine derivatives as potent and selective A₃ adenosine receptor antagonists« *J Med Chem* **39** (1996), 4667-4675
- [123] Li, A. H., Moro, S., Melman, N., Ji, X. D., Jacobson, K. A.: »Structure-activity relationships and molecular modeling of 3, 5-diacyl-2,4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists« *J Med Chem* **41** (1998), 3186-3201
- [124] Kappe, C. O.: »Recent Advances in the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. New Tricks from an Old Dog« *Acc Chem Res* **33** (2000), 879-888

Lebenslauf

Name: Christian Johannes Kirchhoff
Geburtsdatum/~ort: 17. 04.1969 in Bergneustadt / Kreis Oberberg
Eltern: Pfarrer Martin A. W. Kirchhoff
OStR Barbara M. Kirchhoff
Familienstand: verheiratet
mit Annegret Kirchhoff, geb. Steinbring

Schulbildung

1975-1979 Gemeinschaftsgrundschule Hasenberg (Remscheid-Lennep)
1979-1989 Röntgen-Gymnasium (Remscheid-Lennep)
05/1989 Abitur
Schuljahr 1986/87 West High School Torrance (Los Angeles/USA)
06/1987 Amerikanisches Abitur (Diploma)

Zivildienst

06/1989 – 09/1990 Deutsches Institut für ärztliche Mission (Tübingen)
– Arzneimittelhilfe –

Berufsausbildung

09/1990 – 10/1994 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
11/1994 – 04/1995 Pharmaziepraktikum Brücken-Apotheke (Dußlingen)
05/1995 – 10/1995 Pharmaziepraktikum Ciba-Geigy (Wehr/Baden)
18.12.1995 Approbation als Apotheker
05/1996 – 01/2001 Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Arbeitskreis Prof. Dr. H.-D. Höltje, PD Dr. K.-J. Schleifer

Berufliche Tätigkeiten

09/1990 – 10/1994 Studentische Hilfskraft Pharmz. Biologie
(Prof. Reinhard/Dr. Mechler – Uni Tübingen)
Semesterferien SS 1992 Studentische Hilfskraft Pharmz. Chemie
(Prof. Eger – Uni Tübingen)
12/1995 – 04/1995 Angestellter Apotheker Brücken-Apotheke (Dußlingen)
05/1996 – 09/1996 Wissenschaftliche Hilfskraft (1/2) Betreuung 3. Semester
organisch-präparatives Semester – Uni Düsseldorf
10/1996 – 09/2000 Wissenschaftlicher Angestellter (2/3) Betreuung 6. Semester
Arzneibuchanalytik – Uni Düsseldorf
10/2000 – 12/2000 Wissenschaftliche Hilfskraft (1/2) Betreuung 3. Semester
organisch-präparatives Semester – Uni Düsseldorf
Seit 02/2001 Molecular Modelling (Discovery Informatics)
Firma Evotec OAI AG (Hamburg)

