

**Molecular-Modelling-Untersuchungen zu Wechselwirkungen  
in Protein-Protein- und Protein-Ligand-Komplexen**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Bernd Rupp  
aus Creglingen

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Korreferentin: Prof. Dr. C. Marian

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2004

Fantasie ist wichtiger als Wissen  
(Albert Einstein)

Für Annette und meine Eltern

Aus Kostengründen ist in der gedruckten Version dieser Dissertation nur ein Teil der Abbildungen farbig dargestellt. Eine komplett farbige Version der Arbeit kann als *Elektronische Dissertation* kostenlos von der Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (<http://www.ub.uni-duesseldorf.de/ebib/diss/>) heruntergeladen werden.

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 1999 bis Januar 2004 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Zuerst möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Höltje danken, für die Überlassung der interessanten Themen, das gute Arbeitsklima, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die vielen interessanten Gespräche während der Promotion. Vor allem möchte ich ihm für das in mich gesetzte Vertrauen und seinen schon im Vorfeld der Promotion nötigen persönlichen Einsatz danken. Denn dadurch hat er es mir ermöglicht, an der Heinrich-Heine-Universität zu promovieren.

Frau Prof. Dr. Marian möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Anfertigung des Zweitgutachtens danken. Ausserdem für die sehr inspirierende Arbeit mit ihr und Stephan Raub bei der Berechnung der Eisen-Stickstoff-Parameter.

Bei Dr. Annette Schappach und Günther Uphues bedanke ich mich ganz herzlich. Denn erst durch ihren unermüdlichen Einsatz und ihre Willensstärke, bei noch so vielen Rechtschreibfehlern und grammatikalischen Unzulänglichkeiten den Sinn des Textes zu erkennen, war es möglich eine einigermaßen verständliche Arbeit zu erstellen.

Birgit Schlegel, Britta Bröer und Gerd Menche möchte ich für viele interessante Gespräche und wissenschaftliche Diskussionen danken. Ich hatte viel Spaß mit Euch, ausserdem werde ich Birgits Kaffee vermissen.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises möchte ich mich besonders für die ausgesprochen freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit sowie für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>11</b>
<b>I</b>	<b>Verwendete Methoden</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Methoden zur Berechnung von Molekülstrukturen</b>	<b>17</b>
3.1	GROMACS Kraftfeld . . . . .	17
3.1.1	Algorithmen des GROMACS Kraftfeldes . . . . .	18
3.1.1.1	Moleküldynamik-Simulationen . . . . .	18
3.1.1.2	Energieminimierung . . . . .	18
3.1.2	Energieterme, Parameter und äußere Krafteinwirkungen . . . . .	20
3.1.2.1	Particle Mesh-Ewald (PME) . . . . .	21
3.1.2.2	Bindungs-Streckschwingung . . . . .	22
3.1.2.3	Position Restraints . . . . .	23
3.1.2.4	Distance Restraints . . . . .	24
3.1.3	Energiegruppen . . . . .	24
3.2	Dichtefunktionaltheorie (DFT) . . . . .	25
3.2.1	Ansatz der Dichtefunktionaltheorie . . . . .	26
3.2.2	Bestimmung der Austausch-Korrelationsenergie $E_{xc}$ . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Methoden zu Analyse und Bau von Molekülsystemen</b>	<b>31</b>
4.1	Sekundärstrukturvorhersage mit PSIPred . . . . .	31
4.2	Homologiemodelling . . . . .	32
4.3	Überprüfung der Proteingeometrie mit PROCHECK . . . . .	34
4.4	Root mean square deviation (RMSD) . . . . .	37
4.5	Dihedral Order Parameter (DOP) . . . . .	38
<b>II</b>	<b>Simulation der Dissoziation von Insulin-Dimeren</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Diabetes Mellitus</b>	<b>45</b>
6.1	Symptome und Auswirkungen eines Insulinmangels . . . . .	45
6.2	Typ I-Diabetes . . . . .	48
6.3	Typ II-Diabetes . . . . .	49
6.4	Weitere Diabetestypen . . . . .	50

<b>7</b>	<b>Insulin</b>	<b>53</b>
7.1	Biosynthese . . . . .	53
7.2	Gentechnologische Synthese von Insulin und seinen Analoga . . . . .	55
7.3	Primärstruktur . . . . .	56
7.4	Sekundär- und Tertiärstruktur . . . . .	57
7.4.1	Monomerstruktur . . . . .	57
7.4.2	Dimerstruktur . . . . .	59
7.4.3	Hexamerstruktur . . . . .	60
7.5	Dissoziation und Wirkprofil des Insulins . . . . .	65
<b>8</b>	<b>Durchführung</b>	<b>69</b>
8.1	Verwendete Insuline . . . . .	70
8.2	Bau der Dissoziationsbox . . . . .	71
8.3	Ablauf einer Simulation . . . . .	72
<b>9</b>	<b>Dissoziationseigenschaften der Insuline und der Insulinanaloga</b>	<b>75</b>
9.1	Vergleich der Wildtyp-Human-Insulin Konformere . . . . .	75
9.1.1	Zerfallszeiten der Insulin-Konformere . . . . .	76
9.1.2	Deformation der festgehaltenen Monomere . . . . .	77
9.1.3	Wechselwirkungen innerhalb der festgehaltenen Monomere . . . . .	77
9.1.4	H-Brücken zwischen den Monomeren der Wildtyp-Insulin- Konformere . . . . .	81
9.2	Vergleich der Insulinanaloga mit dem Wildtyp-Insulin (T <sub>2</sub> -Konformer) . . . . .	82
9.2.1	Zerfallszeiten der Insulinanaloga . . . . .	83
9.2.2	Deformation der festgehaltenen Monomere . . . . .	84
9.2.3	Wechselwirkungen innerhalb der festgehaltenen Monomere . . . . .	85
9.2.4	H-Brücken zwischen den Monomeren der Insulinanaloga . . . . .	85
9.2.5	Lebensdauer der Salzbrücke Lysin B28 - Glutamat B21 zwischen den Monomeren der Insulinanaloga . . . . .	87
9.2.6	Dihedral Order Parameter (DOP) des Insulinproteinerückgrates . . . . .	89
9.2.7	Seitenkettenbeweglichkeit der Salzbrücken bildenden Aminosäuren . . . . .	94
9.2.8	RMSD-Werte der freien Monomere nach der Relaxationssimulation . . . . .	95
<b>10</b>	<b>Diskussion und weitere Entwicklungen</b>	<b>97</b>
10.1	Dissoziation der Wildtyp-Insulin-Konformere . . . . .	98
10.2	Dissoziation der Insulinanaloga . . . . .	99
10.3	Allgemeine Fehlerdiskussion . . . . .	102
<b>III</b>	<b>Homologiemodell der Lanosterol-14<math>\alpha</math>-Demethylase</b>	<b>105</b>
<b>11</b>	<b>Einleitung</b>	<b>107</b>
<b>12</b>	<b>Mykosen</b>	<b>109</b>
12.1	Pathogene Pilze . . . . .	109
12.1.1	<i>C. Albicans</i> . . . . .	111
12.2	Symptome einer Mykose . . . . .	112



<b>13 Antimykotika und ihre Wirkung</b>	<b>117</b>
13.1 Antiseptika . . . . .	117
13.2 Polyen-Antimykotika . . . . .	118
13.3 Griseofulvin . . . . .	119
13.4 Flucytosin . . . . .	119
13.5 Hemmstoffe der Ergosterolbiosynthese . . . . .	120
13.5.1 Biosynthese des Ergosterols . . . . .	120
13.5.2 Funktion des Ergosterols . . . . .	121
13.5.3 Squalenepoxidasehemmer . . . . .	122
13.5.4 Morpholin-Derivate . . . . .	123
13.5.5 Antimykotisch wirksame Azolderivate . . . . .	123
<b>14 Die Lanosterol-14<math>\alpha</math>-Demethylase (CYP51)</b>	<b>127</b>
14.1 Vorkommen und Funktion der CYP51 . . . . .	128
14.2 Mechanismus der 14 $\alpha$ -Demethylierung . . . . .	132
14.3 Struktur des Enzyms und Charakterisierung des aktiven Zentrums der CYP51 . . . . .	135
14.3.1 Primärstruktur . . . . .	135
14.3.2 Sekundär- und Tertiärstruktur . . . . .	137
14.3.3 Zugang zum aktiven Zentrum einiger P-450-Kristallstrukturen . . . . .	140
14.3.4 Das aktive Zentrum der CYP51 . . . . .	143
14.4 Substraterkennung der CYP51 . . . . .	145
14.5 Inhibitor-Häm-Bindung . . . . .	146
14.6 Resistenzentwicklung durch Mutation der CYP51 . . . . .	148
<b>15 Bau der Cytochrom P-450-Modelle</b>	<b>151</b>
15.1 Sekundärstruktur-Vorhersagen mit PSIpred . . . . .	151
15.2 Alignment der beiden Sequenzen . . . . .	153
15.3 Generierung der Modellstrukturen . . . . .	155
<b>16 Stabilitätsprüfung der CYP51 Homologie-Modelle</b>	<b>161</b>
16.1 Durchführung der Moleküldynamik-Simulationen . . . . .	161
16.2 Ergebnisse der Simulationen . . . . .	165
16.2.1 Vergleich der RMSD-Werte . . . . .	165
16.2.2 Verlauf der potentiellen Energie der Modellstrukturen . . . . .	166
16.2.3 RMS-Fluktuation . . . . .	168
16.2.4 Überprüfung der Proteingeometrie mit PROCHECK . . . . .	169
16.2.5 Ramachandran-Plots der Strukturen . . . . .	170
<b>17 Simulation der Substratkomplexe beider Modelle</b>	<b>173</b>
17.1 Positionierung des Substrates . . . . .	174
17.2 Simulation der Substratkomplexe . . . . .	175
17.3 Ergebnisse der Simulationen . . . . .	176
17.3.1 Vergleich der RMSD-Werte . . . . .	176
17.3.2 Potentielle Energie der Komplexstrukturen . . . . .	177
17.3.3 RMS-Fluktuation . . . . .	178

17.3.4	Abstand der 14 $\alpha$ -Methylgruppe zum Häm-Eisen . . . . .	180
17.3.5	H-Brücken zwischen Lanosterol und Protein . . . . .	181
17.3.6	Clusteranalyse und repräsentative Strukturen . . . . .	182
17.3.7	Interaktionen des Lanosterols mit dem Protein . . . . .	184
<b>18</b>	<b>Parametrisierung der Fe-N Bindung</b>	<b>187</b>
<b>19</b>	<b>Simulationen der Inhibitor-Enzym-Komplexe</b>	<b>193</b>
19.1	Positionierung der Inhibitoren . . . . .	195
19.2	Durchführung der Simulationen . . . . .	197
19.3	Ergebnisse der Simulationen . . . . .	198
19.3.1	Vergleich der RMSD-Werte . . . . .	199
19.3.2	Verlauf der potentiellen Energie . . . . .	201
19.3.3	RMS-Fluktuation . . . . .	203
19.3.4	Auslenkung des Imidazolrings am Häm-Eisen . . . . .	206
19.3.5	H-Brücken des Ketoconazols mit den Protein-Modellen . . . . .	210
19.3.6	Clusteranalyse und repräsentative Strukturen . . . . .	211
19.3.7	Interaktionen der Inhibitoren mit den Enzymen . . . . .	212
<b>20</b>	<b>Diskussion</b>	<b>217</b>
20.1	Bau der CYP51-Modelle . . . . .	218
20.2	Stabilitätsprüfung der CYP51-Homologie-Modelle . . . . .	218
20.3	Simulation der Substratkomplexe . . . . .	221
20.4	Parametrisierung der Fe-N-Bindung . . . . .	223
20.5	Simulation der Protein-Inhibitor-Komplexe . . . . .	224
20.6	Allgemeine Diskussion . . . . .	229
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>231</b>
<b>21</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>233</b>
<b>22</b>	<b>Abschließende Bemerkung</b>	<b>235</b>
<b>A</b>	<b>Bezeichnung der Aminosäuren</b>	<b>251</b>
<b>B</b>	<b>Farbtabelle der Atomtypen</b>	<b>253</b>
<b>C</b>	<b>Glossar</b>	<b>255</b>
<b>D</b>	<b>Verwendete Hard- und Software</b>	<b>259</b>
<b>E</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis, Einheiten</b>	<b>261</b>
<b>F</b>	<b>Übergangsstrukturen des Insulins</b>	<b>263</b>
<b>G</b>	<b>Sekundärstrukturvorhersagen</b>	<b>265</b>

# Kapitel 1

## Einführung

Die hier vorliegende Arbeit ist in drei Teile gegliedert. Im ersten Teil der Arbeit werden die für die Durchführung und Analyse verwendeten Methoden kurz vorgestellt. Der zweite und dritte Teil beinhalten die wissenschaftlichen Arbeiten dieser Dissertation.

Im zweiten Teil werden Studien zur Dissoziation von Insulin-Dimeren vorgestellt, während im dritten Teil Molekülsimulationen zweier Cytochrom-P-450-Modelle beschrieben werden. Chemisch und pharmazeutisch sind beide Teile unabhängig voneinander zu betrachten; die Gemeinsamkeit der Teile besteht nur in der Berechnung und Analyse beider Systeme im gleichen GROMACS- Kraftfeld.

Die Studien der Insulin-Dimere dienen ursprünglich nur zur Validierung einiger Umgebungsparameter des Kraftfeldes, da sie mit etwa 100 Aminosäuren ein deutlich kleineres System als die Cytochrom-P-450-Modelle darstellen. Das kleinere System der Insulin-Dimere verkürzt die Rechenzeit, für die zur Optimierung des umgebenden Mediums benötigten Dynamiken. Diese Berechnungen sind nur von technischem Interesse und werden daher im Verlauf der Arbeit nicht mehr genauer beschrieben. Als Ergebnis der Optimierung wird für die Simulationen der Cytochrom-P-450-Modelle eine isotoni-sche Kochsalzlösung verwendet.

Im Laufe der Validierungsarbeiten zeigte sich jedoch, dass es mit dem vorliegenden Kraftfeld möglich ist, die Dissoziation der Insulin-Dimere zu beschreiben. Deshalb ist die Berechnung dieses Verhalten ebenfalls Gegenstand der Arbeit. Die hier vorgestellten Simulationen haben allerdings nichts mehr mit den Validierungsrechnungen zu tun und stellen daher ein eigenständiges Themengebiet dar.

Das ursprüngliche Ziel der Entwicklung von Cytochrom-P-450-Modellen ist weiterhin

Hauptgegenstand dieser Arbeit.

# **Teil I**

## **Verwendete Methoden**



# Kapitel 2

## Einleitung

Zur Simulation der in dieser Arbeit untersuchten Moleküle wurden zwei unterschiedliche Moleküldynamik-Simulationsansätze verwendet, ein Equilibrium- und ein Non-Equilibrium-Ansatz.

Während bei dem Equilibrium-Ansatz von der Startstruktur ausgehend so lange gerechnet wird, bis sich das Modell auf einem gewissen Energieniveau eingependelt hat, wirkt bei dem Non-Equilibrium-Ansatz auf einen bestimmten Teil des Systems eine äußere Kraft ein. Das hat zur Folge, dass nie ein stabiler Zustand erreicht wird, da das Modell sich auf die ständig ändernde Umgebung einstellen muss. Mit Hilfe dieser Methode werden dynamische Eigenschaften von Molekülen beobachtet.

Da eine Beschreibung der natürlichen Umgebung mit den heutigen Rechnerkapazitäten nur bedingt möglich ist, wurden einige Vereinfachungen und Näherungen eingeführt. Zum einen werden alle atomaren Wechselwirkungen mit Newton'schen Gleichungen beschrieben. Zum anderen müssen lange andauernde Prozesse forciert werden, um in technisch machbaren Zeiträumen simulierbar zu werden.

Bei den durchgeführten Rechnungen handelt es sich zumeist um Standard-Routinen, die in den Arbeiten von Schappach und Stahl schon sehr ausführlich beschrieben wurden [1,2]. In den folgenden Kapiteln werden daher nur die für die Erstellung und Analyse der Modelle und Dynamiken wichtigen Methoden kurz beschrieben. Weitere Informationen liefert die im jeweiligen Kapitel zitierte Literatur.





# Kapitel 3

## Methoden zur Berechnung von Molekülstrukturen

Zur Berechnung von Molekülstrukturen gibt es verschiedene Ansätze mit unterschiedlicher Genauigkeit. Grob kann man diese Ansätze in Kraftfeld-, Semiempirie- und ab initio-Methoden einteilen. Bei den Kraftfeldmethoden werden Wechselwirkungen mit Hilfe der klassischen Mechanik berechnet. Semiempirische Methoden sind prinzipiell je nach Ansatz als vereinfachte ab initio-Methoden zu definieren. Analog zu diesen Methoden wird die Energie durch Berechnung entsprechend der Schrödinger-Gleichung ermittelt. Zur Vereinfachung werden allerdings bei semiempirischen Methoden molekülspezifische Parameter verwendet, die bei ab initio-Methoden nicht in Frage kommen.

Im Folgenden werden nur die für diese Arbeit verwendeten Methoden beschrieben.

### 3.1 GROMACS Kraftfeld

Sämtliche Energieminimierungen und Dynamiksimulationen dieser Arbeit wurden mit dem GROMOS 96 Kraftfeld [3] des Programmpakets GROMACS [4–8] durchgeführt.

Essentieller Bestandteil des GROMACS Kraftfeldes ist es, auf bestimmte Atomgruppen Kräfte ausüben zu können, um ein bestimmtes Verhalten zu provozieren oder zu unterdrücken. Durch die Möglichkeit der unterschiedlichen Behandlung einzelner Atomgruppen ist das GROMACS Kraftfeld für komplexe Problemstellungen besonders geeignet. Für eine exaktere Berechnung unterschiedlicher Aspekte in der vorliegenden Arbeit mussten einige Standard-Terme des GROMACS Kraftfeldes durch modifizierte Terme

ersetzt werden. Diese Terme werden im Anschluss gezeigt.

### 3.1.1 Algorithmen des GROMACS Kraftfeldes

Ein Algorithmus stellt ein Regelwerk dar, das beschreibt, wie die einzelnen Terme sich zueinander verhalten. Prinzipiell gibt es in GROMACS zwei unterschiedliche Algorithmen, einmal die Molekular-Dynamiksimulation (MD) und zum anderen die Energieminimierung (EM).

#### 3.1.1.1 Moleküldynamik-Simulationen

Eine allgemeine Beschreibung des dem GROMACS zugrunde liegenden Algorithmus wird in der Tabelle 3.1 gezeigt. Jede Moleküldynamik-Simulation (MD) wie auch die Energieminimierung (EM) benötigen als Eingangsdaten einen Satz von Ausgangskor-dinaten aller zu berechnenden Partikel. Dazu gehört auch die Topologie des Systems, die das Verhalten der einzelnen Partikel zueinander regelt.

Im Folgenden werden nur Interaktions-Energiet Terme beschrieben, die auf Grund von Besonderheiten des zu berechnenden Systems verändert werden mussten. Wie in Ta-belle 3.1 zu sehen ist, handelt es sich nur um Änderungen im 3. Schritt des Algorithmus. Alle weiteren Schritte des Kraftfeldes blieben unverändert und sind im GROMACS User Manual [9] ausführlich beschrieben.

#### 3.1.1.2 Energieminimierung

Bei der Energieminimierung werden die Atome (Partikel) eines System nicht nach den Newton'schen Bewegungsgleichungen bewegt. Es wird vielmehr entlang der Energiehyperfläche versucht, die Atome so anzuordnen, dass ihre Struktur ein Minimum der Energiehyperfläche darstellt.

In GROMACS stehen dafür zwei Gradienten-Methoden zur Verfügung: *steepest descent* und *conjugate gradient*. Bei beiden Methoden wird als Kriterium für die Suchrichtung die erste Ableitung (Gradient) der Energiehyperfläche verwendet. Die Größe und das Vorzeichen des Gradienten dienen als Richtwerte, um die Entfernung des nächst ge-legenden Energieminimums abzuschätzen. *Steepest descent* ist die effektivere und robus-tere Methode von beiden und wird daher meistens für Strukturen weit vom Energiemi-nimum genutzt. In der Nähe des Minimums allerdings lässt die Effektivität von *steepest*

**Tabelle 3.1:** Allgemeiner MD-Algorithmus

<p><b>1. Input der Eingangsbedingungen</b></p> <p>Potentielle Wechselwirkung <math>V</math> als Funktion der Atompositionen          Position <math>r</math> aller Atome des Systems          Geschwindigkeiten <math>v</math> aller Atome des Systems</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p><b>wiederhole 2-4 n-mal (n=gewählter Zeitschritt)</b></p>
<p><b>2. Berechnung der Kräfte</b></p> <p>Kraft auf ein Atom</p> $F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i}$ <p>erzeugt durch Berechnung der Kraft ungebundener Atompaare:</p> $F_i = \sum_j F_{ij}$ <p>plus Kraft aus gebundener Interaktion, die von 1, 2, 3 oder 4 Atomen abhängen kann,          plus Rückhaltekräfte und externe Kräfte.</p> <p>Die potentielle und kinetische Energie sowie der Drucktensor werden berechnet.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
<p><b>3. Aktualisierung der Konfiguration</b></p> <p>Die Bewegung der Atome wird simuliert durch numerische Lösung          der Newton'schen Bewegungsgleichungen:</p> $\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{M_i}$ $\frac{dr_i}{dt} = v_i; \quad \frac{dv_i}{dt} = \frac{F_i}{m_i}$ <p style="text-align: center;">↓</p>
<p><b>4. Ausgabe (wenn gewünscht):</b></p> <p>Positionen, Geschwindigkeiten, Energien, Temperatur, Druck, etc.</p>

*descent* stark nach, da in diesem Fall der Gradient sehr klein wird. In dem Bereich bietet sich dann die Methode *conjugate gradient* an, weil auch Gradienten aus den vorherigen Minimierungsschritten mit in die Rechnung eingehen und so die Suchrichtung selbst bei kleinen Gradienten optimal bleibt.

Als Konvergenzkriterien können für beide Methoden ein Gradient oder eine Anzahl von Rechenschritten (iterations) festgelegt werden. In der Regel ist der Gradient das ausschlaggebende Kriterium.

Für die Durchführung einer Energieminimierung ergibt sich hieraus, dass zuerst mit der *steepest descent*-Methode eine grobe Minimierung durchgeführt und anschließend mit der *conjugate gradient*-Methode eine Feinminimierung erstellt wird. Hierzu werden zumeist auch die Konvergenzkriterien enger gesetzt.

### 3.1.2 Energieterme, Parameter und äußere Krafteinwirkungen

Das eigentliche Kraftfeld wird durch zwei Komponenten definiert:

1. Durch die Definition seiner Energiepotentiale und die daraus abzuleitenden Kräfte.
2. Durch die Parameter, die zur Lösung der einzelnen Potentiale benötigt werden.

Im GROMOS 96 Kraftfeld werden diese Potentialfunktionen mit ihren zugehörigen Parametern in drei Gruppen eingeteilt:

1. *Non-Bonded*: Hierbei werden Interaktionen beschrieben, bei denen Atome oder andere Partikel nicht direkt miteinander verbunden sind. Dazu gehören Lennard-Jones- oder Buckingham-, Coulomb- oder modified Coulomb-Potentiale. Diese Interaktionen werden durch eine sog. *neighbour list*, einer Liste nicht bindender Atome und deren Wirkungsradius definiert.
2. *Bonded*: Zu diesen Interaktionen gehören kovalente Bindungs-Streckschwingungen (*covalent bond stretching*), Winkeldeformationsschwingungen (*angle bending*), Diedertorsions-Barrieren (*proper dihedrals*) und die sog. *improper dihedrals*. Unter *improper dihedrals* fallen Potentiale für die Definition planarer Molekülgruppen (z.B. in aromatischen Strukturen) und die Definition von chiralen Systemen.
3. *Specials*: Hier sind die sog. *position* und *distance restraints* zu nennen. Dabei werden entweder für die Position oder den Abstand bestimmter Atome Kräfte festgelegt, damit diese während einer Berechnung sich nur in einem bestimmten Rahmen verändern können.

Zur Adaption des Kraftfeldes an die speziellen Gegebenheiten der zu berechnenden Systeme mussten die folgenden Potentiale verändert oder angepasst werden. Bei den *non bonded*-Potentialen zur Berechnung langreichender elektrostatischer Wechselwirkungen wurde immer das modifizierte Coulomb-Potential der Particle Mesh-Ewald-Methode verwendet, da diese wesentlich präziser ist, als das im GROMACS implementierte Coulomb-Potential. Bei den *bonded*-Potentialen musste neben dem harmonischen Potential auch auf das anharmonische Morse-Potential zurückgegriffen werden. Des Weiteren waren für viele Rechnungen bestimmte Definitionen von *distance* und *position restraints* notwendig.

### 3.1.2.1 Particle Mesh-Ewald (PME)

PME ist eine weiter entwickelte Ewald-Methode (siehe Formel 3.1) [10–13] zur Berechnung lang reichender elektrostatischer Wechselwirkungen in großen Systemen, bei der die reziproke Summe  $V_{rec}$  mit einem particle mesh-Ansatz gelöst wird. Die direkte Summe  $V_{dir}$  und der Eigenterm  $V_0$  stammen noch vom ursprünglichen Ewald-Ansatz.

$$V_{Ewald} = V_{dir} + V_{rec} + V_0 \quad (3.1)$$

Die direkte Summe beschreibt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Atomen  $i$  und  $j$  bis zu einem maximalen Abstand von  $r$ .

$$V_{dir} = \frac{f}{2} \sum_{ij} \sum_{n_x} \sum_{n_y} \sum_{n_z^*} q_i q_j \frac{\text{erfc}(\beta r_{ij,n})}{r_{ij,n}} \quad (3.2)$$

$q_i$  und  $q_j$  sind die Partialladungen der Atome  $i$  und  $j$ .  $f$  ist der elektronische Umwandlungsfaktor  $f = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} = 138,935485(9) \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm e}^{-2}$ .  $(n_x, n_y, n_z) = n$  ist der box index-Vektor und der Stern deutet an, dass Terme mit  $i = j$  übergangen werden sollen, wenn  $(n_x, n_y, n_z) = (0, 0, 0)$ . Der Ausdruck  $r_{ij,n}$  ist der reale Abstand zwischen den Ladungen.  $\beta$  stellt einen Wichtungsfaktor zwischen den einzelnen Summen dar.

Die Eigensumme  $V_0$  ist ein Skalierungsterm und dient dazu, dass sich ein Atom bei periodischen Randbedingungen nicht mit sich selbst addiert.

$$V_0 = -\frac{f\beta}{\sqrt{\pi}} \sum_i q_i^2 \quad (3.3)$$

In der reziproken Summe  $V_{rec}$  werden alle Wechselwirkungen ausserhalb des in der direkten Summe definierten Abstandes berechnet.

$$V_{rec} = \frac{1}{2} \sum_{m_1=0}^{K_1-1} \sum_{m_2=0}^{K_2-1} \sum_{m_3=0}^{K_3-1} Q(m_1, m_2, m_3) \cdot (\Psi_{rec} * Q)(m_1, m_2, m_3) \quad (3.4)$$

Dabei stellt die Matrix  $Q$  mit den Dimensionen  $K_1 \times K_2 \times K_3$  ein gleichförmiges Gitter dar, welches die komplette Simulationszelle ausfüllt. Auf dieses Gitter werden alle Punktladungen aus dem entsprechenden Sektor interpoliert. Mit Hilfe dieser Interpolationsfaktoren der Matrix  $Q$  wird dann die Wechselwirkungsenergie jedes Atoms außerhalb des Cut-offs berechnet. Für die Verwendung der Matrix spricht, dass der Algorithmus

mus nur mit  $N \log(N)$  skaliert und damit wesentlich effektiver ist als die herkömmliche Ewald-Methode, bei der die reziproke Summe mit  $N^2$  skaliert.

### 3.1.2.2 Bindungs-Streckschwingung

**Harmonische Schwingung:** Beim harmonischen Schwingungspotential kann die Streck-schwingung zwischen den Atomen  $i$  und  $j$  durch eine Parabel wie folgt beschrieben werden:

$$V_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2 \quad (3.5)$$

Die entsprechende Kraftgleichung lautet:

$$\vec{F}_i(\vec{r}_{ij}) = k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij}) \frac{\vec{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (3.6)$$

Dabei bestimmt der Parameter  $k_{ij}^b$  als Kraftkonstante, welche Kraft auf die Bindung einwirken muss, um diese um einen Nanometer aus der idealen Bindungslänge  $b_{ij}$  der beiden Atome  $i$  und  $j$  auszulenken.

**Fourth power potential** Im GROMOS 96 Kraftfeld wird aus Gründen der Effizienz die folgende Formel zur Berechnung des Streckschwingungspotentials verwendet:

$$V_b(r_{ij}) = \frac{1}{4} k_{ij}^b (r_{ij}^2 - b_{ij}^2)^2 \quad (3.7)$$

Die entsprechende Kraftgleichung lautet:

$$\vec{F}_i(\vec{r}_{ij}) = k_{ij}^b (r_{ij}^2 - b_{ij}^2) \vec{r}_{ij} \quad (3.8)$$

Dabei hängt die hierbei verwendete Kraftkonstante wie folgt von der im harmonischen Potential verwendeten Kraftkonstante  $k^{b,harm}$  ab:

$$2k^b b_{ij}^2 = k^{b,harm}$$

**Morse-Potential:** Das Morse-Potential bietet im Vergleich zum harmonischen Potential eine präzisere Beschreibung chemischer Bindungen. Im Gegensatz zum harmonischen Potential hat das Morse-Potential einen asymmetrischen Potentialtopf, da die

Kraft (Steigung) ab einem gewissen Abstand auf Null sinkt. Die funktionelle Form dieses Potentials lautet:

$$V_{morse}(r_{ij}) = D_{ij}[1 - \exp(-\beta_{ij}(r_{ij} - b_{ij}))]^2 \quad (3.9)$$

Zur Definition des Potentials sind drei Parameter notwendig:  $D_{ij}$  bestimmt die Tiefe des Potentialtopfes in kJ/mol,  $\beta_{ij}$  die Steilheit oder die Breite des Topfes und  $b_{ij}$  den Gleichgewichtsabstand zwischen den Atomen  $i$  und  $j$ .

Der Verlauf des Potentials ist in Kapitel 18 Abbildung 18.2 dargestellt.

### 3.1.2.3 Position Restraints

Dieses Potential wird genutzt, um Partikel an einer bestimmten Position  $R_i$  mit der Kraft  $k_{pr}$  zu fixieren. Hierzu wird folgende Gleichung benutzt:

$$V_{pr}(r_i) = \frac{1}{2}k_{pr}|r_i - R_i|^2 \quad (3.10)$$

oder allgemeiner für alle Raumkoordinaten formuliert:

$$V_{pr}(r_i) = \frac{1}{2}[k_{pr}^x(x_i - X_i)^2\hat{x} + k_{pr}^y(y_i - Y_i)^2\hat{y} + k_{pr}^z(z_i - Z_i)^2\hat{z}] \quad (3.11)$$

Auf diese Weise können Partikel nicht nur an bestimmten Positionen, sondern auch auf Ebenen oder Geraden fixiert werden, da für jede räumliche Dimension folgende Kräfte separat zu berechnen sind:

$$\begin{aligned} F_i^x &= -k_{pr}^x(x_i - X_i) \\ F_i^y &= -k_{pr}^y(y_i - Y_i) \\ F_i^z &= -k_{pr}^z(z_i - Z_i) \end{aligned} \quad (3.12)$$

Alle Atome, auf die ein *position restraint* angewendet werden soll, müssen in einer speziellen Liste aufgeführt werden. Dort werden auch die Kräfte für jede Raumrichtung definiert.

### 3.1.2.4 Distance Restraints

Um den Abstand ( $r_{ij}$ ) der Atome  $i$  und  $j$  zwischen bestimmten Schwellenwerten halten zu können, werden mittels *distance restraints* Strafpotentiale auf diese Atome gesetzt. Damit aber die Beweglichkeit der Atome nicht zu sehr eingeschränkt wird, ist es im Gegensatz zu den *position restraints* erforderlich, unterschiedliche Potentialabschnitte zu definieren.

Daher wird, falls die Atome sich zu nahe kommen und der Abstand kleiner  $r_0$  wird, ein quadratisches Potential verwendet. Im Bereich zwischen  $r_0$  und  $r_1$  bewegen sich die Atome ohne das Potential des *distance restraints*. Wird der Abstand größer als  $r_1$ , so wird wieder ein quadratisches Potential definiert. Reicht dieses Potential nicht aus und der Abstand überschreitet den Wert  $r_2$ , wird statt des quadratischen ein linear steigendes Potential verwendet. Die Potentiale berechnen sich wie folgt:

$$V_{dr}(r_{ij}) = \begin{cases} \frac{1}{2}k_{dr}(r_{ij} - r_0)^2 & \text{für } r_{ij} < r_0 \\ 0 & \text{für } r_0 \leq r_{ij} < r_1 \\ \frac{1}{2}k_{dr}(r_{ij} - r_1)^2 & \text{für } r_1 \leq r_{ij} < r_2 \\ \frac{1}{2}k_{dr}(r_2 - r_1)(2r_{ij} - r_2 - r_1) & \text{für } r_2 \leq r_{ij} \end{cases} \quad (3.13)$$

Über die Kraftkonstante  $k_{dr}$  wird die Steilheit des jeweiligen Potentials definiert und somit die Rigidität der Abstände bestimmt.

### 3.1.3 Energiegruppen

Energiegruppen sind allgemeiner definierte Potentiale und dienen dazu, während einer GROMACS-Moleküldynamik oder deren Analyse bestimmten Atomclustern spezifische Eigenschaften zuzuweisen. Dazu werden die Atome eines Systems in Gruppen eingeteilt. Maximal 256 Gruppen können definiert werden; diese müssen mindestens einer der folgenden vier Klassen angehören:

**T-Coupling group:** Darin werden die Temperatur-Kopplungsparameter (Referenztemperatur, Zeit, Anzahl der Freiheitsgrade) für jede Gruppe separat definiert.

**Freeze group:** Atome in dieser Gruppe werden während einer Dynamik festgehalten.

**Accelerate group:** Auf jedes Atom einer „*accelerate group*“ wird eine Beschleunigung  $a$  gesetzt, welche einer externen Kraft gleich kommt. Auf diese Weise kann ei-



ne Dynamik in einem non-equilibrium-Zustand berechnet werden und somit die Simulation von Transporteigenschaften ermöglichen.

**Energy monitoring group:** Während einer Simulation werden alle wechselseitigen Interaktionen zwischen den einzelnen Energiemonitoring-Gruppen aufgezeichnet. Das geschieht getrennt für Lennard-Jones- und Coulomb-Terme. Da 256 Gruppen definierbar sind, wären so für jeden Energie-Term 256 x 256 Berechnungen erforderlich. Da Energieberechnungen aber der aufwendigste Teil einer Simulation sind, sollte diese Möglichkeit nur sehr sparsam genutzt werden. Interessanter beim Energiemonitoring ist die Möglichkeit, Energien aus der Analyse zu entfernen, um dadurch die Simulation deutlich zu beschleunigen.

## 3.2 Dichtefunktionaltheorie (DFT)

Die Dichtefunktionaltheorie (DFT) wurde vor mehr als 30 Jahren zur Berechnung elektronischer Strukturen von Festkörpern, Oberflächen und deren Defekten entwickelt. Erst in den letzten Jahren gewann die Berechnung physikalischer Eigenschaften von Molekülen mittels DFT an Bedeutung. Heute ist die DFT eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur exakten Beschreibung von Molekülen.

Streng genommen ist die DFT keine allein stehende Methode. Sie setzt sich vielmehr aus einer ganzen Reihe von Modellen (Funktionalen) zusammen, die alle versuchen, die Elektronendichte von Molekülen möglichst exakt zu beschreiben. Dabei ist es kaum möglich, die DFT einer bestimmten Gruppe von Methoden zuzuordnen. Da das Austausch<sup>1</sup>-Korrelationsintegral<sup>2</sup> nicht exakt bestimmt werden kann, wird die DFT nicht zu den ab initio-Methoden gezählt. Weil aber auch keine Integrale vernachlässigt werden und die Parameter nicht molekulspezifisch sind, kann man die DFT ebenso wenig den semiempirischen Methoden zuordnen.

Es ist bei der DFT von Vorteil, dass sie im Gegensatz zum Hartree Fock (HF)-Ansatz prinzipiell ermöglicht, die exakte Energie eines Moleküls zu berechnen, sofern das Austausch-Korrelations-Potential bekannt ist. Darüber hinaus ist die DFT im allgemeinen schneller als korrelierte ab-initio Methoden [14].

---

<sup>1</sup>siehe Glossar

<sup>2</sup>siehe Glossar

### 3.2.1 Ansatz der Dichtefunktionaltheorie

Die grundlegende Idee für alle DFT-Methoden beruht darauf, die elektronische Struktur von Molekülen nicht über Ein- oder Mehrelektronenwellenfunktionen zu beschreiben, sondern sie auf die Verteilung der Elektronendichte  $\rho(r)$  zurückzuführen [15].

$$\rho(r) = N \int \cdots \int |\Psi(x_1, x_2, x_3, \cdots, x_N)|^2 dx_2 \cdots dx_N \quad (3.14)$$

Voraussetzung dafür ist die in Gleichung 3.14 gezeigte Abhängigkeit der Elektronendichte  $\rho(r)$  von der Wellenfunktion  $\Psi$ . Dabei enthält  $x_i$  sowohl Raum- als auch Spinkoordinaten.

$$\int \rho(r) d(r) = N \quad (3.15)$$

Mit der Gleichung 3.15 wird gezeigt, dass man durch Integration über den gesamten Raum die Anzahl der Elektronen  $N$  erhält.

Die Elektronendichte muss, wie in Gleichung 3.16 gezeigt wird, für sehr große Abstände  $r_1$  eines Elektrons das erste Ionisierungspotential  $I.P.$  beschreiben.

$$\lim_{r_1 \rightarrow \infty} \rho(r_1) = \exp(-\sqrt{2I.P.}r_1) \quad (3.16)$$

Definiert man danach die Energie in Abhängigkeit der Elektronendichte  $\rho$ , erhält man für die Energie folgende Gleichung:

$$E \equiv E[\rho] = V_{Ke}[\rho] + T_e[\rho] + V_{ee}[\rho] \quad (3.17)$$

$V_{Ke}$  beschreibt die Anziehung zwischen Kern-Elektronen,  $V_{ee}$  die Elektron-Elektron-Abstoßung und  $T_e$  die kinetische Energie der Elektronen. Dabei gilt für  $V_{Ke}$ :

$$V_{Ke} = \int \rho(r)v(r)dr \quad (3.18)$$

$v(r)$  benennt das externe Potential der Atomkerne. Für die Wechselwirkung zwischen den Elektronen  $V_{ee}$  lässt sich die Energie als klassische Coulomb-Abstoßung  $J[\rho]$  beschreiben, die mit folgender Gleichung berechenbar wird:

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{1}{r_{12}} \rho(r_1)\rho(r_2)dr_1dr_2 \quad (3.19)$$

Die Elektronendichte  $\rho(r)$  lässt sich, wie Kohn und Sham [16] zeigten, als  $N$  nicht wechselwirkende Elektronen in einem Eielektronenpotential beschreiben. Mittels dieses Potentials wird dann mit den Orbitalen  $\phi(r)$  die gesamte Dichte der unabhängigen Elektronen so beschrieben, dass sie der Dichte des wechselwirkenden Systems entspricht.

$$\rho(r) = \sum_i^N |\phi_i(r)|^2 \quad (3.20)$$

Die kinetische Energie  $T_s[\rho]$  der nicht wechselwirkenden Elektronen lässt sich nach Kohn und Sham wie folgt formulieren:

$$T_s = \sum_i \int \phi_i^* \left(-\frac{1}{2}\nabla^2\right) \phi_i d\tau \quad (3.21)$$

Nun können die Gleichungen 3.18, 3.19 und 3.21 in den Ausdruck 3.17 eingesetzt werden. Daraus ergibt sich für die Energie des Systems eine Gleichung (3.22), bei der durch gleichzeitige Addition und Subtraktion von  $T_s[\rho]$  und  $J[\rho]$  in verschiedenen Termen das Austausch-Korrelationsfunktional  $E_{xc}[\rho]$  definiert werden kann. Nach dieser Definition setzt sich die Austausch-Korrelationenergie  $E_{xc}[\rho]$  aus der Zwei-Elektronen-Austauschwechselwirkung, aus der dynamischen Elektronenkorrelation und einem Korrekturterm zur kinetischen Energie zusammen.

$$\begin{aligned} E[\rho] &= \int \rho(r)v(r)dr + T_s[\rho] + J[\rho] + (T_e[\rho] - T_s[\rho]) + (V_{ee}[\rho] - J[\rho]) \\ &= \int \rho(r)v(r)dr + T_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \end{aligned} \quad (3.22)$$

Demnach gilt für  $E_{xc}[\rho]$  folgende Beziehung:

$$E_{xc}[\rho] = (T_e[\rho] - T_s[\rho]) + (V_{ee}[\rho] - J[\rho]) \quad (3.23)$$

Durch Differenzierung nach der Elektronendichte erhält man ein Austausch-Korrelations-Potential  $v_{xc}(r)$  mit folgender Gleichung:

$$v_{xc} = \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(r)} \quad (3.24)$$

Danach werden Eielektronen- oder Kohn-Sham-Orbitale  $\phi_i(r)$  mittels Gleichung (3.25)

berechnet.

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{xc}\right]\phi_i(r) = \varepsilon_i\phi(r) \quad (3.25)$$

Mit Hilfe der vorgestellten Gleichungen kann demnach ein Mehrelektronensystem mit Wechselwirkungen als ein System ohne Wechselwirkungen beschrieben werden. Dies gilt allerdings nur für Systeme im elektronischen Grundzustand.

Mit der DFT ließe sich demzufolge die exakte Grundzustandsenergie berechnen, wenn das exakte Austausch-Korrelations-Potential bekannt wäre.

### 3.2.2 Bestimmung der Austausch-Korrelationsenergie $E_{xc}$

Da bisher noch keine vollständige Beschreibung der Austausch-Korrelationsenergie bekannt ist, wurden im Laufe der Zeit mehrere unterschiedliche Ansätze (Funktionale) zur Lösung dieses Problems entwickelt. Im folgenden Abschnitt sollen nur die in dieser Arbeit verwendeten Funktionale beschrieben werden.

Da es für  $E_{xc}$  keine iterative Lösungsmöglichkeit gibt, kommen bei der DFT unterschiedliche Modelle zur Problemlösung zum Einsatz. Nachteil dieser Modelle ist, dass sie auf Parameter angewiesen sind. Die Parameter lassen sich allerdings durch experimentelle Daten oder durch ab initio-Methoden bestimmen.

Eines der einfachsten Modelle, die *local density approximation* (LDA-Näherung), basiert auf der Vorstellung eines homogen in einem Würfel verteilten Elektronengases und einer homogen positiven Ladungsverteilung. Dieses ist zur Erhaltung der Elektroneutralität notwendig und lässt sich als Funktional genau beschreiben. Dabei ist es üblich,  $E_{xc}$  in den Austausch- ( $E_x$ ) und den Korrelationsanteil ( $E_c$ ) zu zerlegen.

$$E_{xc} = E_x[\rho] + E_c[\rho] \quad (3.26)$$

Der Austauschanteil für die LDA, der auch Dirac-Austauschterm genannt wird, sieht wie folgt aus:

$$E_x[\rho] = -\frac{3}{4}\left(\frac{3}{\pi}\right)^{\frac{1}{3}} \int \rho(r)^{\frac{4}{3}} dr \quad (3.27)$$

Da die auf der LDA-Näherung basierenden Rechnungen die Stärke von Bindungen zu groß wiedergeben, wurden sog. Gradienten-korrigierte Funktionale eingeführt. Bei diesen auch *generalisierte Gradienten-Approximation* (GGA) genannten Funktionalen geht man von einem inhomogenen Elektronengas aus. Hierfür müssen zur Berechnung

der Austausch-Korrelations-Funktionale neben der Dichte auch die Dichte-Gradienten ( $\nabla\rho$ ) berücksichtigt werden.

$$E_{xc}^{GGA}[\rho^{\alpha\beta}] = \int dr f(\rho^\alpha, \rho^\beta, \nabla\rho^\alpha, \nabla\rho^\beta) \quad (3.28)$$

Für die Korrelationsenergie wird heute das nach seinen Entwicklern Lee, Yang und Parr genannte *LYP*-Funktional am häufigsten verwendet [17, 18]. Hierbei geht man von der korrelierten Wellenfunktion für ein Zweielektronensystem aus, die neben dem Gradienten auch Terme mit der zweiten Ableitung der Elektronendichte enthält.

Als Austauschterm wird häufig der Becke 88-Austausch verwendet [19]. Da die Austauschenergie den größten Teil der Austausch-Korrelations-Energie ausmacht, sollte sie möglichst genau beschrieben werden. Der von Becke eingeführte Austauschterm  $\Delta_x^{B88}$  enthält, wie in Gleichung 3.29 gezeigt wird, einen  $\beta$ -Term. Dieser Term wurde so definiert, dass die Summe aus *LDA*- und Becke-Austausch der Austauschenergie der sechs Edelgase (Helium bis Radon) entspricht. Der Dichtegradient  $\nabla\rho$  wurde eingeführt, um der Gleichung 3.16 zu entsprechen. Erst danach wird das asymptotische Verhalten der Dichte korrekt wiedergegeben.

$$\begin{aligned} \epsilon_x^{B88} &= \epsilon_x^{LDA} + \Delta_x^{B88} \\ \Delta_x^{B88} &= \beta \rho^{\frac{1}{3}} \frac{x^2}{1 - 6\beta \sinh^{-1} x} \\ x &= \frac{\nabla\rho}{\rho^{\frac{4}{3}}} \end{aligned} \quad (3.29)$$

Durch die Kombination des Becke-Austauschfunktionals mit einem Gradienten-korrigierten Korrelationsfunktional lassen sich die Ergebnisse weiter verbessern. Häufig kommt hierfür eine Kombination des Becke-Austausches mit dem Lee, Yang und Parr-Korrelationsfunktional, auch *BLYP* genannt, zum Einsatz.

Weitere Verbesserungen brachten die sog. Hybrid-Funktionale. Das bekannteste Funktional dieser Gruppe ist wahrscheinlich das Becke-3-Funktional *B3* [20].

$$E_{xc}^{B3} = (1 - a) \cdot E_x^{LDA} + a \cdot E_x^{exakt} + b \cdot \Delta E_x^{B88} + E_c^{LDA} + c \cdot \Delta E_c^{GGA} \quad (3.30)$$

Der Name Hybrid-Funktional rührt daher, dass neben den Austausch- und Korrelationsenergien ( $E_x^{LDA}, E_c^{LDA}$ ) des *LDA*-Funktionals, dem Austauschterm  $E_x^{B88}$  des Becke-Funktionals und dem Gradienten-Korrekturterm  $\Delta E_c^{GGA}$  auch ein Hartree-Fock und damit die exakte Hartree-Fock-Austauschenergie in diesem Funktional enthalten ist. Al-

le diese Terme werden durch die Koeffizienten  $a$ ,  $b$  und  $c$  unterschiedlich gewichtet. Die Koeffizienten wurden durch Fit an experimentellen Daten ermittelt. Heute stellt das Hybrid-Funktional *B3LYP* eines der am häufigsten verwendeten Funktionale dar.

# Kapitel 4

## Methoden zu Analyse und Bau von Molekülsystemen

In den folgenden Abschnitten werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zum Bau und zur Analyse von Molekülen vorgestellt.

### 4.1 Sekundärstrukturvorhersage mit PSIPred

PSIPred ist ein Sekundärstrukturvorhersage-Programm, das im Internet unter der Adresse <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> zu erreichen ist.

Das PSIPred-Programm besteht aus einem neuronalen Netz zur Interpretation eines Profil-Alignments. Die Vorgehensweise des Programms ist wie folgt:

1. Zunächst wird für jede bekannte 3D-Struktur ein Profil mit BLASTP [21] erstellt. Die Datenbank enthält dabei nur nicht redundante Proteinsequenzen. Bereiche mit geringem Informationsgehalt werden entfernt.
2. Es erfolgt die Erzeugung eines Alignments zwischen Eingabesequenz und dem im Schritt 1 generierten Profil über eine dynamische Programmierung.
3. Unter Verwendung wissensbasierter Energiepotentiale wird das Alignment aus Schritt 2 bewertet.
4. Aus den vorhergehenden Schritten werden sechs Parameter abgeleitet:

- (a) Qualität für das Sequenz-Profil-Alignment aus Schritt 2,
- (b) Länge der Eingabesequenz,
- (c) Länge der Proteinsequenz des Templates (Vergleichsstruktur),
- (d) Summe der paarweisen Energien aus Schritt 3,
- (e) Summe der Solvatationsenergien,
- (f) Zahl der im Alignment verwendeten Positionen.

5. Mit Hilfe eines neuronalen Netzes wird entschieden, ob das untersuchte Target-Template-Paar eine gemeinsame Struktur besitzt.

Die außerordentliche Zuverlässigkeit dieser Alignment-Methode ist hervorzuheben. Vorhersagen, die durch das Netzwerk als sicher („certain“) bezeichnet werden, enthalten keine falsch-positiven Treffer. Die Vorhersagequalität liegt bei 80,1 %, womit PSIpred die zur Zeit qualitativ beste Vorhersage-Methode ist, allerdings nur unter der Voraussetzung, dass genügend homologe Sequenzen gefunden werden [21, 22].

## 4.2 Homologiemodelling

Für den Bau von Proteinmodellstrukturen wurde das Programmpaket INSIGHTII verwendet. Dieses bietet mit dem integrierten Modul HOMOLOGY die Möglichkeit von Sequenzalignments auf der Grundlage unterschiedlicher Datenmatrices. Daneben können auch anderweitig erzeugte Alignments manuell überarbeitet werden.

Innerhalb dieses Alignments werden strukturkonservierte Bereiche definiert. Für diese Bereiche werden die Koordinaten der Kristallstruktur auf die Atome der entsprechenden Sequenzbereiche des zu modellierenden Proteins übertragen. Dazu wird ein gemeinsames System erstellt, in das die Koordinaten der Referenzstruktur (Kristallstruktur) auf die Atome der zu modellierenden Sequenz kopiert werden. Bei identischen Aminosäuren werden alle Koordinaten der Referenz verwendet. Müssen sie auf unterschiedliche Aminosäuren bezogen werden, sind nur die Koordinaten des Proteinerückgrates direkt übertragbar. Bei den Seitenketten werden sie je nach deren Struktur so gut wie möglich an die Vorlage angepasst [1].

Für Sequenzabschnitte, für die das Programm keine Koordinaten im Referenzmolekül findet, sog. Loops, stellt das Programmpaket INSIGHTII eine weitere Methode, den sog.



**Loop search**, zur Verfügung. Dieser *Loop search* durchsucht die PDB-Datenbank nach einer passenden Struktur [23]. Als Suchkriterien werden die an Loopbereiche angrenzenden strukturkonservierten Bereiche verwendet. Dazu wird eine Distanzmatrix der Koordinaten der C $\alpha$ -Atome unterschiedlicher Aminosäuren vor und nach der entsprechenden Loop-Struktur („pre und post Flex-Region“) gebildet. Über die Länge der pre und post Flex-Region kann die Präzision der Suche variiert werden; je langkettiger die beiden Bereiche sind, um so höher ist die Präzision der Suche. Mit Hilfe einer solchen Matrix wird in der PDB-Datenbank nach Proteinstrukturen gesucht, die die geforderten Bedingungen erfüllen. Zehn Strukturen, bei denen die Distanzen sowohl innerhalb als auch zwischen den pre und post Flex-Regionen am besten mit der Referenzstruktur übereinstimmen, werden in INSIGHTII aufgelistet und stehen einer visuellen Beurteilung zur Verfügung.

Einen ersten Anhaltspunkt für die Güte der gefundenen Struktur liefert der nach Gleichung 4.1 berechnete RMS-Wert. Dieser ist definiert als Wurzel der Abstandsquadrate zwischen den Koordinaten  $(x, y, z)$  der zu untersuchenden Struktur und den Koordinaten  $(x_0, y_0, z_0)$  der Referenzstruktur.  $N$  entspricht der Anzahl der in der pre und post Flex-Regionen enthaltenen Aminosäuren.

$$RMS = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + (z - z_0)^2}{N}} \quad (4.1)$$

Je kleiner der RMS-Wert, um so besser stimmen die Strukturen überein. Danach aber müssen alle gefundenen Loop-Strukturen visuell kontrolliert werden, da es in der PDB-Datenbank auch Strukturen gibt, bei denen das Proteinerückgrat unterbrochen ist und dadurch falsch-positive Treffer erzeugt werden könnten.

Ist eine passende Loop-Struktur gefunden, werden die Koordinaten dieser Struktur übernommen. Das geschieht nach dem gleichen Verfahren wie bei den konservierten Strukturbereichen.

Da die Loop-Strukturen und die Strukturen der konservierten Bereiche aus unterschiedlichen Proteinen stammen, ergeben sich für die Peptidbindungen zwischen diesen Bereichen häufig ungünstige Geometrien und damit extrem hohe Bindungsenergien. Daher ist es erforderlich, die Peptid-Bindungen zwischen den unterschiedlichen Bereichen separat zu optimieren. Hierfür stellt INSIGHTII die „**Splice Repair**“-Routine zur Verfügung.

Bei der *Splice Repair*-Routine wird nur der Übergang zwischen zwei Bereichen mini-

miert. Auf der Seite des konservierten Strukturbereichs werden nur die direkt angrenzenden Aminosäuren minimiert, während in Loop-Bereichen neben der angrenzenden auch die darauf folgende Aminosäure in die Geometrieminimierung einfließt. Die restlichen Atome des Proteins werden fixiert. Der fixierte Teil verändert sich nicht und wird auch nicht in die Energieberechnung einbezogen.

### 4.3 Überprüfung der Proteingeometrie mit PROCHECK

In natürlichen Strukturen werden nicht alle theoretisch möglichen Konformationen von Proteinmolekülen beobachtet. Aus diesem Grund muss überprüft werden, ob alle erstellten Proteinmodelle sich in diesem natürlich erlaubten Konformationsraum aufhalten. In dieser Arbeit wurde dazu das Programmpaket PROCHECK genutzt [24, 25].

Dieses Programmpaket besteht aus mehreren Routinen, die es ermöglichen, alle wichtigen Strukturparameter zu überprüfen und die Ergebnisse grafisch darzustellen.

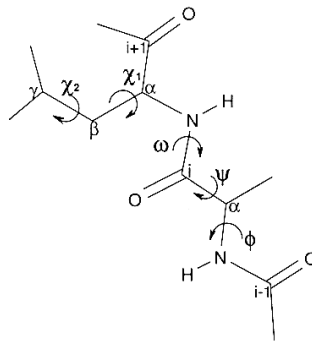
Zur Beurteilung der meisten Parameter sind in den jeweiligen Routinen Datenbanken implementiert, die für jede Aminosäure die in natürlichen Strukturen vorkommenden Konformationen enthalten [26, 27].

Als Eingangsdaten benötigt PROCHECK neben der Struktur auch deren Auflösung. Die Auflösung bestimmt, wie weit sich die einzelne Aminosäure von den spektroskopisch gefundenen Optimalwerten entfernen darf. Auflösungen von  $2 \pm 0.5 \text{ \AA}$  gelten als Standard, da erst in diesem Bereich auch die Seitenkettenkonformationen in röntgenkristallografischen Messungen zu erkennen sind [28].

In PROCHECK wird die Güte der zu überprüfenden Struktur durch sog. G-Faktoren dargestellt. Dabei gilt: Liegen die Abweichungen innerhalb der geforderten Parameter, bewegt sich der G-Faktor zwischen 0 und -0.5; nahe der Toleranzwerte liegen die Faktoren zwischen -0,5 und -1. Alle unter -1 liegenden G-Faktoren beschreiben Strukturen, die inakzeptabel weit von den Toleranzwerten entfernt sind.

Folgende Parameter werden von PROCHECK überprüft:

**Bindungslängen, Bindungswinkel:** Da Bindungslängen und -winkel in der Regel in spektroskopischen Messungen nur geringe Abweichungen zeigen, werden diese in



**Abbildung 4.1:** Darstellung und Bezeichnung der Diederwinkel in Proteinen

PROCHECK auch dementsprechend hart bewertet [29]. Bei der Bindungslänge liegen Abweichungen von maximal  $0,05 \text{ \AA}$  und bei den  $\omega$ -Winkeln von maximal  $10^\circ$  innerhalb der Toleranz.

**Planarität der  $\omega$ -Winkel:** Der  $\omega$ -Winkel ist der Diederwinkel der Peptidbindung und sollte im Idealfall  $180^\circ$  betragen. Die maximal tolerierte Standardabweichung beträgt in PROCHECK  $5,8^\circ$ .

**Vorkommen von cis-Peptiden:** Nur in 0,05 % aller bisher bekannten Peptidstrukturen kommen cis-Peptide vor. Ausnahme sind Proline, die mit 5 % deutlich häufiger als alle anderen Aminosäuren in der cis-Konformation vorkommen.

**$\Phi$  - $\Psi$ - Winkelverteilung (Ramachandran-Plot):** Der Ramachandran-Plot [30] ist einer der wichtigsten Qualitätsparameter für die Struktur von Proteinen. Denn je nach benachbarter Aminosäure sind nur bestimmte  $\Phi$  bzw.  $\Psi$ -Winkel möglich, da es sonst zu energetisch ungünstigen van-der-Waals-Kontakten zwischen nicht kovalent gebundenen Nachbaratomen kommen würde. Ramachandran et. al. haben durch Untersuchung des Konformationsraums aller möglichen Dipeptide die Verteilung der energetisch erlaubten  $\Phi$  und  $\Psi$ -Winkel ermittelt. Aus diesen Daten kann der sog. Ramachandran-Plot, ein zwei-dimensionaler Graph, erstellt werden. Dieser Graph gibt die typischen Winkelverteilungen aller wichtigen Sekundärstrukturen wieder, da diese nur in bestimmten Regionen des Plots auftauchen. Man spricht dann von Regionen der Ramachandran-Plots. In der Regel werden vier Regioqualitäten unterschieden: Die *favorisierten* Regio-

nen stellen Strukturen dar, in denen Aminosäuren praktisch die Idealwinkel einnehmen. Bei geringen Abweichungen fallen die Aminosäuren in die sog. *erlaubten* Regionen. Weichen die Winkel stärker ab, werden diese durch die *noch erlaubten* Regionen beschrieben. Beschreiben Aminosäuren Winkel, die nicht in natürlichen Proteinen vorkommen, liegen diese in den *verbotenen* Regionen [31, 32].

Treten Konformationen von Aminosäuren außerhalb der favorisierten Regionen, in sog. unerlaubten Regionen auf, kennzeichnet das energetisch ungünstige und damit in der Regel unrealistische Strukturen.

Ausnahmen davon bilden wegen ihrer besonderen Struktur Glycin und Prolin. Für diese Aminosäuren müssen separate Plots erstellt werden, da sich die Verteilung der erlaubten und nichterlaubten Regionen drastisch von den anderen Aminosäuren unterscheidet.

**Wasserstoffbrücken (H-Brücken):** Das PROCHECK-Programmpaket ermittelt H-Brücken nach der Methode von Kabsch und Sander [31]. Bei dieser Methode sind alle bisher in Proteinen bekannten H-Brücken-Geometrien in einer Datenbank erfasst. Die Energie der Struktur wird in Abhängigkeit von unterschiedlichen Auflösungsfaktoren ermittelt. Die Präzision der Auflösung bestimmt die Genauigkeit der Geometrie, in der eine H-Brücke vorliegen muss, um noch als solche erkannt zu werden. Durch die Anordnung mehrerer H-Brücken zueinander kann auf das Vorhandensein bestimmter Sekundärstrukturen geschlossen werden.

**Unerlaubte Van-der-Waals-Kontakte:** Nähern sich zwei nicht kovalent gebundene Atome auf unter  $2,6 \text{ \AA}$ , so bezeichnet man das als schlechten Kontakt (bad contact). Grund dafür ist eine erfolgende Überlappung der van-der-Waals-Radien, die zu einer starken Erhöhung der Lennard-Jones-Energie führt. Strukturen mit einer auf diese Weise erhöhten Energie sind normalerweise ungünstig und müssen daher weiter bearbeitet werden.

**$\chi_1$ - $\chi_2$ -Winkel:** Analog zur der Arbeit von Ramachandran entdeckten Ponder und Richards [25, 33], dass auch die Seitenketten nur bestimmte Diederwinkel annehmen können. Diese Winkel sind ebenfalls in PROCHECK über eine Datenbank verfügbar und können in ähnlichen Graphen wie der Ramachandran-Plot dargestellt werden.

**Planarität bestimmter Seitenketten:** Da eine Reihe von Aminosäuren planare Strukturelemente in den Seitenketten besitzen, können oder müssen diese ebenso auf Einhaltung der Planarität überprüft werden. Hierbei gelten für aromatische Aminosäuren (Tyr, Phe, Trp, His) maximale Abweichungen von 0,03 Å, für die kleineren, nicht aromatischen Seitenketten (Asp, Arg, Gln, Glu) sogar nur 0,02 Å als Maximalwert.

## 4.4 Root mean square deviation (RMSD)

Für die Berechnung der Abweichung der Betragsquadratwurzel wird unter GROMACS die Routine `g_rms` verwendet [9]. Die zu analysierende Struktur wird mit einer Referenz (bei  $t_2 = 0$ ) überlagert und anschließend der RMSD-Wert berechnet. Der nach der folgenden Gleichung (4.2) berechnete Wert gibt somit an, wie weit sich ein Atom eines Moleküls im Zeitraum von  $t_2$  bis  $t_1$  durchschnittlich von seiner Stelle bewegt hat.

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.2)$$

Darin stellt  $r_i(t)$  die Position eines Atoms  $i$  zum Zeitpunkt  $t$  dar. Anzumerken ist, dass die Überlagerung nicht mit den Atomen durchgeführt werden muss, die zur Berechnung des RMSD-Wertes verwendet werden.

Diese Routine ermöglicht es auch, statt der Startstruktur von  $t_2 = 0$  eine beliebige Struktur aus dem Verlauf einer Dynamik als Referenzstruktur ( $t_2 = t_1 - \tau$ ) zu verwenden. Dann würde daraus ein RMSD-Wert in Abhängigkeit von  $\tau$  berechnet.

Alternativ kann der RMSD-Wert auch ohne Überlagerung mit der Routine `g_rmsdist` berechnet werden. Dazu dient die folgende Formel:

$$RMSD(t) = \left[ \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \|r_{ij}(t) - r_{ij}(0)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.3)$$

Hierbei wird der Abstand  $r_{ij}$  zwischen den Atomen  $i$  und  $j$  zur Zeit  $t$  verglichen mit dem Abstand zwischen den gleichen Atomen zur Zeit  $t = 0$ .

Ebenso ist es möglich, statt der definierten Startstruktur zur Zeit  $t = 0$  Referenzen zu verwenden, die zum Zeitpunkt  $\tau$  vorkommen. Hierfür muss die Formel 4.2 wie folgt

geändert werden:

$$RMSD(t; \tau) = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|r_i(t) - r_i(t - \tau)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4.4)$$

Diese Berechnung steht mit der Routine `g_run_rms` zur Verfügung.

## 4.5 Dihedral Order Parameter (DOP)

Da die Torsionswinkel im GROMACS in einem Bereich von  $-180^\circ$  bis  $180^\circ$  dargestellt werden, kann deren Variabilität nicht mit normalen linearen, statistischen Methoden dokumentiert werden. Aus diesem Grund werden dafür DOPs verwendet, bei denen die Periodizität der Torsionswinkel ausgeglichen wird. Grundlage für die DOP ist die folgende Korrelationsfunktion [34, 35]:

$$C(t) = \langle \cos[\theta(\tau) - \theta(\tau + t)] \rangle_{\tau} \quad (4.5)$$

Es handelt sich hierbei nicht um ein Produkt zweier Funktionen, wie sie bei solchen Korrelationsfunktionen üblich sind. Die Gleichung 4.5 kann aber als Summe zweier Produkte wie folgt formuliert werden:

$$C(t) = \langle \cos[\theta(\tau)] \cos[\theta(\tau + t)] + \sin[\theta(\tau)] \sin[\theta(\tau + t)] \rangle_{\tau} \quad (4.6)$$

Der klare Vorteil der Gleichung 4.5 im Vergleich zur Gleichung 4.6 besteht darin, dass man die Korrelation zum Zeitpunkt 0 direkt berechnen kann:

$$C(0) = 1 \quad (4.7)$$

Kennt man die Diederwinkel-Verteilung  $p(\theta)$  (aus entsprechenden Simulationen) nach  $t \rightarrow \infty$ , wird  $C(\infty)$  und damit der DOP wie folgt berechnet:

$$C(\infty) = \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \cos(\theta_1 - \theta_2) p(\theta_1) p(\theta_2) d\theta_1 d\theta_2 \quad (4.8)$$

Die Indizes 1 und 2 kennzeichnen die Integranden der jeweiligen Integrale.

Eine andere Formulierung hierfür ist:

$$C(\infty) = \left[ \int_0^{2\pi} \cos(\theta) p(\theta) d\theta \right]^2 + \left[ \int_0^{2\pi} \sin(\theta) p(\theta) d\theta \right]^2 \quad (4.9)$$

Daraus folgt  $0 \leq C(\infty) \leq 1$ , da es sich um die Summen zweier quadratischer Funktionen handelt. Sehr bewegliche Torsionswinkel streben dem Wert 0 zu, während weniger bewegliche Winkel einen DOP in der Nähe von 1 bekommen. Analog zu dem Ansatz von Lipari und Szabo [34, 35] wurde auch hier eine Korrelationsfunktion  $C(t)$  mit einer zweitermigen Exponentialfunktion formuliert:

$$C(t) = DOP + (1 - DOP) \exp(-t/\tau) \quad (4.10)$$

Bei dieser Formel stellt  $\tau$  eine Zeitkonstante dar, welche in etwa die Existenzdauer einer bestimmten Diederwinkelkonformation darstellt. Damit kann mit der Funktion 4.10 die exakte Korrelationszeit bestimmt werden.

Außerdem kommt diese Funktion ohne die Definition bestimmter Konformationen aus wie z.B. die Einteilung in cis- und trans-Konformationen. Die Einteilung in bestimmte Räume wird dem natürlichen Verhalten eines Torsionswinkels nicht gerecht, da dieser eine kontinuierliche Verteilungsfunktion beschreibt. Die Funktion 4.5 kann somit auch für Torsionswinkel bei Lipiden und anderen Polymeren verwendet werden.





## **Teil II**

# **Simulation der Dissoziation von Insulin-Dimeren**



# Kapitel 5

## Einleitung

Diabetes ist eine der am weitesten verbreiteten Stoffwechselstörungen. Nachdem Insulin 1920 als den Blutzuckerspiegel senkendes Peptid-Hormon entdeckt worden war, stellte das eine Revolution in der Therapie des Diabetes Mellitus dar. Leider ist das pankreatische Insulin weder für eine exogene Handhabung noch für die subcutane Injektionstherapie optimal geeignet. Denn trotz mittlerweile großer Erfahrungen und Anstrengungen in der Optimierung der Insulin-Formulierung, ist es bis heute nicht gelungen, die Glucoseregulation eines gesunden Organismus durch Injektionssubstitution exakt nachzubilden.

So kann durch die Therapie mit pankreatischem Wildtyp-Insulin zwar der Blutzuckerspiegel beeinflusst werden, aber durch den langsamen Wirkungseintritt des Wildtyp-Insulins kommt es während der Nahrungsaufnahme zur Hyperglykämie und danach durch die unnatürlich lange Wirkdauer häufig zu einer Hypoglykämie. Eine präzise Einstellung der Patienten auf die Therapie kann die akuten Auswirkungen dieser Fehlregulierungen zwar minimieren, aber durch das ständige Auftreten der Fehlregulationen kommt es bei dem Großteil der Patienten (siehe Kapitel 6) zu schwerwiegenden Folgeerkrankungen.

Um diese Folgeerkrankungen zu verringern, sind vor einigen Jahren Insulinanaloga mit einem deutlich verbesserten Wirkprofil eingeführt worden. Es handelt sich um Abkömmlinge des Human-Insulins, bei denen durch Veränderung bestimmter Aminosäuren die Selbstassoziation von Insulinmolekülen im Hexamer-Komplex so beeinflusst wurde, dass entsprechende Insulin-Formulierungen sehr schnell in die wirksamen Bestandteile zerfallen. Dies hat einen raschen Wirkungseintritt bei gleichzeitiger Verkürzung der Wirkdauer zur Folge [36, 37].

Daraus folgt, dass das Wirkprofil direkt von der Dissoziationsgeschwindigkeit des Insulin-Monomers aus dem verwendeten Insulin-Hexamer einer pharmazeutischen Formulierung abhängt.

Um also ein Insulin mit optimalem Wirkprofil entwickeln zu können, wäre es von entscheidendem Vorteil, den Zerfallsmechanismus der Insulin-Komplexe genau zu kennen. Da dieses mit den bisher verfügbaren experimentellen Methoden nicht zu leisten war, sollen in der hier vorliegenden Abhandlung theoretische Methoden zur Aufklärung des Dissoziationsmechanismus vorgestellt werden.

Für diese theoretischen Untersuchungen war von Vorteil, dass sowohl für das Wildtyp-Human-Insulin als auch für die schnell wirkenden Insulinanaloga Kristallstrukturen vorliegen, die als ideale Basis dienen können.

Bei den im Folgenden vorgestellten moleküldynamischen Simulationen wurde die Dissoziation der Insuline in einer physiologischen Kochsalzlösung untersucht. Es sollte überprüft werden, ob die aus der Analyse der bekannten Kristallstrukturen gewonnenen Erkenntnisse im dynamischen Verhalten der Hexamer-Komplexe wiederzufinden sind und welche Auswirkung die Mutationen auf das dynamische Verhalten der Komplexe haben. Hierzu wurde mit dem Kraftfeld GROMACS eine spezielle Routine für die Dissoziation von Proteinkomplexen entwickelt.

# Kapitel 6

## Diabetes Mellitus

Diabetes gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen; etwa 5% der Bevölkerung leiden darunter. Für Deutschland wird die Zahl der Diabetiker auf 4 Millionen beziffert, von denen etwa 800 000 mit Insulin behandelt werden müssen. Aber nur 200 000 sind Patienten mit einem absoluten Insulinmangel, bei dem die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) nicht mehr in der Lage ist, Insulin zu sezernieren. Die restlichen 600 000 Patienten leiden unter einem relativen Insulinmangel, der durch viele unterschiedliche Faktoren hervorgerufen werden kann [38, 39].

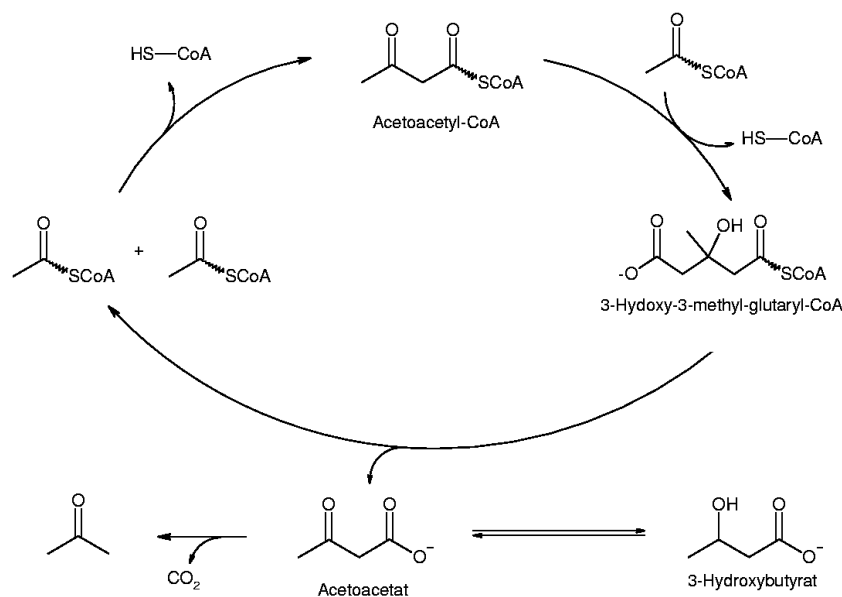
### 6.1 Symptome und Auswirkungen eines Insulinmangels

Die Bezeichnung Diabetes kommt aus dem Griechischen und kann von dem Wort diabanein abgeleitet werden, womit ein röhrenförmiger Becher beschrieben wird. Aretius (30 n. Chr.) kommentiert dies wie folgt: *„alles was der Patient trinkt, wird unmittelbar, als wenn es ein Rohr passiert, ausgeschieden“*. Mellitus lässt sich aus dem Römischen ableiten, bedeutet *honigsüß* und soll den Geschmack des ausgeschiedenen Urins beschreiben. Der Geschmack des Urins wird durch Glucose hervorgerufen, die über die Niere zur Senkung des Blutzuckerspiegels ausgeschieden wird. Da es der Niere aber nur bedingt möglich ist, Glucose auszuscheiden, leidet der Patient unter erhöhtem Harndrang. Dieser ist neben dem ständigen Durst das auffälligste Symptom einer Diabetes mellitus-Erkrankung.

Weitere Symptome eines erhöhten Blutzuckerspiegels (Hyperglykämie) sind stetiger Hunger durch die mangelnde Glucoseversorgung der Zellen bei gleichzeitigem Ge-

wichtsverlust. Des weiteren treten häufig Unwohlsein, Müdigkeit, Leistungsminderung, körperliche Schwäche, Immunschwäche, trockene und gereizte Haut, Wundheilungsstörungen, schlecht verheilende Hautinfektionen und eine gestörte Sehschärfe auf. Letztere ist auf die stark osmotische Wirkung der Glucose zurückzuführen, wodurch der Augeninnendruck erhöht wird. Dies verursacht die Verschlechterung der Sehkraft, die bis zur Erblindung reichen kann.

Durch das Fehlen von Glucose werden vermehrt Fettsäuren in den Zellen verbrannt. Die gesteigerte Lipolyse in der Leber, im Muskel sowie im Fettgewebe führt zu einem erhöhten Lipidspiegel im Plasma. Bei schweren Fällen können durch den vermehrten Fettabbau und bei gleichzeitig eingeschränkter Endoxidation von Acetyl-CoA im Citratcyclus vermehrt Ketonkörper im Blut auftreten. Durch die Überlastung des Citratcyclus wird im größeren Ausmaß Acetoacetyl-CoA gebildet. Aus Acetoacetyl-CoA wird über 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Acetoacetat gebildet, das durch Reduktion in 3-Hydroxybutyrat übergeht. Durch Decarboxylierung entsteht, wie in Abb. 6.1 gezeigt, Aceton<sup>1</sup> als Endprodukt der Lipolyse. Durch den Abbau ketogener Aminosäuren wird die Ketogenese weiter verstärkt.



**Abbildung 6.1:** Bildung der Ketonkörper bei der Lipolyse.

Das Coma Diabeticum ist die schwerste Form der durch Insulinmangel erzeugten Glu-

<sup>1</sup>Acetoacetat, 3-Hydroxybutyrat und Aceton werden, chemisch nicht korrekt, als "Ketonkörper" bezeichnet.

coseverwertungsstörung. Durch die erhöhte Bildung von Ketonkörpern wird eine Ketoazidose hervorgerufen. Diese sauren Verbindungen werden als Natrium- oder Kaliumsalze ausgeschieden. Der damit einhergehende Elektrolytverlust wird durch die Glucoseausscheidung und den daraus resultierenden Wasserverlust noch verstärkt. Die Dehydratation führt zur Minderdurchblutung der Gehirns, in deren Folge Bewusstseinsstörungen und letztendlich Bewusstseinsverlust auftreten können, da das Gehirn nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt wird. Unbehandelt kann dieses Koma zum Tode führen [40].

Neben den akuten Symptomen sind Neuropathien und vor allem Gefäßkrankungen (Angiopathien) als Folgeerkrankungen bekannt und treten trotz ausreichender Kontrolle des Glucosespiegels recht häufig auf.

Etwa 60-90 % aller Diabetiker sind von Neuropathien betroffen, die sich sowohl sensorisch als auch motorisch bemerkbar machen. Geschädigt werden hier sowohl Nerven als auch Schwannsche-Zellen<sup>2</sup>. Besonders häufig sind sensorische Symptome wie Taubheitsgefühle, Parästhesien, nächtliche Wadenkrämpfe und Reflexausfälle. Diese werden meist durch periphere, symmetrische Polyneuropathien hervorgerufen. Bei den motorischen Symptomen handelt es sich meist um asymmetrische Neuropathien, welche sich häufig durch Muskelschwächen und Paresen<sup>3</sup> bemerkbar machen. Weit weniger häufig kommen Neuropathien des autonomen Nervensystems vor. Hierbei handelt es sich meist um Störungen mit einem sehr variablen Erscheinungsbild, wie die Störung der gastrointestinalen Motorik (z.B. verzögerte Magenentleerung, Obstipation), orthostatische Dysfunktion und Impotenz, um nur die wichtigsten Beispiele zu nennen. Bei den Angiopathien kann zwischen der diabetischen Mikro- und der Makroangiopathie unterschieden werden. Mikroangiopathien treten meist an der Niere und der Netzhaut auf. In der Niere kommt es hierbei zu einer Verdickung der Basalmembran der glomerulären Kapillaren<sup>4</sup>, was zur Glomerulosklerose und schließlich zur Niereninsuffizienz führen kann. Mikroangiopathien im Auge äußern sich durch Mikroaneurysmen und kapilläre Gefäßverschlüsse in der Netzhaut (Retinopathie). Durch den Gefäßverschluss herrscht im betroffenen Gewebe ein akuter Sauerstoffmangel (Hypoxie), der die Neubildung von Gefäßen anregt. Wegen der Verletzlichkeit der neugebildeten Gefäße ist die Gefahr von Blutungen in die Netzhaut sehr groß, was im schlimmsten Fall zur Erblindung führen kann.

---

<sup>2</sup>siehe Glossar

<sup>3</sup>siehe Glossar

<sup>4</sup>siehe Glossar

Die diabetische Makroangiopathie entspricht der Arteriosklerose eines Nichtdiabetikers. Sie tritt allerdings stärker, früher und häufiger auf. Als verstärkender Faktor für den Ausbruch einer Makroangiopathie ist besonders bei Typ II-Diabetikern Übergewicht zu nennen. Auch die bei Diabetes mellitus häufig mitauftretende Hyperlipoproteinämie ist ein weiterer Angiopathien fördernder Faktor. Aus diesem Grund treten bei Diabetikern gehäuft Herzinfarkte, arterielle Verschlusskrankheiten oder Apoplexien<sup>5</sup> in Folge einer Zerebralsklerose auf.

Neben den bisher beschriebenen Folgen einer Diabetes-Erkrankung sind häufige Hauterkrankungen wie Ekzeme, Infektionen mit Bakterien und Pilzen sowie Leber- und Gallenwegserkrankungen zu nennen [39, 40].

## 6.2 Typ I-Diabetes

Da der Typ I-Diabetes mit Insulin behandelt werden muss und meist schon in jungen Jahren auftritt, nennt man ihn auch IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) oder juvenilen Diabetes. Dieser Diabetes-Typ wird durch eine Autoimmunerkrankung hervorgerufen und löst ein irreversibles Insulinmangelsyndrom, auch absoluter Insulinmangel genannt, aus.

Initiatoren dieser Immunreaktion sind wahrscheinlich Membranstrukturen der  $\beta$ -Zellen, ungewöhnliche Strukturen auf gestressten Zellen oder Proteinstrukturen, die als Virusantigene auf die Inselzellen wirken. Ein weiteres Indiz für diese Annahmen sind die im Blut von Typ I-Diabetikern charakteristischen Antikörper gegen Insulin, Inselzellen und Glutamatdecarboxylase.

Ausgelöst wird die Reaktion aber erst bei einer genetischen Prädisposition im Zusammenspiel mit bestimmten Umweltfaktoren, die das individuelle Diabetesrisiko stark beeinflussen können. Dabei handelt es sich um individuell sehr unterschiedliche Faktoren wie Ernährung, Viruserkrankungen und Umweltgifte. Die Auswirkungen dieser Faktoren können unterschiedlich stark hervortreten, aber auch miteinander gekoppelt sein, was eine weitere Verstärkung des Diabetes-Risikos zur Folge haben kann. Man hat allerdings festgestellt, dass sich im letzten halben Jahr vor Ausbruch der Krankheit die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen nicht beschleunigt. Das weist darauf hin, dass diese Umwelteinflüsse eine Erkrankung auslösen, eine genetische Prädisposition für den Ausbruch

---

<sup>5</sup>siehe Glossar



der Krankheit jedoch alleine nicht ausreichend ist.

Dauert dieser Entzündungsprozess länger an, wird er chronisch und schreitet fort; man spricht dann von einer Insulinitis. Diese Entzündung der Langerhans'schen Inseln erreicht ihre klinische Manifestation erst nach Zerstörung von 80-90 % der  $\beta$ -Zellmasse und tritt dann als akuter Insulinmangel zu Tage.

In der Anfangsphase der Insulintherapie kann bei den meisten Patienten eine unterschiedlich stark ausgeprägte Remissionsphase beobachtet werden, in der die Aktivität der Insulinproduktion wieder steigt. Grund dafür ist die Abnahme der Insulinresistenz, da sich der Stoffwechsel normalisiert und sich die  $\beta$ -Zellen-Funktion erholt. Allerdings ist diese Erholungsphase zeitlich begrenzt. Danach schreitet die Entzündung wieder fort und zerstört auch die letzten  $\beta$ -Zellen. Erst danach kommt die Entzündung zum Stillstand, wie an dem drastischen Absinken des Insulin-Zellantikörpertiters erkennbar ist [39].

### 6.3 Typ II-Diabetes

Typ II-Diabetes, der auch „Altersdiabetes“ oder NIDDM (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus) genannt wird, stellt im Gegensatz zum Typ I-Diabetes eine Stoffwechselstörung der Glucoseregulation dar. Hierbei kann die Glucoseregulation durch verschiedene Defekte und Fehlsteuerungen auf unterschiedlichen Ebenen gestört werden.

Es werden beim Typ II-Diabetes zwei Erkrankungsmechanismen diskutiert. So unterscheidet man zwischen einer biochemischen Läsion der veränderten Insulinsekretion (Hyperinsulinämie, Hypoinsulinämie) oder einer peripheren Insulinresistenz. Leider treten die beiden Mechanismen nur sehr selten getrennt voneinander auf. Meist tauchen im Verlauf der Erkrankung an Typ II- Diabetes Defekte beider Formen nacheinander auf und verursachen oder verstärken sich gegenseitig.

Die drei wichtigsten Defekte, die hierbei ausschlaggebend sind, lassen sich wie folgt beschreiben:

1. Eine veränderte, abnormale Insulin-Sekretion auf den Stimulus Glucose.
2. Eine reduzierte Fähigkeit von Insulin, die periphere Aufnahme von Glucose in die Gewebe zu stimulieren (Insulin-Resistenz).

3. Eine gesteigerte und vermindert hemmbare hepatische Glucoseproduktion trotz bereits bestehender Hyperglykämie.

Diese Fehlregulationen der Glucosehomöostase werden zum einen durch genetisch bedingte Veränderung und zum anderen durch die infolge chronischer Hyperglykämie verringerte Anzahl der Glucosetransporter hervorgerufen.

Die Verringerung der Anzahl der Glucosetransporter ist die natürliche Antwort des Körpers auf eine ständige Überproduktion von Insulin. Diese „down regulation“ hat leider einen weiteren Anstieg der Insulinproduktion zur Folge, so dass sich im Laufe der Zeit die angeborene Insulinresistenz durch eine sogenannte Sekundäresistenz verstärkt.

Zusätzlich können neben diesen Veränderungen auf Rezeptorebene noch Störungen in der Postrezeptorebene beobachtet werden, wobei der Glucose-Transportmechanismus direkt betroffen ist. Dabei werden zwei mögliche Wege unterschieden: Entweder liegt ein Mangel an Transportproteinen vor, oder die Transportproteine sind durch einen genetischen Defekt nicht bzw. nur bedingt funktionsfähig. Der dadurch ausgelöste Mangel an Transportproteinen hat zur Folge, dass weder  $\beta$ -Zellen des Pankreas noch Leberzellen die Glucose aufnehmen können. Dieses führt zu einer Gluconeogenese und zur Steigerung der Glycogenolyse in beiden Organen sowie zu einer gesteigerten Insulinsekretion des Pankreas. Der erhöhte Insulinspiegel kompensiert den Glucosemangel in den Zielzellen nur kurzzeitig, da die  $\beta$ -Zellen auf Dauer nicht in der Lage sind, derartige Mengen Insulin herzustellen. Zusätzlich sinkt die Aktivität der Transportproteine weiter, so dass noch weniger Glucose die Zielzellen erreicht. Für die Ausbildung dieser Glucose-Intoleranz gibt es zur Zeit noch keine eindeutige biochemische Erklärung. Es steht lediglich fest, dass bei anhaltend hohen Blutzuckerspiegeln die Regulationsmechanismen des Körpers immer stärker gestört werden und sich aus einem nicht behandelten Diabetes-Typ II ein Diabetes-Typ I entwickeln kann [39].

## 6.4 Weitere Diabetestypen

Hierzu gehören Diabetes-Erkrankungen, die durch äußere Einflüsse ausgelöst werden. Die am weitesten verbreiteten Formen solcher Diabetestypen sind Malnutrition-related Diabetes mellitus (MRDM) und der Gestationsdiabetes.

Der MRDM wird hauptsächlich durch Unterernährung hervorgerufen. Es werden zwei Formen dieses Syndroms unterschieden: Der Fibrocalculus Pancreatic Diabetes (FCPD)

und der Protein deficient Pancreatic Diabetes (PDPD). Charakteristisch für den FCPD ist eine steinbildende, chronisch-fibrosierende Pankreatitis und rezidivierende, abdominelle Beschwerden. Von dieser Diabetesart sind meist junge Patienten unter 30 Jahren betroffen, die an starker Unterernährung leiden. Der Mechanismus, der zum Ausbrechen des Diabetes führt, ist noch ungeklärt. Im Gegensatz dazu ist der PDPD weniger exakt charakterisiert. Anfangs wurden Insulin-Resistenz, fehlende Ketoazidose-Neigung und schwere Malnutrition (ohne Steinbildung) als Symptome angesehen. Da aber meist klare Abgrenzungen zu den klassischen Formen von Typ I- und Typ II-Diabetes mit zusätzlicher Malnutrition fehlen, wird der PDPD seit 1997 als Malnutrition-modulated diabetes mellitus (MMDM) bezeichnet.

Der Gestationsdiabetes, auch Schwangerschaftsdiabetes genannt, wird durch Plazentahormone ausgelöst, die die Wirksamkeit des Insulins auf mehreren Wegen beeinflussen. Im allgemeinen kommt es im Verlauf einer Schwangerschaft zu einer zunehmenden Insulinresistenz. In den meisten Fällen wird die Insulinresistenz durch erhöhte Insulinproduktion ausgeglichen. In 1-2 % der Schwangerschaften ist der mütterliche Pankreas nicht mehr in der Lage, den erhöhten Insulinbedarf auszugleichen. Es entsteht ein Gestationsdiabetes, der in der Regel nach der Schwangerschaft wieder abklingt. Da eine schlechte Regulation des Blutglucosespiegels der Mutter beim Fötus bleibende Schäden verursachen kann, ist es dringend notwendig, einen Schwangerschaftsdiabetes durch Substitution mit Insulin zu behandeln.

Außerdem sind neben dem lipoatropischen Diabetes noch einige Syndrome mit ausgeprägter Insulinresistenz, genetische Syndrome von Diabetes Mellitus und der iatrogene<sup>6</sup> Diabetes bekannt. Allerdings sind diese äußerst selten, so dass auf diese Diabetesformen nicht genauer eingegangen werden soll [39].

---

<sup>6</sup>siehe Glossar



# Kapitel 7

## Insulin

Im Pankreas der Säugetiere und vieler anderer Tierspezies sind sogenannte Inselzellen enthalten. Diese machen etwa 1-3 % des Pankreasgewebes aus und werden in drei Zelltypen unterteilt. Jeder Zelltyp stellt ein bestimmtes Hormon her. So wird von den  $\alpha$ -Zellen das Glukagon, von den  $\beta$ -Zellen Insulin und von den seltener vorkommenden  $\delta$ -Zellen das Somatostatin produziert [41].<sup>1</sup>

### 7.1 Biosynthese

Beim Menschen wird das Insulinmolekül zunächst als 107 Aminosäuren enthaltendes Präpro-Insulin synthetisiert (s. Abb. 7.1). Es stellt das primäre Translationsprodukt der ribosomalen Biosynthese dar, welches in den Raum des endoplasmatischen Retikulums sezerniert wird. Beim Durchtritt durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums wird die 24 Aminosäuren lange Prä-Sequenz abgespalten, wodurch das Pro-Insulin entsteht. Die Prä-Sequenz ist ein Signalpeptid und wird benötigt, um das Protein als extrazellulär zu markieren und die Synthese am rauhen, endoplasmatischen Retikulum in dessen Vesikel<sup>2</sup> zu induzieren.

Das Pro-Insulin gehört strukturell zur gleichen Familie stoffwechselaktiver Wachstumsfaktoren wie das Relaxin<sup>3</sup> [42, 43]. Es kann in drei Sequenzabschnitte unterteilt werden. Die ersten 30 Aminosäuren gehören zur B-Kette, der nächste Abschnitt wird als

---

<sup>1</sup>Die Inselzelltypen werden in der Literatur auch als A-Zellen, B-Zellen und D-Zellen bezeichnet.

<sup>2</sup>Vesikel gelten auch als extrazellulär, da deren Inhalt nie in Kontakt mit dem Cytosol kommt, sondern mittels Exocytose direkt ausgeschleust wird.

<sup>3</sup>siehe Glossar

C-Peptid bezeichnet und ist 35 Aminosäuren lang. Den letzten Abschnitt der Sequenz bildet mit 21 Aminosäuren die A-Kette. Das C-Peptid sorgt unter anderem für die korrekte Faltung des Pro-Insulins. Im nächsten Schritt spaltet die Prohormon-Convertase das C-Peptid ab. Das geschieht im Golgi-Apparat sowie innerhalb der  $\beta$ -Granula. Als Spaltprodukte verbleiben Insulin und C-Peptid.

```

PREPRO (    1) malwmrllplllalallalwgpdpaaa fvnqhlcgsahlvealyl (41  )
MI_PRO (   A1) FVNQHLCGSHLVEALYL (A17  )
HUMAN (    B1) FVNQHLCGSHLVEALYL (B17  )
PIG (     B1) FVNQHLCGSHLVEALYL (B17  )
BOVINE (    1) fvnqhlcgsahlvealyl (17  )
SHEEP (    1) fvnqhlcgsahlvealyl (17  )
LYSPRO (   B1) FVNQHLCGSHLVEALYL (B17  )
ASPART (   B1) FVNQHLCGSHLVEALYL (B17  )

PREPRO (   42) vcgergffytpkt-rreaedlqvqqvelggpgagslqpla (81  )
MI_PRO (  A18) VCGERGFYTPKT-RR-----YPGDV----- ( gap )
HUMAN (  B18) VCGERGFYTPKT |-----YPGDV----- ( gap )
PIG (   B18) VCGERGFYTPKA |-----YPGDV----- ( gap )
BOVINE (   18) vcgergffytпка |-----YPGDV----- ( gap )
SHEEP (   18) vcgergffytпка |-----YPGDV----- ( gap )
LYSPRO (  B18) VCGERGFYTKPT |-----YPGDV----- ( gap )
ASPART (  B18) VCGERGFYTDKT |-----YPGDV----- ( gap )

PREPRO (   82) legslqkr giveqcctsicshlyqlenycn (110  )
MI_PRO ( gap ) -----KR GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (A60  )
HUMAN ( gap ) -----GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (A21  )
PIG ( gap ) -----GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (A21  )
BOVINE ( gap ) -----giveqccasvcslyqlenycn (51  )
SHEEP ( gap ) -----giveqccagvcslyqlenycn (51  )
LYSPRO ( gap ) -----GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (A21  )
ASPART ( gap ) -----GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (A21  )

```

**Abbildung 7.1:** Alignment verschiedener Insulinsequenzen. Die oberste Sequenz entspricht dem menschlichen Präpro-Insulin, die zweite Sequenz ist ein Mini-Pro-Insulin (ein gentechnologisches Zwischenprodukt, siehe Kapitel 7.2), dann die Sequenz des Human-Insulins. Danach folgen die Sequenzen vom Schwein, Rind und Schaf. Die beiden letzten Sequenzen sind die LysPro- und die Aspart-Analoga des Human-Insulins. Die Einfärbungen beschreiben die unterschiedlichen Moleküldomänen, so entspricht orange der Signalsequenz, grün der B-Kette, schwarz ist das C-Peptid und blau die A-Kette. Sequenzen, die mit Großbuchstaben dargestellt wurden, stammen von Kristallstrukturen, während von den Sequenzen in Kleinbuchstaben keine Koordinaten zur Verfügung standen. Rot gekennzeichnete Aminosäuren sind im Vergleich zum Human-Insulin mutiert.

Das C-Peptid wird nicht weiter proteolytisch abgebaut, so dass sich in den im Golgi-Apparat entstehenden Sekretgranula Insulin und C-Peptid in äquimolarem Verhältnis befinden. Das ist von klinischer Bedeutung, da so durch immunologische Bestimmung der C-Peptid Konzentration Rückschlüsse auf die noch vorhandene Restsekretion von körpereigenem Insulin möglich sind [40, 44, 45].

## 7.2 Gentechnologische Synthese von Insulin und seinen Analoga

Da der Bedarf an Insulin weltweit nicht mehr durch natürliche Extrakte des Pankreas aus Schlachttieren gedeckt werden kann, haben einige Firmen gentechnologische Verfahren entwickelt, um Human-Insulin aus Bakterien oder Hefen herstellen zu können.

Für die Herstellung aus bakteriellen *E. coli*-Zellen erweist sich die ungewöhnliche Struktur des Insulins als problematisch. Beide Peptidketten liegen nämlich in einem Gen und müssen zusätzlich über ein bestimmtes Disulfidbrückenmuster verbunden werden. Solche Synthesen sind gentechnologisch nicht einfach umzusetzen, da die Abtrennung der Signalsequenz und des C-Peptids sowie die Bildung der Disulfidbrücken nicht in der Gen-Sequenz codiert sind und somit ein spezifisches Leistungsmerkmal der  $\beta$ -Zellen darstellen. Weil *E. coli*-Zellen diese Fähigkeiten nicht besitzen, wurden zunächst die beiden Peptidketten des Insulins in unterschiedlichen Stämmen produziert und dann zu aktivem Insulin assembliert.

Da dieser Prozess sehr ineffektiv war, ging man schnell dazu über, Pro-Insulin von *E. coli* exprimieren zu lassen. Dabei ist von Vorteil, dass das komplette Insulin-Gen in einem *E. coli*-Stamm vorliegt. Da *E. coli* das Signalpeptid nicht benötigt, wurde statt dessen nur ein Methionin-Codon gesetzt. Das ist notwendig, weil die Protein-Biosynthese praktisch immer mit einem Methionin-Codon startet. Um eine starke Expression des Peptids zu gewährleisten, wird der stärkere bakterielle Promotor Tryptophansynthase verwendet.

Um nach der Expression ein aktives Insulin zu erhalten, muss zunächst mit CNBr oder CNCl das N-terminale Methionin entfernt werden. Anschließend werden durch oxidative Sulfidolyse die korrekten Disulfid-Bindungen geknüpft. Nach dem Entfernen des C-Peptids mittels Carboxypeptidase B und Trypsin erhält man aktives Insulin in hoher Ausbeute. Die Firmen Lilly und Aventis stellen nach diesen Verfahren rekombinante Human-Insuline her. Nachteil dieser Herstellmethode ist jedoch ein nicht unerheblicher Anteil an Wirts-Protein im Rohmaterial.

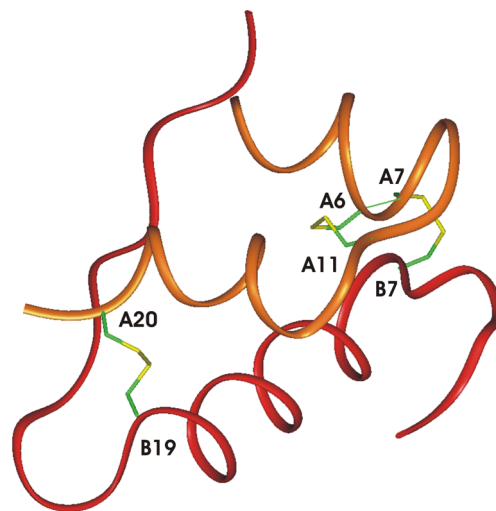
Um den Anteil des Wirts-Proteins im Rohmaterial zu verringern, wurde von der Firma Novo Nordisk die Bäckerhefe *S. cerevisiae* als Wirt des Insulin-Gens gewählt. Bei diesem Kunstgriff wird ausgenutzt, dass wegen der Signalsequenz des Insulins dieses aus der Zelle ausgeschleust und hierbei von einer membranständigen Hefe-Protease entfernt wird. Allerdings kann die Hefe das natürliche C-Peptid nicht translatieren; des-

halb muss ein künstliches Gen verwendet werden, bei dem das C-Peptid bis auf wenige Aminosäuren so verkürzt ist, dass die Hefe es verarbeiten kann, ohne seine Funktion zu verlieren. Dieses künstliche Gen wird auch „Mini-Pro-Insulin-Gen“ genannt.

Die rekombinanten Hefe-Zellen sezernieren also kein normales Pro-Insulin, sondern ein „Mini-Pro-Insulin“, welches allerdings schon korrekt geknüpfte Disulfidbrücken enthält. Zur Entfernung des „Mini-C-Peptid“ wird im wasserarmen Milieu das „Mini-Pro-Insulin“ mit Threonin-Tertiärbutyl-Ester und Trypsin behandelt. Trypsin spaltet dabei zunächst hinter den Lysin-Resten dieses artifizialen Pro-Insulins und verlängert dann in der Rückreaktion die B-Kette durch Transpeptidierung um einen Threonin-Ester-Rest. Nach Hydrolyse des Esters erhält man aktives Human-Insulin [45].

### 7.3 Primärstruktur

Im Jahre 1955 gelang es erstmals Frederick Sanger, die Struktur des Insulins aufzuklären. Dabei stellte er fest, dass es sich um ein Proteohormon handelt, das aus zwei Peptidketten besteht. Die A-Kette enthält 21 Aminosäuren, während die B-Kette 30 Aminosäuren umfasst. Wie aus Abbildung 7.2 hervorgeht, werden beide Ketten durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Eine dritte Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette ist für die Stabilisierung essentieller Sekundärstrukturen notwendig [44].



**Abbildung 7.2:** Insulin-Monomer mit Disulfidbrücken. Die A-Kette ist orange eingefärbt, die B-Kette rot. Bei den Disulfidbrücken sind C-Atome grün und Schwefelatome gelb gehalten.



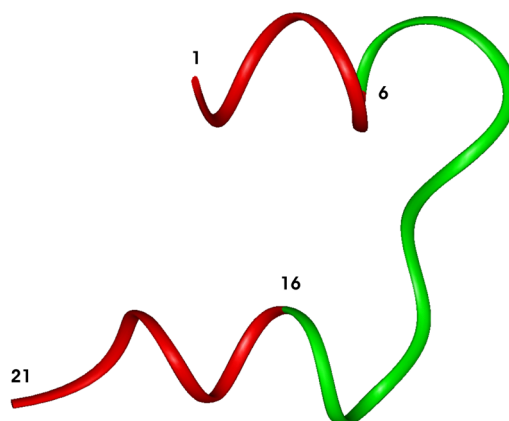
Derzeit sind die Primärstrukturen des Insulins von weit über 20 Spezies bekannt und bis jetzt ist der Bauplan aller Insuline identisch, wenn auch ein großer Prozentsatz der Aminosäuren variiert. Die größte Ähnlichkeit mit dem Human-Insulin hat das Schweine-Insulin, bei dem nur das C-terminale Threonin der B-Kette gegen ein Alanin ausgetauscht ist (s. Abb. 7.1). Bei den Insulinen des Schafes, des Rindes und des Pferdes sind zusätzlich noch die drei Aminosäuren A8 bis A10 C-terminal an der intrachainen Disulfidbrücke der A-Kette mutiert. Erstaunlich ist, dass bei anderen Arten bis zu 29 der 51 Aminosäuren ausgetauscht sein können, ohne dass sich die biologische Aktivität der Insuline in verschiedenen experimentellen Systemen entscheidend ändert [44].

## 7.4 Sekundär- und Tertiärstruktur

### 7.4.1 Monomerstruktur

Insulin kommt im Blut wahrscheinlich nur als Monomer vor. Diese Struktur dürfte die einzige Form sein, in der Insulin seine Hormonwirkung entfalten kann.

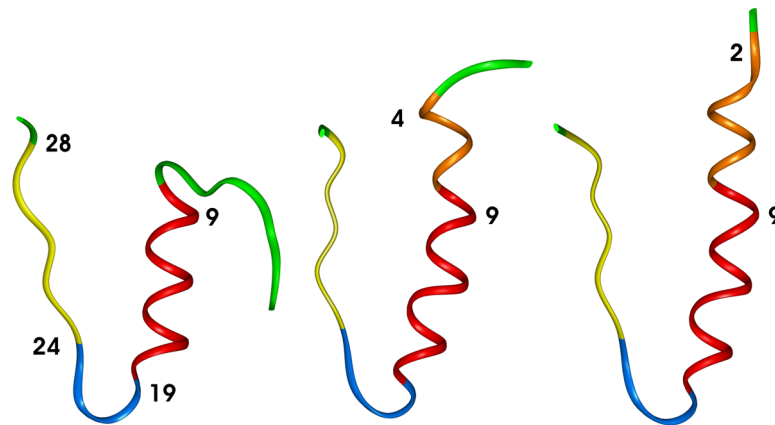
Für die Aktivität des Insulins ist die räumliche Struktur des Monomers von entscheidender Bedeutung. So stellt die A-Kette eine U-förmige Struktur dar, die durch zwei  $\alpha$ -Helices geprägt wird. Die  $\alpha$ -Helices erstrecken sich von Aminosäure 1-6 und 16-21. Die Aminosäurereste 7-13 haben keine definierte Sekundärstruktur (s. Abb. 7.3).



**Abbildung 7.3:** Struktur der A-Kette. Rote Bereiche sind  $\alpha$ -Helices, grüne haben keine bestimmte Sekundärstruktur.

Auch die B-Kette bildet eine U-förmige Struktur, wobei hier je nach den Umgebungsbedingungen, unter denen der Kristall für die Strukturaufklärung gezüchtet wurde, zwei

Erscheinungsformen bekannt sind. Man unterscheidet ein T- und ein R-Konformer der B-Kette (s. Abb. 7.4). Beiden Strukturen ist eine zentrale  $\alpha$ -Helix von den Aminosäuren 9-19, ein Typ 1-Turn von 20-23 und eine  $\beta$ -Faltblattstruktur am C-terminalen Ende der B-Kette gemeinsam. Der Unterschied der beiden Strukturen liegt nur im N-terminalen Ende der B-Kette. Dort bildet sich bei der R-Struktur eine  $\alpha$ -Helix über die Aminosäuren 1-9 aus, während bei der T-Konformation keine Sekundärstruktur gebildet wird. Eine Umwandlung von einer Struktur in die andere kann durch homo- oder heterotrope Ligand-Bindungswechselwirkungen moduliert werden (s. Kapitel 7.4.3). Als Liganden für diese Konversion haben sich Phenole (Phenol, m-Kresol) erwiesen, die auch häufig zur Konservierung pharmazeutischer Rezepturen genutzt werden.



**Abbildung 7.4:** Vergleich der B-Kettenkonformationen. Es sind links das T-Konformer, rechts das R-Konformer und in der Mitte die  $R^f$ -Übergangsstruktur dargestellt. Rote Bereiche kennzeichnen auch hier  $\alpha$ -Helices, blaue Bereiche sind Turnstrukturen und gelbe  $\beta$ -Faltblätter, während grüne Bereiche keine definierte Sekundärstruktur besitzen. Die Ziffern entsprechen den jeweiligen Aminosäurenummern der jeweiligen Sequenz.

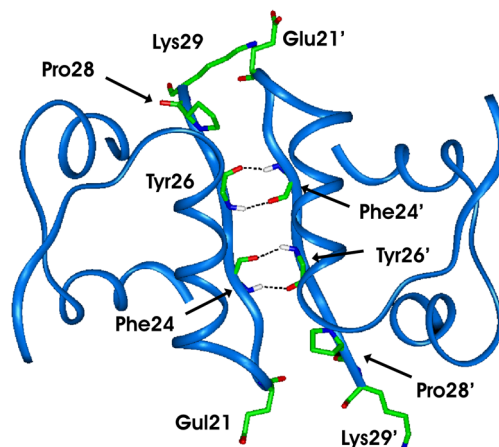
Die globuläre Tertiärstruktur eines Monomers wird durch Assoziation beider Ketten gebildet, indem sich auf der nach oben geöffneten U-förmigen B-Kette die A-Kette mit der Öffnung des U's um  $90^\circ$  gedreht anlagert. Hierbei liegt die A-Kette mit den Aminosäuren 7-17 über den Aminosäuren 9-19 der B-Kette (s. Abb. 7.2). Verbunden werden die beiden Ketten durch zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen A7 und B7 sowie den Cysteinen A20 und B19. Eine dritte Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cystein A6 und A11 sorgt für eine weitere Stabilisierung der Struktur. Bei der Bildung von Di- und Hexamerstrukturen wird die A-Kette nach außen exponiert, während die

B-Kette im Inneren des Aggregats liegt [46–48].

### 7.4.2 Dimerstruktur

Zwei Monomere bilden ein Dimer, indem sich das  $\beta$ -Faltblatt der B-Kette des ersten Monomers antiparallel am  $\beta$ -Faltblatt des zweiten Monomers anlagert. Die Dipole der in der B-Kette gebildeten  $\alpha$ -Helix lassen bei der Annäherung der Monomere nur die antiparallele Orientierung zu.

Danach bilden sich zwischen den Aminosäureresten Lysin B29 bzw. B29'<sup>4</sup> und Glutamat B21' bzw. B21 zwei Salzbrücken aus. Im nächsten Schritt werden zwischen dem Proteinrückgrat des Phenylalanins B24 bzw. B24' und des Tyrosins B26' bzw. B26 Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) geknüpft (siehe Abb. 7.5). Sind diese weitreichenden Bindungen etabliert, wird durch hydrophobe Kontakte zwischen den Aminosäureseitenketten die Struktur des Dimers endgültig stabilisiert.



**Abbildung 7.5:** Die Dimerstruktur mit den wichtigsten weitreichenden Wechselwirkungen zwischen den Monomeren. Dargestellt sind die Seitenketten der Lysine (B29) und der Glutamate (B21), außerdem das Proteinrückgrat des Phenylalanins B24 und des Tyrosins B26 beider Monomere. Die Aminosäuren des Monomers B sind dabei durch ein ' gekennzeichnet.

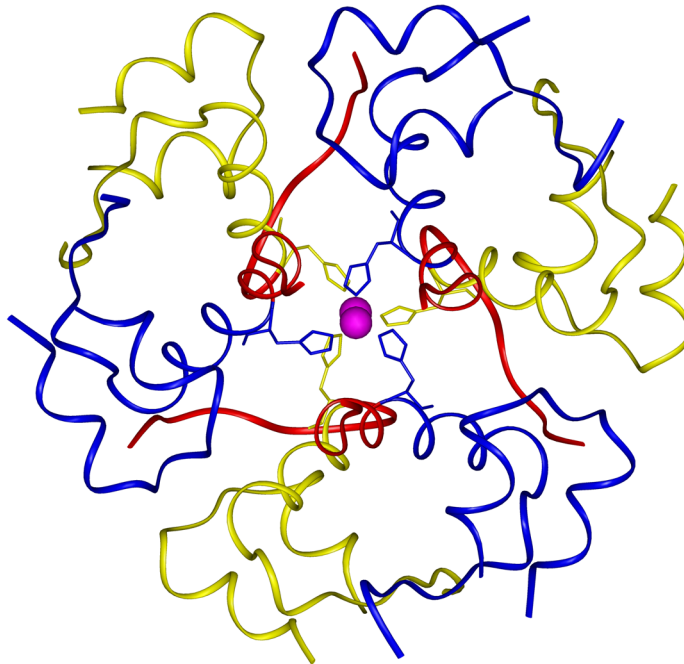
Dimer-Strukturen können sich aus den in Kapitel 7.4.1 vorgestellten T- und R-Konformationen bilden. Dabei treten symmetrisches T<sub>2</sub>- und R<sub>2</sub>- aber auch ein asymmetrisches TR-

<sup>4</sup>Der Buchstabe gibt die betreffende Kette des Insulins an. Ein Apostroph kennzeichnet das andere Monomer.

Dimer auf. Aus diesen drei Strukturen werden bei der Kristallisation die Hexamere aufgebaut.

### 7.4.3 Hexamerstruktur

Um eine Hexamerstruktur auszubilden, werden drei Dimere über die Seitenkette des Histidin B10 mit  $Zn^{2+}$ -Ionen als Chelatkomplex verbunden, so dass man ein Hexamer auch als Dimer der Zink gebundenen Trimere auffassen könnte. Die Verknüpfung der beiden Trimere erfolgt durch die in Kapitel 7.4.2 beschriebenen Dimer-Bindungen. Je nach Konformation der B-Kette werden unterschiedliche Koordinationen an den  $Zn^{2+}$ -Ionen bevorzugt.



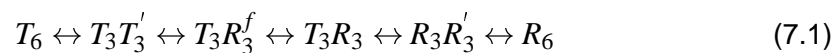
**Abbildung 7.6:** Komplexstruktur eines  $T_3R_3$ -Hexamers. In blau ist das Proteinrückgrat des T-Trimer und in gelb das des R-Trimer dargestellt. Die  $Zn^{2+}$ -Ionen sind in magenta dargestellt. Der rote Teil des Proteinrückgrates stellt den Bereich dar, in dem sich T- und R-Struktur unterscheiden.

Anfänglich wurden für die zwei Konformationen der B-Kette drei Komplexstrukturen im Kristall beobachtet und zwar eine  $R_6$ -, eine  $T_3R_3$ - und eine  $T_6$ -Struktur. Vor dieser Nomenklatur wurden die Strukturen nach der Anzahl der gebundenen Zn-Ionen und dem Medium benannt, aus dem sie gewonnen wurden. So wird die  $T_6$ -Struktur auch 2

Zn-, die  $T_3R_3$ -Struktur 4 Zn- und die  $R_6$ -Struktur 2 Zn-Phenol-induzierte-Spezies genannt. Erst in den letzten Jahren konnten bei Forschungen zur Dissoziation von Insulin-Hexameren noch weitere Übergangsstrukturen identifiziert werden.

Strukturen wie  $T_3T_3'$  und  $R_3R_3'$  sind strukturell identisch zu den korrespondierenden  $X_6$ -Strukturen. Sie unterscheiden sich aber in der Besetzung von Ligand-Positionen und stellen so weitere Schritte in der Transformation der  $T_6$ - in die  $R_6$ -Struktur dar [49].

Die Strukturen können durch Variation der Konzentration von hetero- und homotropen Liganden ineinander überführt werden. Unter heterotropen Liganden versteht man anorganische, meist ionische Moleküle wie  $Cl^-$ ,  $SCN^-$ ,  $CN^-$ ,  $OCN^-$ ,  $N_3^-$  und  $HCO_3^-$ , während homotrope Liganden organische, meist aromatische Substanzen wie Phenol oder m-Kresol sind. Durch Erhöhung der Konzentration dieser Liganden wird wie in der Formel 7.1 gezeigt das Gleichgewicht in Richtung der  $R_6$ -Struktur verschoben.

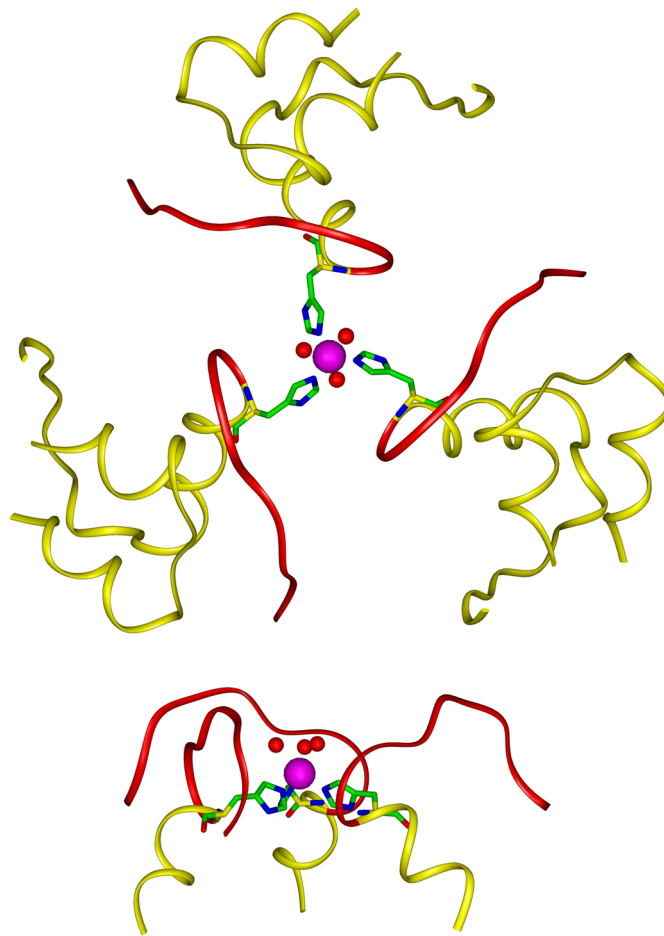


Auf die Bedeutung der Reaktion wird in Abschnitt 7.5 noch genauer eingegangen.

Im Folgenden werden nur die  $T_6$ ,  $T_3R_3$  und die  $R_6$  Konformation genauer beschrieben. Zu den  $T_3T_3'$ ,  $T_3R_3^f$  und  $R_3R_3'$  können in Anhang F ebenfalls genauere Beschreibungen nachgelesen werden.

**$T_6$ -Struktur:** Bei der  $T_6$ -Struktur besitzen alle sechs Monomere wie in Kapitel 7.4.1 erwähnt nur von B9 bis B19 eine  $\alpha$ -helikale Struktur. Da die  $Zn^{2+}$ -Ionen mit den Histidylseitenketten der Histidine B10 wechselwirken, entstehen zwei Chelatzentren sehr nahe an der Oberfläche eines Hexamers. In jedem dieser beiden Chelatzentren wird wie in Abbildung 7.7 gezeigt ein  $Zn^{2+}$ -Ion mit drei Histidinen B10 und drei Wassermolekülen komplexiert. Diese beiden oktaedrischen Zentren sind 15,9 Å entfernt und bilden eine drei-zählige Spiegelachse in einer rhomboedrischen Kristallstruktur [50].

**$T_3R_3$ -Struktur:** Diese Struktur (s. Abb. 7.6) stellt die stabilste Übergangsstruktur zwischen der  $T_6$ - und der  $R_6$ -Struktur dar. Hierbei befindet sich ein Chelatzentrum in der T-, das andere Chelatzentrum in der R-Struktur. Die Struktur bildet sich aus, wenn nur ionische Liganden vorliegen oder die Konzentration der allosterischen,

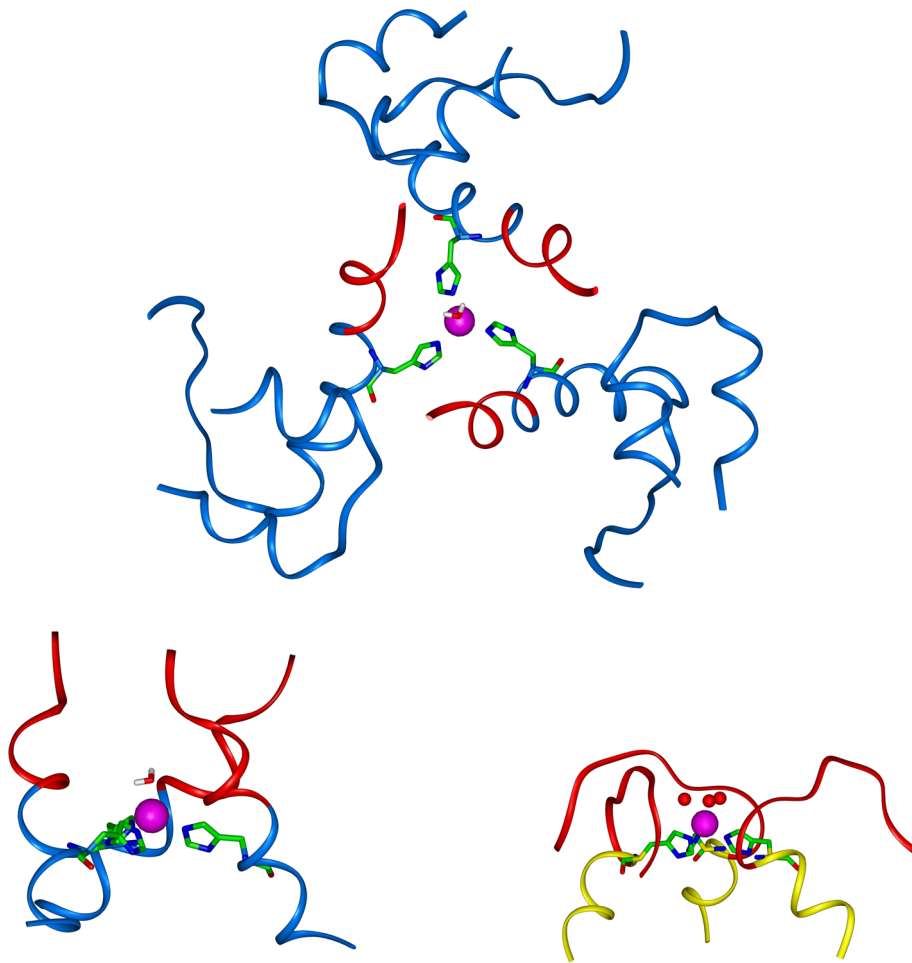


**Abbildung 7.7:** Ein Zink-Chelatzentrum des  $T_6$ -Hexamers. Da hier beide Chelatzentren identisch sind, wurde nur eines dieser Zentren dargestellt; vollständig wäre die Struktur der Abbildung 7.6 sehr ähnlich. Dargestellt ist neben dem gelben Proteinrückgrat auch das  $Zn^{2+}$ -Ion (magenta) und dessen Liganden, 3 Wasser-Moleküle und die drei Seitenketten des Histidin B10 (nach Atomtypen eingefärbt, siehe Farbtabelle im Anhang). Das rot gefärbte Proteinrückgrat hat wie für das T-Konformer üblich keine Sekundärstruktur. Die untere Struktur stellt das Chelatzentrum in der Seitenansicht dar und zeigt die Nähe des Zentrums zur Oberfläche des Komplexes.

aromatischen Liganden zu niedrig ist, um drei der sechs Phenolbindenden Taschen zu besetzen. Die Symmetrie der Struktur ist gestört, da es dem Hexamer aufgrund hoher Spannungen im Komplex nicht möglich ist, zwei Chelatzentren auf einer Achse zu etablieren. Aus diesem Grund entstehen auf der R-Seite drei Chelatzentren, bei denen neben den Histidylseitenketten des Histidins B10 und des Histidins B5 noch zwei heterotrope Liganden am Komplex beteiligt sind. Die-

se liegen außerhalb der Spiegelachse und zerstören so die Symmetrie des Komplexes. Neben dieser asymmetrischen, orthorhombischen Struktur gibt es auch eine symmetrische, rhombische Struktur, die allerdings nur zwei  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen als Chelatzentren auf einer Spiegelachse hat. Deshalb ist auch die frühere Bezeichnung 4Zn-Struktur nicht mehr haltbar [51–54].

**R<sub>6</sub>-Struktur:** In der R<sub>6</sub>-Struktur liegen die Zn-Chelatzentren, wie dies in Abbildung 7.8 der Fall ist, als tetraedrische Komplexe vor. Als Liganden kommen neben Wasser auch andere, meist geladene Teilchen in Frage. Häufig werden hier für die Kristallographie  $\text{Cl}^-$ , für andere spektroskopische Anwendungen auch  $\text{SCN}^-$  und  $\text{CN}^-$ -Ionen verwendet. Die tetraedrische Chelatisierung ist sehr wichtig für die Stabilisierung. Da aber die Metallzentren, wenn überhaupt, nur eine geringe positive Kooperativität aufeinander ausüben, reicht sie nicht für die endgültige Stabilisierung des R<sub>6</sub>-Hexamers aus. Hierfür werden neben den heterotropen Wechselwirkungen der Ionen homotrope Wechselwirkungen mit kleinen aromatischen Molekülen benötigt. Diese binden in einer der sechs sog. Phenolbindenden Taschen eines Hexamer. Die Bindungstasche liegt im Dimer / Dimer-Interface und wird von Aminosäuren unterschiedlicher Dimere gebildet. Wie in Abbildung 7.9 gezeigt ist, wird die Tasche durch die Aminosäuren Histidin B5 eines Dimers und den Aminosäuren Cystein A6, A11 und Leucin B11 eines anderen Dimers begrenzt. In der T<sub>6</sub>-Struktur wird diese Tasche durch die Seitenkette des Leucins B6 ausgefüllt [55, 56]. Phenol verdrängt diese Seitenkette aus der Tasche und bildet mit dem Proteinerückgrat der Cysteine zwei H-Brücken. Dabei wird durch die OH-Gruppe des Phenols eine H-Brücke zum Sauerstoff des Cysteins A6 doniert, während von dem Wasserstoff des amidischen Stickstoffs des Cystein A11 eine H-Brücke akzeptiert wird. Je nach Art des Liganden kommt das Histidin B5 mehr oder weniger koplanar neben dem Ring zu liegen. Durch diese Bindung des Liganden werden die Aminosäuren B1 bis B8 in eine helikale Struktur überführt. Diese Strukturänderung verlängert die  $\alpha$ -Helix der B-Kette, so dass die Chelatzentren tiefer im Molekül liegen und dadurch die tetraedrische Struktur zusätzlich bevorzugt wird. Dadurch bleibt weniger Platz für Liganden über dem  $\text{Zn}^{2+}$ -Zentralatom. Diese allosterische Umlagerung stabilisiert das Hexamer so gut, dass die Lebensdauer der R<sub>6</sub>-Struktur im Vergleich zu der T<sub>6</sub>-Struktur von



**Abbildung 7.8:** Ein Chelatzentrum eines  $R_6$ -Hexamers. Oben sind neben dem blauen Proteinrückgrat das  $Zn^{2+}$ -Ion und seine Liganden dargestellt. Der rote Teil des gezeigten Proteinrückgrates markiert den Bereich, der in der T-Konformation keine spezifische Sekundärstruktur besitzt, jetzt aber als  $\alpha$ -Helix vorliegt. Die untere Abbildung zeigt nur das direkt an den Komplex angrenzende Proteinrückgrat. Die drei Helixenden umschließen den Komplex, wodurch über dem Zentralatom nur noch Platz für einen Liganden verbleibt. In der Seitenansicht (links unten) ist erkennbar, dass hier das Chelatzentrum tiefer in der Struktur des Hexamer liegt, als dies beim T-Trimer in Abbildung 7.7 der Fall ist. Unten rechts ist nochmals die Seitenansicht des T-Chelatzenters als Vergleich dargestellt.

1,25 min auf 8,17 h ansteigt [57–60]. Unklar ist noch, ob diese allosterische Strukturänderung für die Bindung am Rezeptor wichtig ist, oder ob sie nur für die Stabilisierung des Hexamers als Depotform dient. Wissenschaftlich ist diese



Transformation von der T- in die R-Form interessant, da solche Umwandlungen in Metalloproteinen sehr häufig sind. Diese können nur sehr schwer beobachtet werden, weil meistens die Strukturen nicht oder nur sehr schwer zugänglich sind [61].

Interessant ist auch, dass diese Übergänge nicht nur bei Insulin sondern auch bei Pro- und Mini-Pro-Insulin zu beobachten sind. Allerdings ist bei den Pro-Insulinen durch ihre eingeschränkte Beweglichkeit nur eine Transformation bis zur  $T_3R_3$ -Form möglich. Inwiefern dieses Verhalten *in vivo* eine Rolle spielt, ist nicht klar. Bei der Herstellung pharmazeutischer Rezepturen wird diese Transformation allerdings zur Reinigung von Rohextrakten genutzt, da  $T_3R_3$ -Komplexe gut kristallisieren [62].

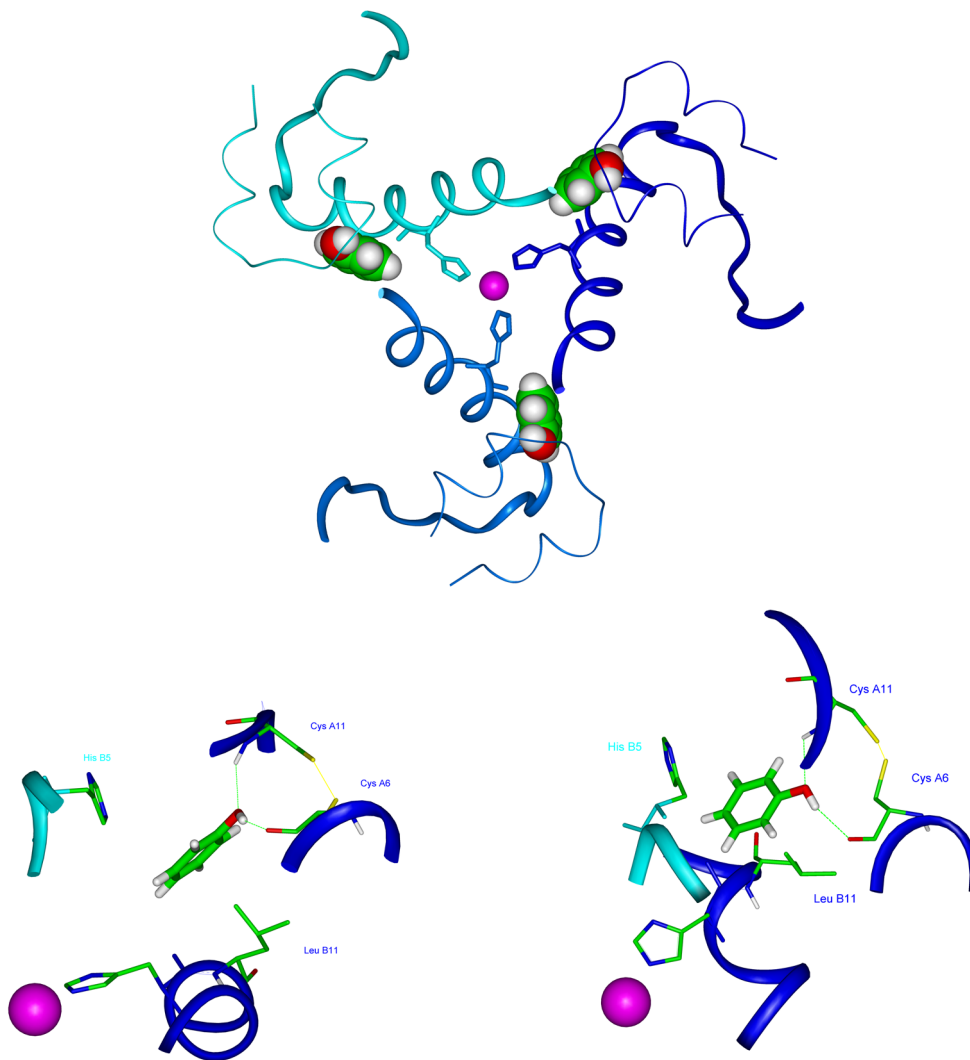
## 7.5 Dissoziation und Wirkprofil des Insulins

Die Dissoziation der Insulin-Aggregate ist für die Diabetes-Therapie von zentraler Bedeutung, da nur das Monomer die hormonelle Wirkung entfaltet.

Für die Dissoziation kann der folgende Mechanismus formuliert werden:

In einer pharmazeutischen Insulin-Formulierung hat man neben den Insulin-Aggregaten noch Zusätze, die für die Haltbarkeit der Formulierung verantwortlich sind und die Pharmakokinetik beeinflussen. Als Stabilisator für Insulin-Lösungen wurden anfangs nur Zinkionen in Form von Zinkoxid oder Zinkacetat zugesetzt, da man wusste, dass Insulin im Körper über Zinkionen komplexiert in den Vesikeln der Langerhans'schen Zellen vorliegt. Phenolische Zusätze sollten anfänglich nur zur Konservierung der Injektionslösung dienen. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese wie schon in Kapitel 7.4.3 erwähnt zusätzlich eine stabilisierende Wirkung auf die Insulin-Oligomere haben [54, 63]. So konnte sogar eine Verzögerung des Wirkungseintritts durch Zusätze von Phenol beobachtet werden.

Nach der Injektion der Insulin-Formulierung müssen zuerst diese Stabilisatoren von den Insulin-Aggregaten abdiffundieren, um Insulin die Dissoziation in seine Wirkform zu ermöglichen. Man geht davon aus, dass zuerst größere Aggregate in einzelne Hexamere zerfallen und die Hexamere ihrerseits von der Phenol-induzierten  $R_6$ -Konformation in die  $T_6$ -Konformation übergehen.

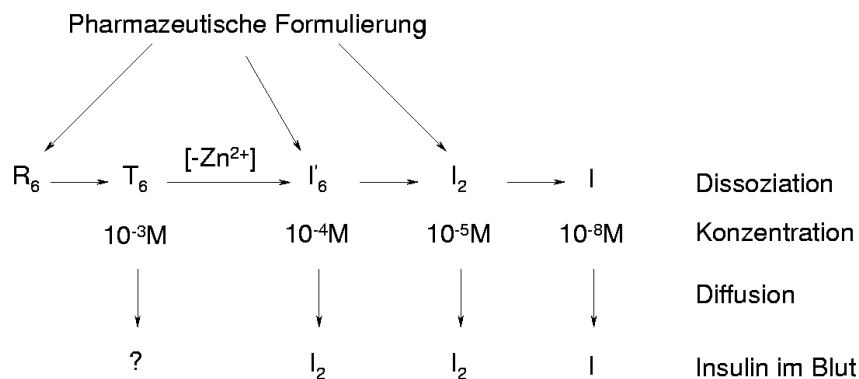


**Abbildung 7.9:** In der oberen Abbildung wird die Anordnung der Phenolmoleküle in einem R-Trimer gezeigt. Durch die unterschiedliche Einfärbung der einzelnen Monomere (hell-, mittel-, dunkelblau) wird die Lage der Phenole im Bereich der Dimer-Dimer Kontaktfläche (Interface) zur Geltung gebracht. In den beiden unteren Abbildungen wird der genaue Bindungsmodus eines Phenols in der Seitenansicht (links) und der Aufsicht (rechts) gezeigt, wobei die H-Brücken zu den Cysteinen A6 und A11 als grün gestrichelte Linien dargestellt sind. Die Aminosäuren Histidin B5 des hellblauen Monomers und Leucin B11 des dunkelblauen Monomers vervollständigen die Bindungstasche.

Die  $R_6$ -Konformation ist sehr stabil und wandelt sich erst allmählich mit sinkender Konzentration der stabilisierenden Phenole in die  $T_6$ -Konformation um (s. Abb. 7.10 oder Funktion 7.1). Während dieser Konformationsänderungen müssen sich die drei Dime-

re eines Hexamers gegeneinander verschieben, wodurch sich die Wechselwirkungen zwischen den Dimeren verringern. Auf diese Weise werden auch die Bindungen zu den Zink-Ionen gelockert und diese werden, da sie im  $T_6$ -Hexamer sehr nahe der Komplexoberfläche liegen, leicht hydrolysiert. Nach der Dissoziation liegt das Hexamer nur noch als lockerer Verband ( $I'_6$ ) der drei Dimere vor (s Abb. 7.10). Dieser wird durch Eindringen von Wasser in den zylindrischen Kanal, der vorher durch das Zink verschlossen war, zerstört. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden Monomeren eines Dimers reichen nicht aus, um das Dimer stabil in Lösung zu halten, so erfolgt nach einiger Zeit die Spaltung des Dimers in die Monomere.

Wie in Abbildung 7.10 gezeigt können sowohl Dimere als auch Monomere in die Blutbahn diffundieren [64, 65].



**Abbildung 7.10:** Schematische Darstellung des Dissoziationsmechanismus von Insulin-Hexameren.

Diese Gegebenheiten führen dazu, dass bei Einsatz von Formulierungen des Wildtyp-Human-Insulins zur Behandlung von Diabetes mellitus die Patienten nach der Injektion von Insulin 10-40 min warten müssen, bis die Wirkung des Insulins eintritt. Die Wirkung hält dann 5-8 Stunden an. Dieser zeitliche Abstand zwischen Injektion und Wirkungseintritt ist von Nachteil, da so bei zu früher Nahrungsaufnahme die Gefahr von Hyperglykämien erhöht wird. Formulierungen des Wildtyp-Human-Insulins, in denen das Insulin direkt als Monomer vorliegt, sind jedoch so instabil, dass sie für den Einsatz am Patienten ungeeignet sind. Für die Insulintherapie kommen daher heute bevorzugt Insulin-Hexamere zum Einsatz, die so schnell zerfallen, dass es zu keinem verzögerten Wirkungseintritt nach der Injektion kommt.

Da die Insuline anderer Spezies wie Schweine- oder Rinderinsulin in etwa das gleiche

Wirkprofil aufweisen und dazu noch immunologische Reaktionen hervorrufen können, ist deren Verwendung für die Insulinsubstitution obsolet. Deshalb werden Insuline der oben genannten Spezies nur noch von Patienten verwendet, die diese Insuline schon seit Jahren verwenden, ohne dass Komplikationen aufgetreten sind. Aber eine Weiterentwicklung dieser Insulinformulierungen findet praktisch nicht mehr statt.

Das gewünschte Wirkprofil konnte durch gentechnologische Veränderung des Insulins erreicht werden. Die seit einigen Jahren in die Therapie eingeführten Insulinanaloge LysPro (1996) und Aspart (1999) besitzen nahezu ein ideales Wirkprofil, um die Erhöhung des Glucosespiegels nach einer Mahlzeit zu kompensieren. Bei diesen Insulinanaloga beträgt der Spritz-Ess-Abstand maximal 10 min und die Wirkdauer ist auf 3-4 Stunden begrenzt. Durch Austausch von Aminosäuren am C-terminalen Ende der B-Kette wurden bei diesen Insulinen die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren eines Dimers entscheidend geschwächt. So wurde bei dem LysPro-Analogon die Stellung des Prolins B28 mit der des Lysins B29 einfach vertauscht (s. Abb. 7.5), während im Aspart-Analogon das Prolin B28 durch ein Aspartat ersetzt wird. Das hat zur Folge, dass die Salzbrücke, die im Wildtyp-Insulin zwischen dem Lysin B29 des einen Monomers und dem Glutamat B21 des anderen Monomers auftritt (s. Kapitel 7.4.2), sterisch verändert wird. Wegen dieser Veränderung wird der positive kooperative Effekt zwischen den beiden Chelatzentren geschwächt, so dass sie sich kaum noch gegenseitig stabilisieren können. Damit wird die Transformation von  $R_6$  nach  $T_6$  entscheidend vereinfacht und beschleunigt. Genauso ist der  $I'_6$ -Komplex, in dem das Hexamer nur noch durch Dimer-Dimer-Wechselwirkungen zusammengehalten wird, stark geschwächt. Die Dimere verschieben sich bei der Konformationsänderung stärker gegeneinander als beim Wildtyp-Insulin und die meist hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Dimeren können nicht mehr aufrecht erhalten werden. Verschiedene spektroskopisch arbeitende Forschungsgruppen gehen sogar davon aus, dass sich der  $I'_6$ -Komplex schon bei den unterschiedlichen  $R_xT_x$ -Konformeren bilden kann und diese direkt die Monomere der Insulinanaloga freisetzen. Die Schwächung der Selbstassoziation des Insulins ist also der Grund für den wesentlich schnelleren Wirkungseintritt bei den Insulinanaloga [52, 66].

Der exakte Mechanismus ist bei den Insulinanaloga allerdings noch unklar, da die Auswirkungen der Mutationen noch nicht vollständig bekannt sind.

# Kapitel 8

## Durchführung

Alle bisher gezeigten Daten beruhen entweder auf röntgenkristallografischen oder NMR-spektroskopischen Methoden oder auf in-vivo Tests in unterschiedlichen Tiermodellen. Bekannt sind nur Daten weniger spektroskopisch fassbarer Übergangsstrukturen und der Verlauf des Blutinsulinspiegels nach der Injektion der unterschiedlichen Insuline. Eine molekulare Aufklärung des gesamten Dissoziationsmechanismus ist mit den derzeitigen bekannten experimentellen Methoden nicht möglich.

Auch theoretische Methoden stoßen hier an ihre Grenzen, da es technisch bisher nicht möglich ist, Berechnungen von Proteinen in einer wässrigen Umgebung in einem Zeitfenster von mehreren Minuten, wie dies bei der Dissoziation von Insulinkomplexen nötig wäre, durchzuführen. Vorteil der theoretischen Methoden ist allerdings, dass man durch eine sehr gezielte Beeinflussung der Umgebung der zu untersuchenden Moleküle Mechanismen drastisch beschleunigen kann, um somit zumindest einen groben Einblick in die Dynamik molekularer Prozesse zu bekommen.

Da die stärksten Protein-Protein-Wechselwirkungen des Insulins auf der Ebene der Dimere liegen und diese auch entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des Hexamer-Komplexes haben, sind die folgenden Berechnungen an den Dimeren mehrerer Konformere der humanen Wildtyp-Insuline sowie den Kristallstrukturen der in der Therapie verwendeten Insulinanaloga LysPro und Aspart umgesetzt worden.

## 8.1 Verwendete Insuline

Als Ausgangsdaten für die Moleküldynamiken wurden mehrere Strukturen aus der Protein-Datenbank [23] verwendet.

Um den Einfluss der unterschiedlichen B-Ketten Konformationen zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Konformationen des Human-Insulins verwendet. Als Vertreter der  $R_6$ -Konformation wurde die Struktur 1AIY.pdb [67] ausgewählt. Von diesem NMR-Ensemble mit 20 Strukturen wurde die erste Struktur (Frame) als Ausgangsbaustein verwendet. Aus dieser Struktur wurde das erste Dimer des Hexamers extrahiert und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zur Berechnung der  $T_3R_3$ -Struktureigenschaften wurde die Struktur 1FUB.pdb [68] verwendet. Da die  $T_6$ -Struktur des Human-Insulins in der Protein-Datenbank fehlte, wurde auf die Struktur eines Schweine-Insulins zurückgegriffen. Die Struktur 3INS.pdb [46] unterscheidet sich demnach von der  $T_6$ -Struktur des Human-Insulins wie in Abbildung 7.1 gezeigt durch den Austausch des N-terminalen Threonin gegen ein Alanin, was aber auf die Dissoziationseigenschaften keine Auswirkung haben dürfte.

Für die Untersuchungen zum Zerfall von Insulinanaloga, wurden für das LysPro-Analogon die Struktur 1LPH.pdb [52] und für das Aspart-Analogon die Struktur 1ZEG.pdb [69] verwendet. In diesen Röntgenkristallstrukturen liegt das LysPro-Analogon als  $T_3R_3$ -Struktur und das Aspart-Analogon als  $R_6$ -Struktur vor.

Da für die Berechnung immer nur Dimere betrachtet wurden, ergibt sich, dass für  $T_6$ -Strukturen ein  $T_2$ -Dimer, für  $T_3R_3$ -Strukturen ein TR-Dimer und für  $R_6$ -Strukturen entsprechend eine  $R_2$ -Struktur eingesetzt wurden.

Alle Strukturen wurden zunächst mit dem Programm-Paket Insight II bearbeitet. Hierbei mussten einige Aminosäurestrukturen noch vervollständigt werden, da diese nicht komplett aufgeklärt worden waren. Außerdem wurden bei allen Strukturen das Kristallwasser und Zusatzstoffe wie Phenole entfernt, so dass neben dem Protein nur noch die Zinkionen, falls vorhanden, in den Berechnungen benutzt wurden. Diese Bearbeitung ist nötig, da ansonsten das GROMACS Krafffeld die Strukturen nicht als Proteine erkennt und somit die Strukturen nicht in das für die Berechnungen nötige GROMACS Format übersetzen.

Im nächsten Schritt wurden die Strukturen für das GROMACS Krafffeld (siehe Kapitel 3.1) adaptiert. Dabei musste überprüft werden, ob während der Konvertierung der Proteinkoordinaten auch alle Disulfidbrücken korrekt erkannt wurden. Dieses konnte im

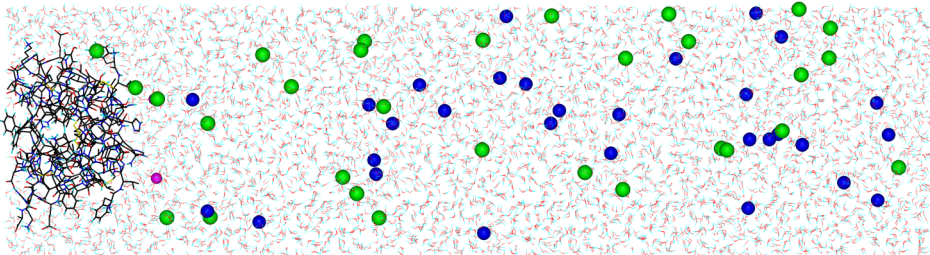
GROMACS nur durch einen *merge* Befehl erreicht werden. Das hat zur Folge, dass das Programm das Dimer als ein einziges Molekül betrachtet und nicht jede Kette als separates Molekül behandelt, obwohl alle Termini korrekt gesetzt wurden. Darum wurden in den folgenden Analysen der Berechnung alle Aminosäuren des Dimers von 1 bis 102 durchnummeriert. Auf diese Weise repräsentieren die Aminosäuren 1-51 die A- und B-Kette des ersten Monomers, während die Aminosäuren von 52-102 die Ketten des zweiten Monomers darstellen.

Anschließend wurden alle Strukturen einer Kraftfeld-Geometrieoptimierung im Vakuum unterzogen. Diese ist erforderlich, um etwaige Verzerrungen in der Kristallstruktur auszugleichen, die sich durch Packungskräfte oder andere auf die kristallografische Methode zurückzuführende Unschärfen in den Atomkoordinaten ergeben können.

Die so gewonnenen Strukturen stellten die Ausgangsdaten für alle weiteren Untersuchungen zur Dissoziation der Insulin-Dimere dar.

## 8.2 Bau der Dissoziationsbox

Für die Simulationen des Dissoziationsmechanismus wurde die in Abbildung 8.1 gezeigte Wasserbox konstruiert.



**Abbildung 8.1:** Darstellung einer Dissoziationsbox. Das Insulin-Dimer ist nach Atomtypen koloriert und am linken Rand des Kanals positioniert. Die als Linien gezeigten Wassermoleküle und die durch Kugeln dargestellten Na- und Cl-Ionen füllen als isotonische NaCl-Lösung die restliche Box auf.

Um eine Dissoziation simulieren zu können, muss für die getrennten Moleküle genügend Platz zur Verfügung stehen. Deshalb wurde für die Dissoziation der Insulin-Dimere eine Box mit 5 nm Höhe, 5 nm Breite und einer Länge von 15 nm erstellt. In

dieser Box wurde das Insulin-Dimer so positioniert, dass es an einem Ende der Box mittig zu liegen kommt (Koordinaten(x,y,z)=2,5x2,5x2,5 nm).

Für die Bestimmung der Boxdimension wurde zuerst um ein Insulin-Dimer eine Box in der Größe des Insulins gelegt und diese in jede Raumrichtung um 0,9 nm verlängert. Da hierbei sehr unhandliche Größen für die Positionierung heraus kamen, wurden die Kantenlängen auf die nächst größere ganze Zahl aufgerundet (5 nm). Bei der Dimensionierung der Box in x-Richtung wurde die Kantenlänge mit 3 multipliziert, um abzusichern, dass für die Trennung der Moleküle genügend Platz ist. Somit war erreicht, dass sich die Moleküle nach der Trennung auch durch weitreichende Interaktionen nicht mehr beeinflussen können.

Weiterhin wurde darauf geachtet, dass alle zu vergleichenden Proteine die gleiche räumliche Ausrichtung haben, um vergleichbare Bedingungen für alle simulierten Proteine zu gewährleisten.

Nach der Positionierung des Proteins wurde die Box mit etwa 12 000 Wassermolekülen aufgefüllt. Zur Einstellung einer isotonischen Kochsalzlösung, wurden insgesamt 96 Wassermoleküle durch je 48 Natrium- bzw. Chlorid-Ionen ausgetauscht und zufällig über die ganze Box verteilt.

Um eventuell nach dem Hinzufügen der isotonischen Lösung entstandene van-der-Waals-Überlappungen zu beseitigen, musste das gesamte System einer Geometrieoptimierung unterzogen werden. Im ersten Schritt wurde dazu die „*steepest-descent*“- , danach die „*conjugate gradient*“ - Methode (s. Abschnitt 3.1.1.2) verwendet. Erst diese optimierten Ensembles können für die weiteren Simulationen verwendet werden, da so unnatürlich hohe Energien in den Startstrukturen, die zum Abbruch der Dynamik führen würden, zu vermeiden waren.

### 8.3 Ablauf einer Simulation

Die eigentliche Dissoziation wurde mittels Moleküldynamik simuliert. Während einer 4 ns (oder 4.000.000 Zeitschritte à 1 fs) langen Dynamik wurden die Wassermoleküle in x-Richtung beschleunigt. In den ersten 2 ns wurde für die Wassermoleküle eine Beschleunigung von  $0.03 \text{ nm ps}^{-2}$  gewählt. Nach 2 ns wurde die Beschleunigung auf  $0.05 \text{ nm ps}^{-2}$  erhöht, um eine vollständige Trennung zu erreichen. Während der gesamten Simulation wurde das Proteinrückgrat der Aminosäuren Ser A9 bis Tyr A14



eines Monomers mit einer Kraft von  $1000 \text{ kJ mol}^{-1}$  festgehalten (siehe Position Restraint in Abschnitt 3.1.2.3). Diese Aminosäuren wurden gewählt, da sie nicht an den Monomer-Monomer-Interaktionen beteiligt sind und keine wichtige Sekundärstruktur enthalten. Daher wurde angenommen, dass eine Rückhaltekraft, die an dieser Stelle angreift, den geringstmöglichen Einfluss auf die Trennung der Monomere hat.

Nach der vollständigen Trennung der Monomere wurde eine 2 ns lange Equilibrierungsdynamik durchgeführt. Um Wechselwirkungen zwischen den Monomeren auszuschließen, diente als Startstruktur für diese zweite Dynamik ein Frame, bei dem die Monomere den größtmöglichen Abstand voneinander hatten. Während der Dynamik wurden weder eine Wasserströmung noch eine Rückhaltekraft definiert, damit sich die Monomere möglichst gut relaxieren können.

Alle beschriebenen Dynamik-Simulationen wurden bei 310 K und mit *periodic boundary conditions*<sup>1</sup> durchgeführt.

---

<sup>1</sup>Bei periodic boundary conditions wird an jede Seite der Simulationsbox eine weitere Box gespiegelt, so dass beim Austritt eines Moleküls aus einer Seite der Box dieses auf der anderen Seite wieder hinzugefügt wird. So wird die Zahl der Moleküle in der Simulationsbox konstant gehalten.



# Kapitel 9

## Dissoziationseigenschaften der Insuline und der Insulinanaloga

Gemäß dem in Kapitel 8.3 beschriebenen Ablauf der Simulation wurden 15 Dynamiken erstellt; je drei für jede verwendete Struktur. Anschließend wurden die beiden Dynamiken, mit denen die Dissoziation der Moleküle simuliert wurde, zu einer „Trajectorie“<sup>1</sup> zusammengefügt und diese als eine Simulation ausgewertet. Die Simulationen zur Relaxation der Moleküle nach der Dissoziation wurden nur dann ausgewertet, wenn es durch die Simulation nicht zur Zerstörung größerer Teile der Sekundär- und Tertiärstruktur der Moleküle kam.

Um die Dissoziationseigenschaften der Moleküle besser darstellen zu können, werden in den folgenden Abschnitten zuerst die einzelnen Konformere der humanen Wildtyp-Insulin-Dimere analysiert, um im Anschluss daran diese Daten mit denen der Insulinanaloga zu vergleichen.

### 9.1 Vergleich der Wildtyp-Human-Insulin Konformere

Da die Stabilität des Human-Insulins entscheidend von der Hexamer-Konformation beeinflusst wird, wurde für die Strukturen  $R_6$ ,  $T_3R_3$  und  $T_6$  je ein Dimer simuliert, um dessen Dissoziationseigenschaften zu analysieren. Experimentell ist nachgewiesen, dass erst bei der  $T_6$ -Struktur die Dissoziation des Human-Insulins in seine Dimere und anschließend in die Monomere möglich ist. In den Simulationen spiegelt sich dies nicht

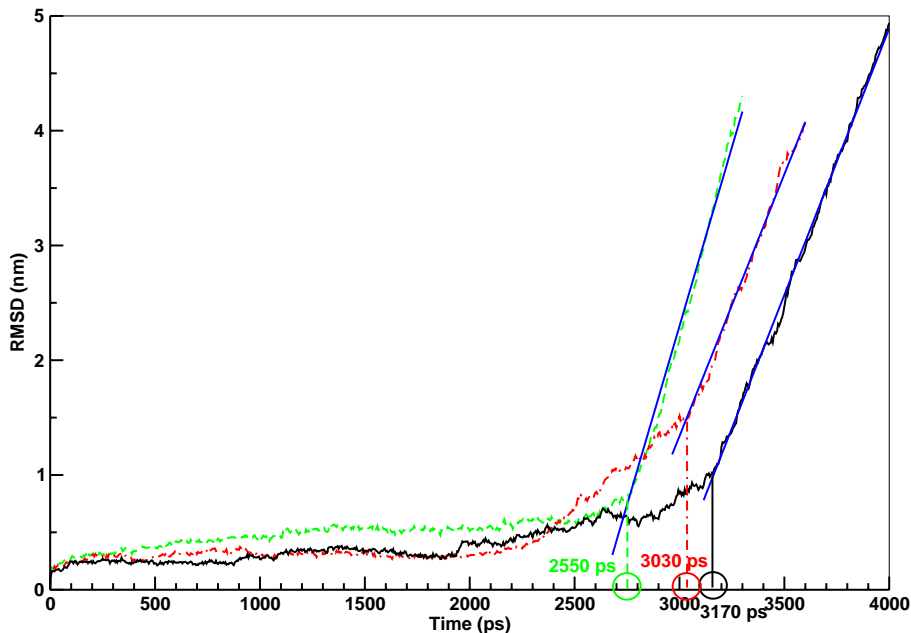
---

<sup>1</sup>Eine Trajectorie ist eine Datei, in der die Daten einer Simulation gespeichert werden.

wider, da es durch eine sehr starke Bindung zwischen den Monomeren beim  $R_2$ - und TR-Dimer im Laufe der MD Simulation zur Zerstörung des festgehaltenen Monomers kommt und damit die Simulationen nur bedingt auswertbar sind.

### 9.1.1 Zerfallszeiten der Insulin-Konformere

Der Dissoziationszeitpunkt eines Dimers kann sehr gut mittels RMSD-Wert des freien Monomers ermittelt werden, wenn man den RMSD-Wert in Bezug zu den Koordinaten der Ausgangsstruktur, d.h. ohne Überlagerung bestimmt.



**Abbildung 9.1:** RMSD- Wert des freien Monomers der Wildtyp-Konformere. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das  $R_2$ -Dimer, die rote, unterbrochene Kurve das TR- und die schwarze, durchgezogene Kurve das  $T_2$ -Dimer dar.

Wie in Abbildung 9.1 zu erkennen ist, zerfallen die Dimere in umgekehrter Reihenfolge zu den erwarteten Wirkungsprofilen. So sind die  $R_2$ -Dimere nach 2,55 ns, die TR-Dimere nach 3,03 ns und die  $T_2$ -Dimere nach 3,17 ns vollständig getrennt. Ermittelt werden die Zerfallzeiten als der Punkt, an dem das freie Monomer durch die Wassermoleküle beschleunigt wird. Zu diesem Zeitpunkt kann man davon ausgehen, dass keine Wechselwirkung mehr zwischen den Monomeren stattfindet. Der Dissoziationszeitpunkt, gekennzeichnet durch einen abrupten steilen Anstieg des RMSD-Wertes, wird durch Extrapolation als Schnittpunkt mit der X-Achse ermittelt.

Die Umkehrung der Zerfallszeiten ist auf den ersten Blick überraschend, denn wie in Kapitel 7.4.3 auf Seite 60 gezeigt sind die R<sub>6</sub>- und T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>-Hexamere deutlich stabiler. Allerdings kann man aus den im selben Kapitel gezeigten spektroskopischen Daten auch ersehen, dass sich die Anordnung der Monomere zueinander ändert und damit ebenfalls die Wechselwirkungen der Monomere eines Dimers variieren. In den folgenden Abschnitten werden einzelne Aspekte beschrieben, die für die Änderung der Dissoziationszeit verantwortlich sind und das unerwartete Verhalten der Konformere erklären können.

### 9.1.2 Deformation der festgehaltenen Monomere

Zur Ermittlung der Deformation der festgehaltenen Monomere wird vor der Berechnung des RMSD-Wertes die Startstruktur mit der jeweiligen Struktur eines Frames<sup>2</sup> überlagert.

Schon bei der Betrachtung der einzelnen Simulationen fällt auf, dass bei den R<sub>2</sub>- und TR-Dimeren das festgehaltene Monomer wesentlich stärker deformiert wird als bei den T<sub>2</sub>-Dimeren. Die Deformation des festgehaltenen Monomers geht so weit, dass wie in Abbildung 9.2 gezeigt die Tertiärstruktur zerstört wird.

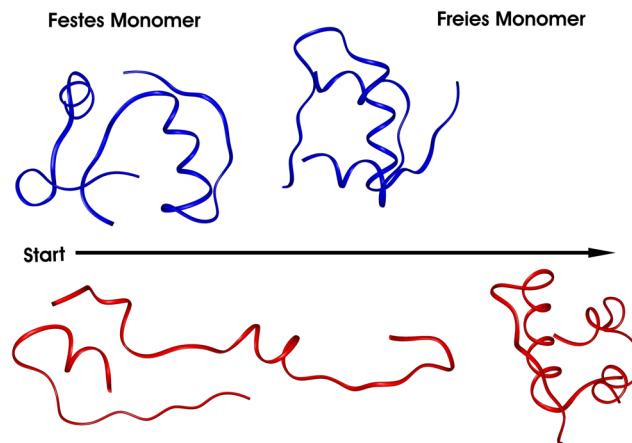
Grafisch ist die Zerstörung durch den Verlauf des RMSD-Wertes des festgehaltenen Monomers (s. Abb. 9.3) darstellbar. Man sieht, wie stark sich die R<sub>2</sub>- und TR-Dimere im Vergleich zum T<sub>2</sub>-Dimer deformieren. So werden das R<sub>2</sub>- und TR-Dimer mit einem maximalen RMSD-Wert von 1,5 nm dreimal so stark deformiert wie das T<sub>2</sub>-Dimer mit einem maximalen Wert von 0,5 nm. Man erkennt auch, dass R<sub>2</sub>- und TR-Dimer sich sehr ähnlich verhalten.

### 9.1.3 Wechselwirkungen innerhalb der festgehaltenen Monomere

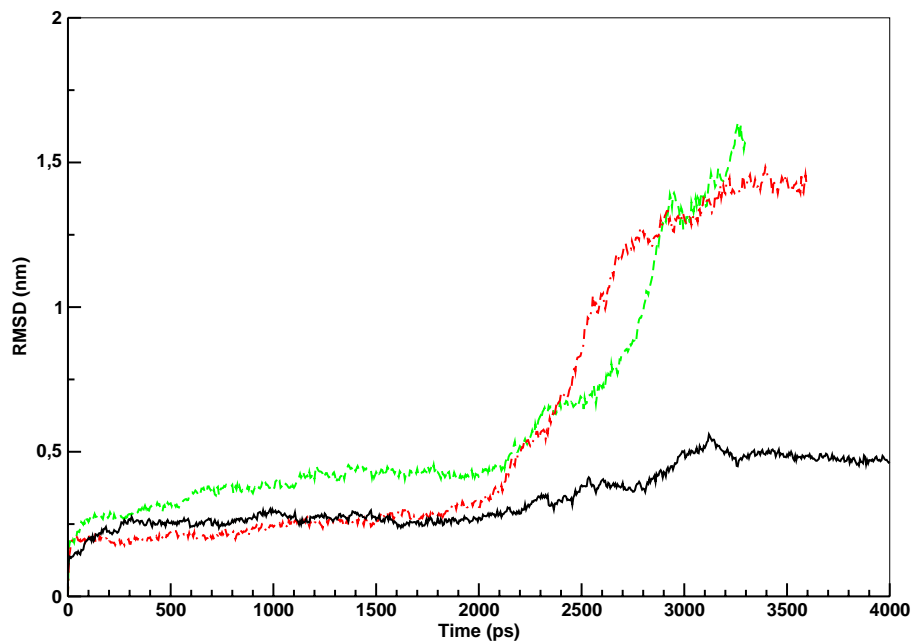
Da der einzige Unterschied zwischen den T<sub>2</sub>- und R<sub>2</sub>-Dimeren die Variation in der B-Kettenkonformation ist, muss das unterschiedliche Verhalten des festgehaltenen Monomers auf diese Konformationsänderung zurückgeführt werden. Demnach müssen im Bereich der Aminosäuren B1 - B9 Wechselwirkungen innerhalb des T-Monomers zu finden sein, die für die Stabilisierung der Struktur des festgehaltenen Monomers sorgen.

---

<sup>2</sup>Frame ist die Bezeichnung für die Struktur eines Moleküls zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Trajektorie

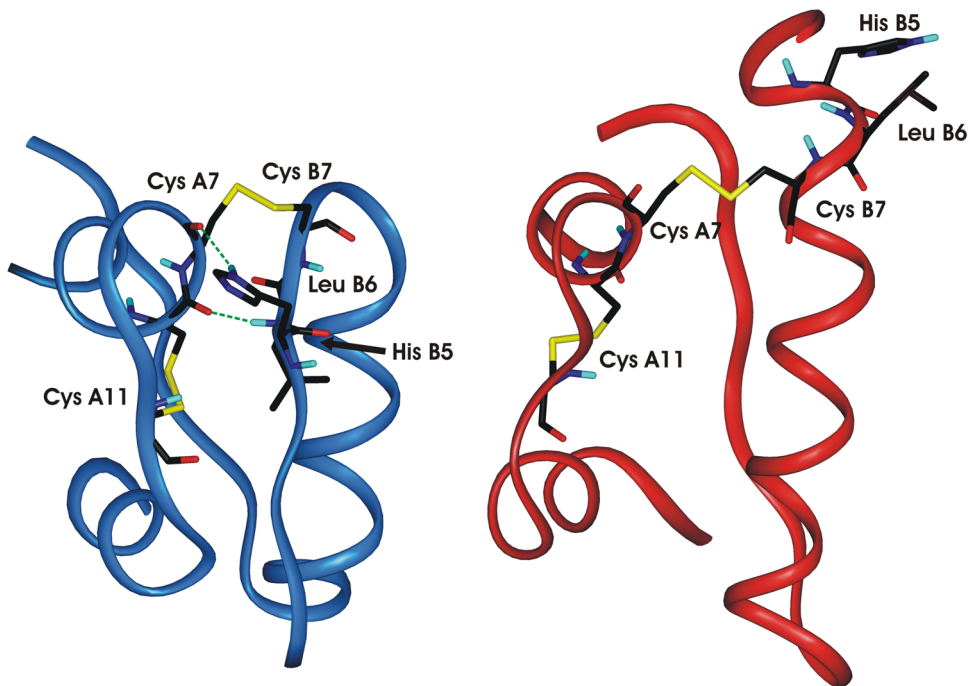


**Abbildung 9.2:** Vergleich des  $T_2$ -Dimers (blau) mit dem  $R_2$ -Dimer (rot) kurz vor der Dissoziation. Links die beiden festgehaltenen Monomere rechts das jeweils freie Monomer. Für beide Strukturen ist nur der Verlauf des Proteinrückgrates dargestellt. Man erkennt, dass das  $R_2$ -Dimer während der Dissoziation wesentlich stärker deformiert wird als das  $T_2$ -Dimer. Durch den Pfeil wird die Fließrichtung des Wassers angezeigt.



**Abbildung 9.3:** RMSD-Werte der festgehaltenen Monomere. Die Färbung der Kurven ist analog der Abbildung 9.1. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das  $R_2$ -Dimer, die rote, unterbrochene Kurve das  $TR$ -Dimer und die schwarze, durchgezogene Kurve das  $T_2$ -Dimer dar. Man erkennt die deutlich stärkere Deformation der  $R_2$ - und  $TR$ -Dimere im Vergleich zum  $T_2$ -Dimer.

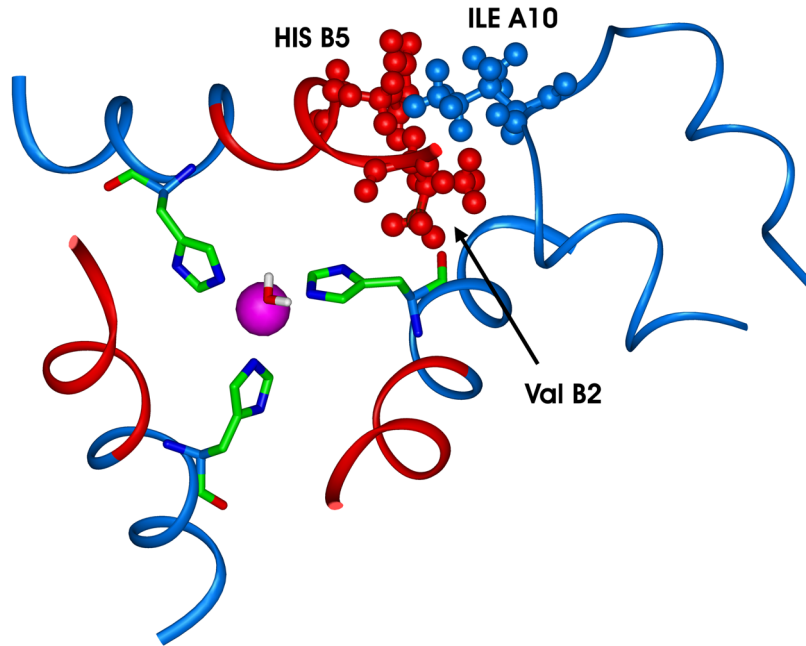
In Abbildung 9.4 werden zwei dieser intramonomeren Wechselwirkungen exemplarisch für eine Reihe weiterer Interaktionen dargestellt. Sehr gut ist zu erkennen, dass beim T-Konformer die Aminosäuren Histidin B5 und Leucin B6 der B-Kette H-Brücken mit den Aminosäuren Cystein A6 und A7 der A-Kette eingehen, während im R-Konformer diese Aminosäuren weit voneinander entfernt sind.



**Abbildung 9.4:** Vergleich der intramolekularen Wechselwirkungen eines T- und R-Monomers. Das T-Monomer (blau) ist durch zusätzliche Wechselwirkungen wie z.B. H-Brücken (grün) stabiler als das R-Monomer.

Vergleicht man die gesamten Strukturen der T- und der R-Konformerer miteinander, erkennt man, dass durch die verlängerte  $\alpha$ -Helix im R-Konformer weniger Wechselwirkungen zwischen den Protein-Ketten eines Monomers ausgebildet werden können. Betrachtet man aber die Lage der Helix in einem Hexamer-Komplex (s. Abb. 7.8 auf Seite 64, roter Helixabschnitt), so wird deutlich, dass das Zn-Chelat als das wesentliche stabilisierende Element eines solchen Komplexes durch die um 9 Aminosäuren erweiterte Helix geschützt und stabilisiert wird. Außerdem kann die längere Helix mit Aminosäuren des benachbarten Dimers wechselwirken, so dass dadurch eine signifikante Stabilisierung des Hexamers resultiert. In Abbildung 9.5 wird die Stabilisierung

anhand der Seitenketten-Kontakte zwischen der Aminosäure Histidin B5 und Valin B2 der verlängerten Helix und Isoleucin A10 der A-Kette des benachbarten Monomers dargestellt. Hierbei verzahnen sich die Proteine regelrecht ineinander.



**Abbildung 9.5:** Wechselwirkung zwischen Valin B2 ( Val B2) und Histidin B5 (HIS B5) der verlängerten Helix im R-Konformer und Isoleucin A10 (ILE A10) des benachbarten Dimers. Die wechselwirkenden Aminosäuren sind als Ball&Sticks dargestellt.

Der in der Simulation ermittelte schnellere Zerfall des TR- und R<sub>2</sub>-Dimers stellt keinen Widerspruch zur erhöhten Stabilität des T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>- und des R<sub>6</sub>-Hexamers dar. Denn nur durch die Erhöhung der Flexibilität aufgrund der Schwächung intramolekularer Wechselwirkungen innerhalb eines Monomers dürfte es dem Hexamer-Komplex möglich sein, vom R<sub>6</sub>- in das T<sub>6</sub>-Konformer zu wechseln, ohne dabei zerstört zu werden. So bleibt auch die Monomer-Monomer-Wechselwirkung innerhalb eines Dimers erhalten.

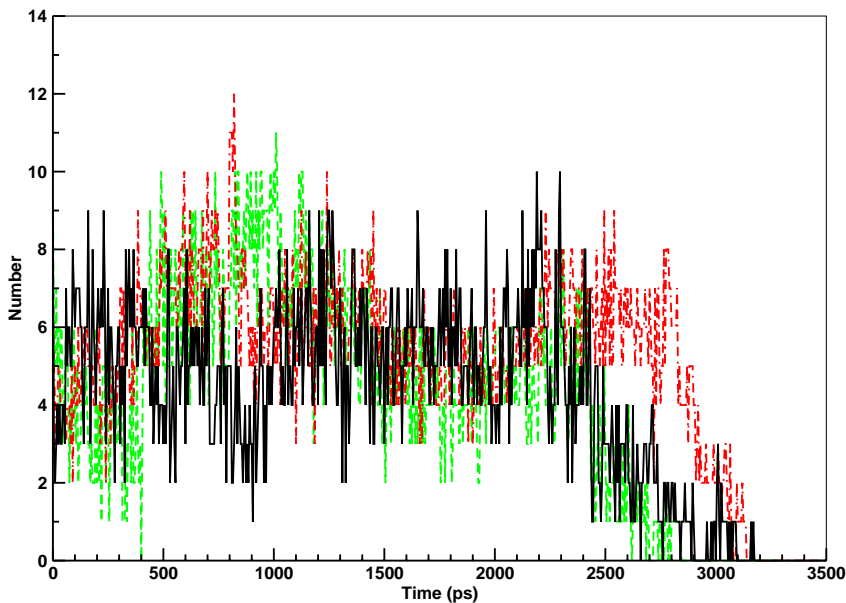
Dies ist auch ein weiterer Hinweis dafür, dass ein Hexamer erst in die T-Konformation wechseln muss, um dissoziieren zu können. Dies bedeutet auch, dass nur T<sub>2</sub>-Dimere im Wildtyp-Insulin in die Monomere dissoziieren. Aus diesem Grund wird in den folgenden Untersuchungen des LysPro- und des Aspart-Insulinanalogons das T<sub>2</sub>-Dimer des Wildtyp-Insulins als Vergleich betrachtet.



### 9.1.4 H-Brücken zwischen den Monomeren der Wildtyp-Insulin-Konformere

Um die Stabilität eines Dimer-Komplexes zu dokumentieren, können die Anzahl und die Lebensdauer der H-Brücken zwischen den Monomeren als ein Kriterium herangezogen werden.

Als Voraussetzung für die Existenz einer H-Brücke wurden für die Detektion folgende Parameter verwendet: Es durften maximal ein Abstand von 2,5 Å zwischen Wasserstoff- und Akzeptoratom sowie ein Winkel von maximal 60° zwischen der Donorgruppe und dem Akzeptoratom auftreten. Werden diese Bedingungen nicht erfüllt, so gilt die H-Brücke als gebrochen.



**Abbildung 9.6:** Anzahl der H-Brücken zwischen den Monomeren der einzelnen Konformere. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das R<sub>2</sub>-Dimer, die rote, unterbrochene Kurve das TR-Dimer und die schwarze, durchgezogene Kurve das T<sub>2</sub>-Dimer dar.

Vergleicht man die drei Kurven miteinander (s. Abb. 9.6), so erkennt man, dass zu Beginn der Simulation bis etwa 2300 ps bei allen drei Dimeren, bis auf wenige Ausnahmen, die wahrscheinlich durch unterschiedliche Relaxationsbewegungen der einzelnen Konformere hervorgerufen werden (Bereich zwischen 500 und 1200ps), etwa die gleiche Anzahl an H-Brücken zwischen den Monomeren existiert. Erst danach driften die drei Kurven auseinander. Während die Anzahl der H-Brücken im R<sub>2</sub>- und T<sub>2</sub>-Dimer

zwischen 2300 und 2900 ps nach und nach abnimmt, bleiben die H-Brücken beim TR-Dimer bis etwa 2800 ps stabil und werden erst danach sehr schnell abgebaut. Ebenso ist erkennbar, dass sich beim T<sub>2</sub>-Dimer von 2650 ps bis zur Dissoziation über einen Zeitraum von ca. 450 ps die Zahl der H-Brücken bei ein bis zwei einpendelt, während beim R<sub>2</sub>- und TR-Dimer sukzessive alle H-Brücken zerstört werden.

Die letzten H-Brücken werden beim R<sub>2</sub>-Dimer bei 2840 ps, beim TR-Dimer bei 3135 ps und beim T<sub>2</sub>-Dimer bei 3170 ps detektiert.

Betrachtet man den Verlauf der drei Kurven, stellt man eine sehr starke Übereinstimmung zwischen den einzelnen Konformeren fest. Dies ist auch nicht weiter verwunderlich, da sich durch die Änderung der Konformation keine dramatischen Änderungen in der Monomer-Monomer-Wechselwirkung eines Dimers ergeben. Der frühere Zerfall der H-Brücken beim R<sub>2</sub>- und TR-Dimer kommt nicht durch Beeinflussung der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen zustande, sondern ist die Folge der starken Deformation des festgehaltenen Monomers. Diese Deformation entsteht durch die beschriebene Änderung intramolekularer Wechselwirkungen. Deshalb werden hier keine weiteren Wechselwirkungstypen wie z. B. Salzbrücken untersucht.

Die Vorgänge im Verlauf dieser Simulationen werden in Kapitel 10.1 der vorliegenden Untersuchung noch genauer diskutiert.

## 9.2 Vergleich der Insulinanaloga mit dem Wildtyp-Insulin (T<sub>2</sub>-Konformer)

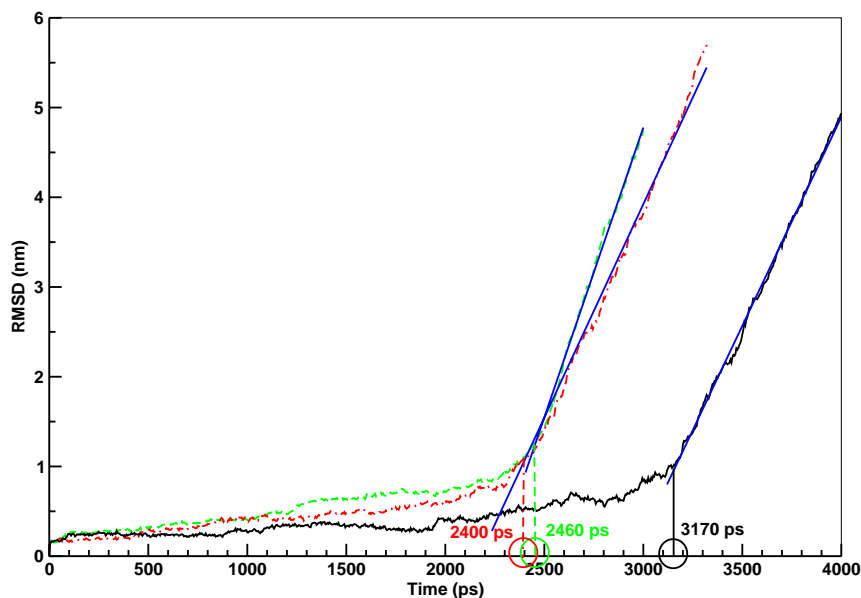
Während beim Wildtyp-Insulin die bis zur Dissoziation zu durchlaufenden Übergangsstrukturen weitestgehend bekannt sind, ist die Aufklärung bei den Insulinanaloga noch lückenhaft. Bei diesen Insulinen sind die für die Bestimmung des Mechanismus wichtigen Strukturen so instabil, dass sie bisher noch nicht spektroskopisch erfasst werden konnten. Für das LysPro-Insulin ist es z.B. noch nicht gelungen, ein T<sub>6</sub>-Hexamer nachzuweisen. Deshalb wird vermutet, dass bei den schnell zerfallenden Insulinen der Hexamerkomplex sehr instabil ist und somit keine Zeit für die Transformation in die T-Form verbleibt. Dies würde bedeuten, dass die Zinkionen früher aus den Phenol induzierten Strukturen dissoziieren und der Hexamer-Komplex, während er noch in den verschiedenen R-Konformationen vorliegt, zerfällt [52, 66, 70].

Diese Annahme kann durch die folgenden Simulationen bestätigt und teilweise erklärt

werden.

### 9.2.1 Zerfallszeiten der Insulinanaloga

Die Auswertung erfolgte hier in gleicher Weise wie in Kapitel 9.1.1. Als Vergleich wurde das T<sub>2</sub>-Dimer des Wildtyp-Insulins verwendet, da es das dissoziierende Dimer des Wildtyp-Insulins darstellt.



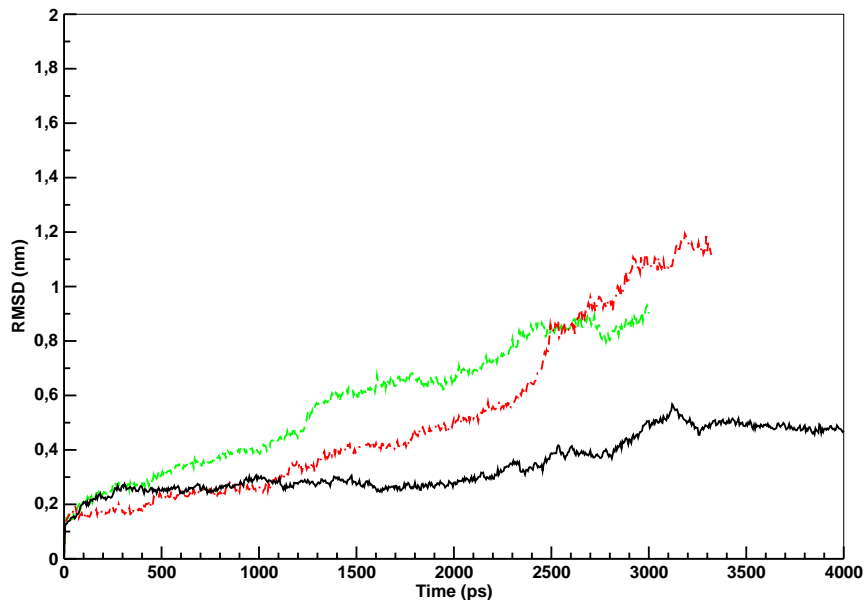
**Abbildung 9.7:** RMSD-Werte der freien Monomere. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin (T<sub>2</sub>-Dimer) dar. Die blauen Geraden sind Hilfslinien zur Ermittlung des Dissoziationszeitpunktes.

Bei den Insulinanaloga zerfallen die Komplexe wie in Abbildung 9.7 gezeigt in der erwarteten Reihenfolge. Das heißt, die Insulinanaloga dissoziieren früher als das Wildtyp-Dimer. So zerfällt das LysPro-Insulin nach 2,40 ns, das Aspart-Insulin nach 2,46 ns und das Wildtyp-Dimer nach 3,17 ns.

Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der Dissoziationszeit und die Ursachen für die schnellere Dissoziation werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### 9.2.2 Deformation der festgehaltenen Monomere

Wie schon bei den unterschiedlichen Konformeren des Wildtyps gezeigt kommt es auch bei den Insulinanaloga zu einer Deformation des festgehaltenen Monomers.



**Abbildung 9.8:** RMSD-Werte für die Deformation der festgehaltenen Monomere. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin ( $T_2$ -Dimer) dar.

Wie aus Abbildung 9.8 ersichtlich werden die festgehaltenen Monomere der Insulinanaloga wesentlich stärker deformiert als das festgehaltene Monomer des Wildtyp-Insulins ( $T_2$ -Dimer). Da die Insulinanaloga jedoch als  $R_2$ - und  $TR$ -Dimer vorliegen, ist der Vergleich mit den festgehaltenen Monomeren der entsprechenden Wildtyp-Insulin-Konformere (Abbildung 9.3) von Interesse. Die Deformation der Monomere (s. Abb. 9.8) ist bei weitem geringer als bei den Monomeren der Wildtyp-Insulin-Konformere. So erreicht das festgehaltene Monomer des LysPro-Analogons eine maximale Auslenkung von ca. 1,2 nm und das des Aspart-Analogons sogar nur einen Wert von 0,9 nm. Dieser liegt zwar deutlich über dem maximalen RMSD-Wert von ca. 0,5 nm des  $T_2$ -Dimers, aber auch deutlich unter dem Maximalwert der  $R_2$ - und  $TR$ -Dimeren des Wildtyp-Insulins von ca. 1,5 nm.

Die Erhöhung der RMSD-Werte bei den LysPro- und Aspart-Analoga ist also eine Folge der Tatsache, dass sie wie in Kapitel 8.1 angegeben in der  $TR$ - bzw. in der  $R_2$ -

Konformation vorliegen.

### 9.2.3 Wechselwirkungen innerhalb der festgehaltenen Monomere

Die Wechselwirkungen innerhalb der festgehaltenen Monomere der Insulinanaloga sind vergleichbar mit den Wechselwirkungen innerhalb der Wildtyp-Insulin-Konformere, da sich die Mutationen nicht auf diesen Bereich der Molekülstruktur auswirken. Daher wird an dieser Stelle auf die erneute Beschreibung der Wechselwirkungen verzichtet.

### 9.2.4 H-Brücken zwischen den Monomeren der Insulinanaloga

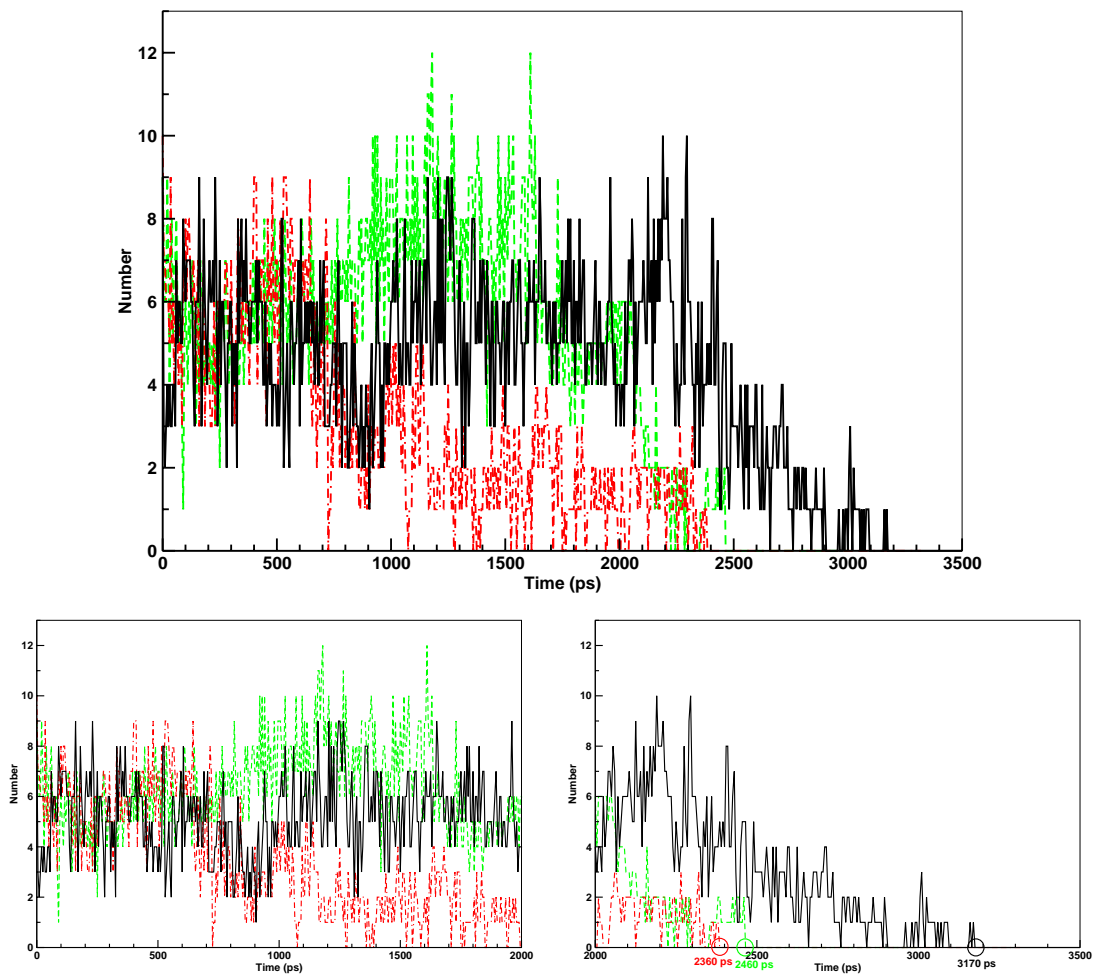
Ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Dissoziationszeit ist die Lebensdauer von H-Brücken zwischen den Monomeren. H-Brücken sind als gerichtete Bindungen stark geometrieabhängig und stabilisieren eine bestimmte Struktur. Daher wird davon ausgegangen, dass der Insulin-Komplex nach dem Verlust der H-Brücken schnell seine strukturelle Integrität verliert.

Bei der folgenden Bestimmung wurden die gleichen Kriterien für die Existenz der H-Brücken verwendet wie bereits in Kapitel 9.1.4.

Der Vergleich des LysPro-Analogons mit dem Wildtyp-Insulin (s. Abb. 9.9) zeigt, dass am Start der Simulation das weniger stabile LysPro mit 10 H-Brücken eine H-Brücke mehr zwischen den beiden Monomeren hat als der Wildtyp mit neun. Diese wird allerdings nach wenigen Pikosekunden der Simulation gebrochen. Nach ca. 500 ps werden weitere H-Brücken zerstört und dadurch das LysPro-Dimer so destabilisiert, dass es relativ schnell zerfällt, während sich beim Wildtyp einige H-Brücken erneut bilden können. Die letzte H-Brücke taucht bei dem LysPro-Analogon bei 2360 ps auf.

Anders verhält sich das Aspart-Analogon. Vergleicht man dieses mit dem Wildtyp-Insulin, so ist festzustellen, dass während 1000-1700 ps der Simulation bei dem Aspart-Analogon mit durchschnittlich acht H-Brücken im Schnitt sogar zwei H-Brücken mehr zwischen den Monomeren gebildet werden als beim Wildtyp-Insulin. Bei 1700 bis ca. 2000 ps fällt die Anzahl der H-Brücken wie zum Start der Simulation wieder auf durchschnittlich fünf zurück. Nach 2000 ps werden schließlich auch die restlichen H-Brücken gelöst; ab 2460 ps ist keine H-Brücke zwischen den Monomeren detektierbar.

Zum Zeitpunkt der Aspart-Dissoziation (2460 ps) können im Wildtyp-Insulin-Dimer noch durchschnittlich zwei H-Brücken gebildet werden. Aber auch diese Bindungen können

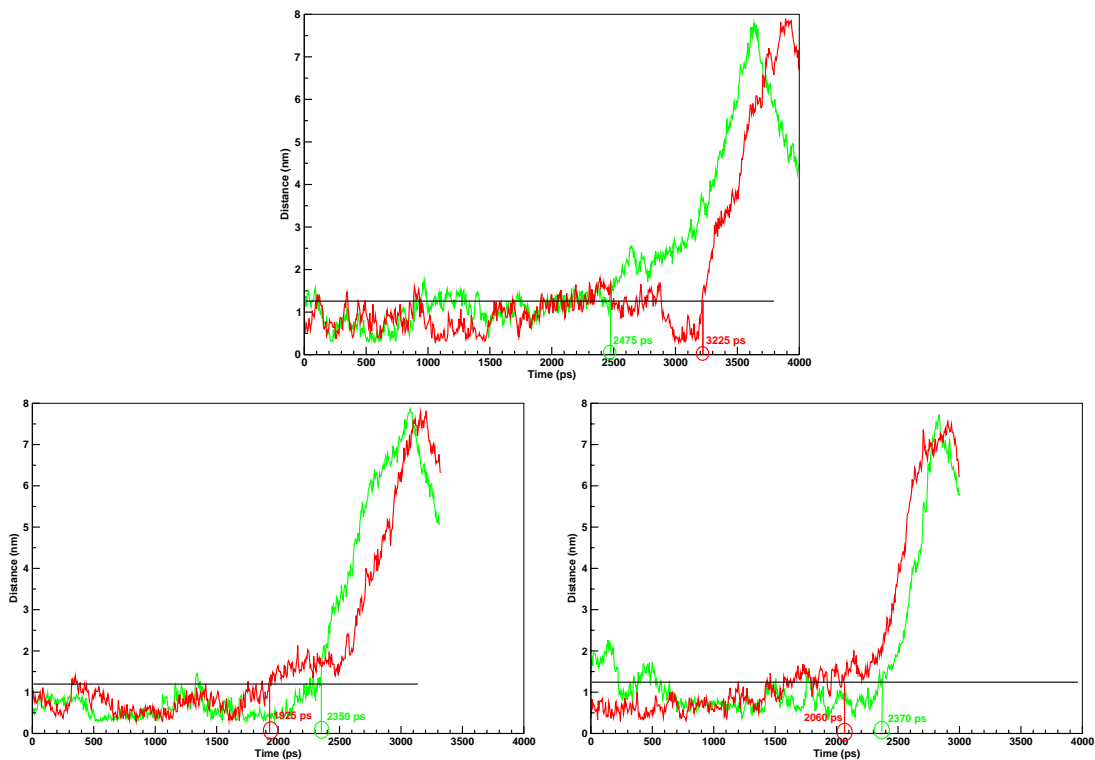


**Abbildung 9.9:** Anzahl der H-Brücken zwischen den Monomeren im Verlauf der Dynamiksimulation während 3500 ps. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin dar. Zur Verbesserung der Auflösung wurde der Dynamikverlauf in zwei Graphen aufgeteilt, von Beginn bis 2000 ps (Abb. links unten) und von 2000 ps bis 3500 ps (Abb. recht unten).

der Wasserströmung nur eine gewisse Zeit widerstehen und werden nach und nach gelöst, so dass nach 3170 ps auch beim Wildtyp-Insulin keine H-Brücke mehr zwischen den Monomeren bestehen kann.

### 9.2.5 Lebensdauer der Salzbrücke Lysin B28 - Glutamat B21 zwischen den Monomeren der Insulinanaloga

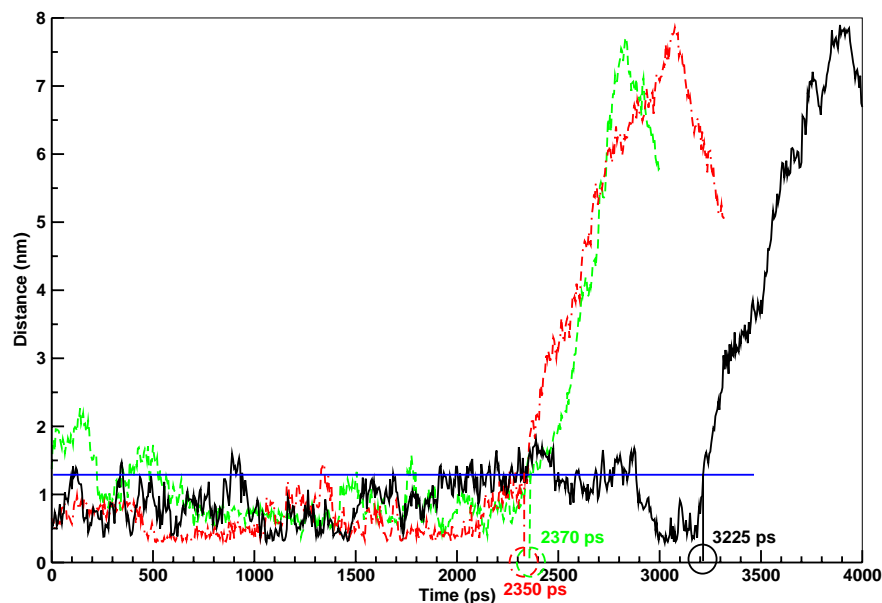
Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Dissoziationszeit ist die Vermessung der beiden Salzbrücken zwischen den Monomeren. Unvorteilhaft ist hierbei allerdings, dass Salzbrücken ungerichtete Wechselwirkungen darstellen und somit keine scharfen Abbruchkriterien für diese Bindungen definiert werden können. Für die Dissoziation einer Salzbrücke wurde ein Maximal-Wert von ca. 1,2 nm als Abstandskriterium gewählt. Bei dieser Entfernung sollten die Wechselwirkungen zwischen den geladenen Gruppen sehr gering sein, da die Coulombkraft mit  $\frac{1}{r^2}$  abnimmt.



**Abbildung 9.10:** Salzbrücken zwischen den Monomeren. In den beiden Kurven der drei gezeigten Graphen ist der Abstand der geladenen Gruppen einer Salzbrücke angegeben. Im oberen Graphen sind die Abstände der Salzbrücken im Wildtyp-Insulin dargestellt. Die unteren Graphen zeigen die Abstände der entsprechenden Salzbrücken in dem LysPro- (links) und dem Aspart-Analogon (rechts). Der schwarze Balken stellt das Abbruchkriterium für die Salzbrücke bei einem Abstand von 1,25 nm dar. Die rote Kurve zeigt die Salzbrücke zwischen Lysin B28 Monomer A und Glutamat B21 Monomer B, die grüne Kurve beschreibt die Salzbrücke Lysin B28 Monomer B und Glutamat B21 Monomer A.

Die Dissoziationskurven für die beiden Salzbrücken (s. Kapitel 7.4.2), die ein Dimer ausbildet, sind in Abbildung 9.10 dargestellt. Aus diesen Kurven resultieren als Dissoziationszeitpunkte für die jeweiligen Salzbrücken im Wildtyp-Insulin 2,48 ns bzw. 3,23 ns, im LysPro-Analogon 1,93 ns bzw. 2,35 ns und im Aspart-Analogon 2,06 ns bzw. 2,37 ns.

Entscheidend für die Dissoziation der Dimer-Komplexe ist natürlich diejenige Salzbrücke, die länger bestehen bleibt, d.h. für das Wildtyp-Insulin resultieren als Dissoziationszeit 3,23 ns, für das LysPro-Analogon 2,35 ns und für das Aspart-Analogon 2,37 ns. Aus diesem Grund sind in Abbildung 9.11 die Dissoziationskurven der jeweils beständigeren Salzbrücke der drei Insuline in einem Graphen dargestellt.



**Abbildung 9.11:** Vergleich der Dimeren-Dissoziation anhand der beständigeren Salzbrücke. Auch bei dem hier gezeigten Graphen ist die Einfärbung wie in den vorhergehenden Abbildungen gewählt. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin ( $T_2$ -Dimer) dar. Der blaue Balken beschreibt hier das Abbruchkriterium bei einem Abstand von 1,25 nm.

Vergleicht man die Kurven der drei Insuline in Abbildung 9.11, so sind bis etwa 2300 ps kaum Unterschiede zwischen den Kurven festzustellen. Einzig bei dem Aspart-Analogon hat die Salzbrücke in den ersten 500 ps einen höheren Abstand zwischen den Ladungsgruppen als bei den beiden anderen Insulinen. Das allerdings ist auf die verwendete Kristallstruktur zurückzuführen, bei der diese Salzbrücke zunächst nicht ausgebildet ist



und sich erst im Laufe der Simulation aufbauen muss. Nach 500 ps verhält sich diese Salzbrücke aber wie die der beiden anderen Insuline.

Die Verringerung des Abstands zwischen den geladenen Gruppen gegen Ende der Simulation wird durch ein Artefakt hervorgerufen und kann durch die Periodic Boundary Conditions (PBC) erklärt werden. Weil für die Berechnung der Entfernung der beiden Gruppen immer der Minimalabstand vorliegt, wird ab einer bestimmten Entfernung nicht mehr die Originalgruppe des festgehaltenen Monomers, sondern dessen durch die PBC entstandenes Spiegelbild zur Messung verwendet. Da sich das freie Monomer auf das Spiegelbild zubewegt, sinkt der Abstand.

Die Insulinanaloga können demnach trotz der veränderten Struktur auch die im Wildtyp vorhandenen Salzbrücken bilden.

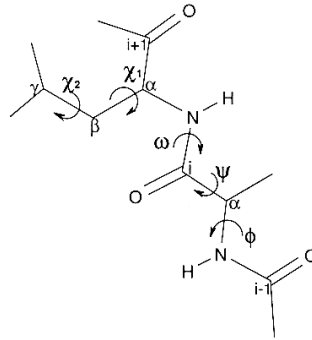
### 9.2.6 Dihedral Order Parameter (DOP) des Insulinproteinrückgrates

In den bisher gezeigten Analysen kann die schnellere Dissoziation der Analoga im Vergleich zum Wildtyp-Insulin zwar nachvollzogen werden, eine Begründung für das unterschiedliche Verhalten liefern sie jedoch nicht.

Vorteil der durchgeführten Simulationen gegenüber der Kristallografie ist jedoch, dass neben Abständen und Aufbau der Struktur auch deren Flexibilität untersucht werden kann. Hierfür wurden sogenannte Dihedral Order Parameter (DOP) bestimmt, welche wie in Kapitel 4.5 gezeigt die Beweglichkeit von Diederwinkeln und somit Veränderungen im dynamischen Verhalten eines Moleküls oder Molekülkomplexes dokumentieren können. Ein DOP-Wert von eins beschreibt einen starren Winkel, während der DOP von nahe Null für einen frei drehbaren Torsionswinkel steht.

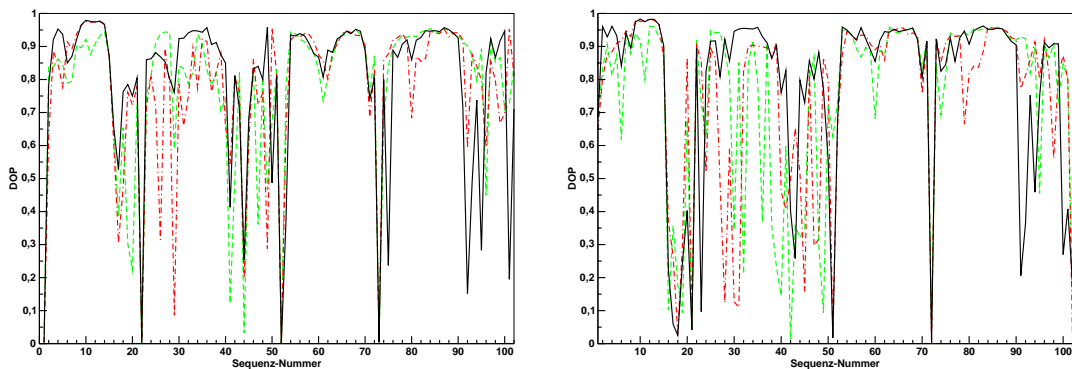
Entscheidend für die Beweglichkeit des Proteinrückgrates sind die Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$ . Um eine Orientierung über die topografische Bedeutung dieser Winkel zu geben, ist in Abbildung 9.12 ein Proteinfragment mit den jeweiligen Bezeichnungen der Diederwinkel dargestellt.

Wie in Abbildung 9.13 dargestellt kommt es im festgehaltenen Monomer (Sequenznummer 1-51) zu sehr starken Bewegungen im Proteinrückgrat, da dieses als Anker dienende Monomer nicht nur der Wasserströmung und den Rückhaltekräften ausgesetzt ist sondern auch den Zugkräften des freien Monomers. Diese starken Kräfte, die auf den festgehaltenen Teil des Komplexes einwirken, stellen somit den größten Nachteil dieser Methode dar, weil nämlich der festgehaltene Teil nur bedingt für die



**Abbildung 9.12:** Darstellung und Bezeichnung der Diederwinkel im Protein.

Auswertung der Bewegung zu verwenden ist.



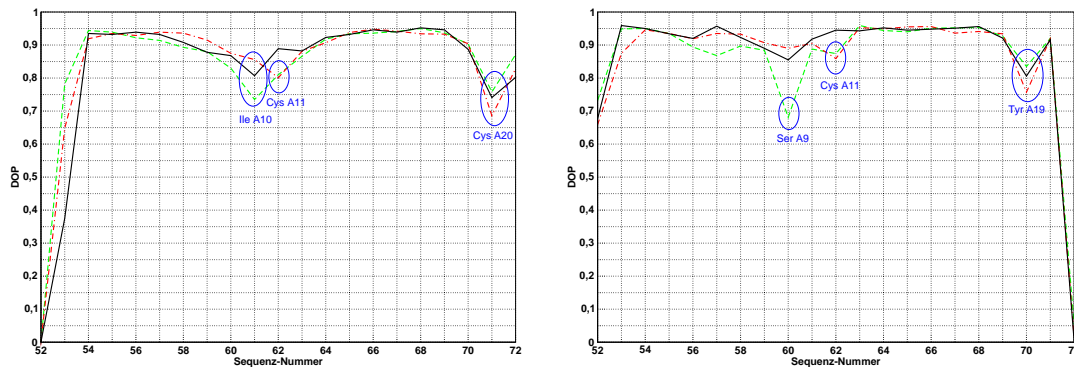
**Abbildung 9.13:** DOP des Insulin-Dimeren Proteinrückgrates. Im linken Graphen sind die DOP's des  $\phi$ - und im rechten die des  $\psi$ -Winkels dargestellt. Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin ( $T_2$ -Dimer) dar.

Im Gegensatz dazu wirken auf das freie Monomer nur die Wasserströmung und die Bindungen zwischen den Monomeren, so dass wegen der hier relativ geringen Krafteinwirkungen das freie Monomer für die Auswertung der Beweglichkeit zur Verfügung stand.

**DOP der A-Kette:** Wie in Abbildung 9.14 zu erkennen ist, sind die Einflüsse der Dissoziation auf die A-Kette der Insuline sehr gering.

Die leicht erhöhte Beweglichkeit des Cysteins A20 lässt sich eindeutig damit erklären, dass diese Aminosäure mit der B-Kette über Disulfidbrücken verbunden ist und dadurch indirekt durch die Dissoziationskräfte, die auf die B-Kette wirken, beeinflusst wird.

Der Einfluß auf das Cystein A11 bei den Insulinanaloga ist durch die Konformation



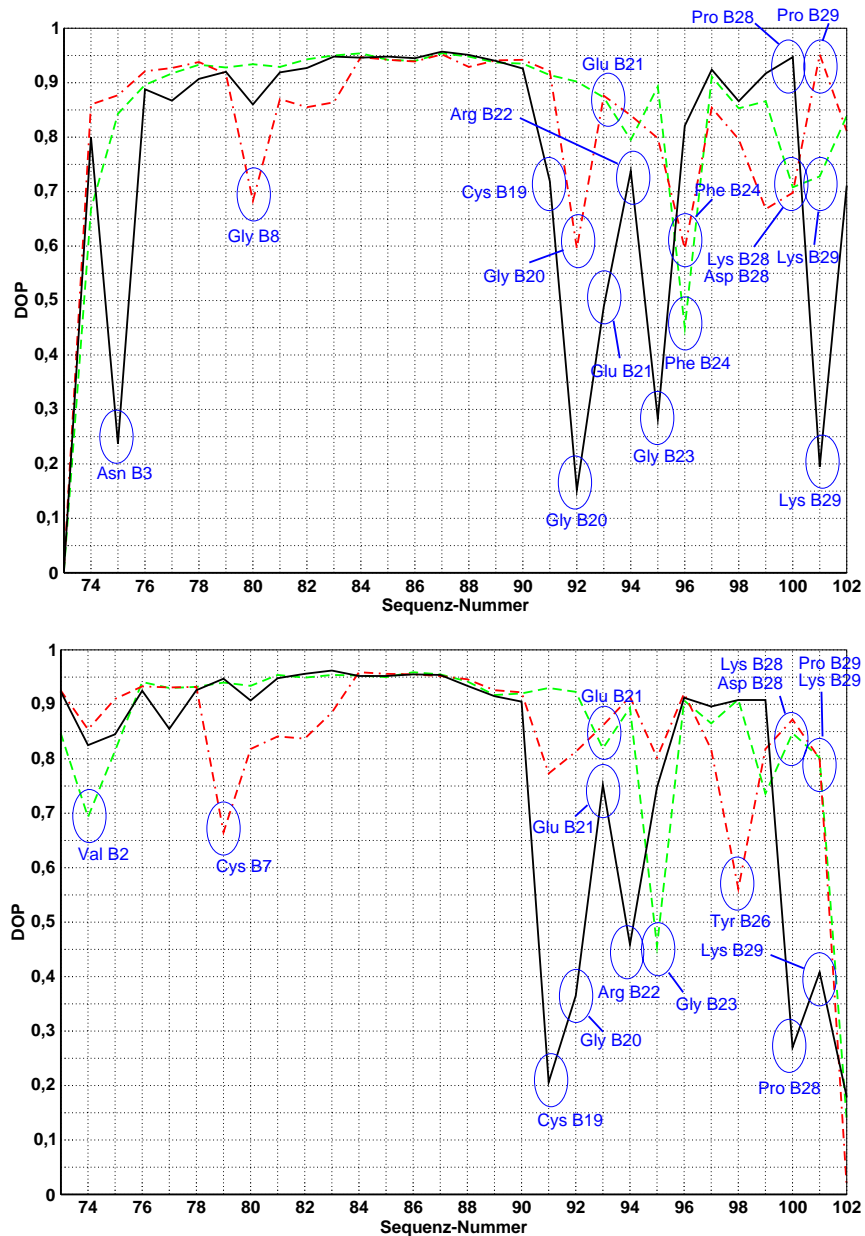
**Abbildung 9.14:** DOP des Proteinerückgrates der A-Kette (links  $\phi$ -, rechts  $\psi$ -Winkel). Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin ( $T_2$ Dimer) dar. Die blauen Markierungen heben Positionen von Aminosäuren hervor, die durch die Dissoziation beeinflusst werden.

der Kristallstrukturen zu erklären, da diese in der TR- bzw  $R_2$ -Konformation vorliegen und deshalb intramolekulare Wechselwirkungen vorhanden sind wie in Kapitel 9.1.3 erläutert. Ein weiterer Beweis für die Veränderung der Beweglichkeit durch die unterschiedlichen Konformationen des Monomers ist die starke Beeinflussung des  $\phi$ -Winkels im Isoleucin A10 des Aspart-Analogons. Da das Aspart-Analogon in der Kristallstruktur als  $R_6$ -Hexamer vorliegt, wird das Isoleucin A10 durch die verlängerte  $\alpha$ -Helix des Nachbar-Dimers beeinflusst (s. Abb. 9.5). Für die Simulation wurde nur ein Dimer dieser Struktur verwendet, in der diese Wechselwirkung wegen der entfernten Nachbar-Dimere nicht mehr vorhanden sein kann. So hat das Isoleucin den Wechselwirkungspartner verloren und muss sich auf diese veränderte Lage einstellen. Es ist somit davon auszugehen, dass der erniedrigte DOP des Isoleucin A10- $\phi$ -Winkels und des Serin A9- $\psi$ -Winkels auf den Wegfall von Kristall-Packungs-Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Gestützt wird diese Annahme durch den DOP des Cystein A20. Da es dort keinen strukturellen Unterschied zwischen den Konformeren gibt, sind in Abbildung 9.14 die DOP's sehr ähnlich. Der Wildtyp-DOP liegt sogar zwischen dem der beiden Analoga.

Aufgrund der geringen Unterschiede in den DOP's der verschiedenen Insuline ist davon auszugehen, dass die A-Kette durch die Dissoziation nicht oder nur kaum beeinflusst wird und somit auch keinen oder nur einen geringen Beitrag zur Bindung der Dimere liefert.

**DOP der B-Kette:** Das Verhalten des Proteinrückgrates der B-Kette während der Dissoziation ist wegen der direkten Beteiligung der Dimer-Bindung wesentlich komplexer. Dieses wird in Abbildung 9.15 gezeigt.



**Abbildung 9.15:** DOP des Proteinrückgrates der B-Kette (oben  $\phi$ , unten  $\psi$ -Winkel). Die grüne, gestrichelte Kurve stellt das Aspart-Insulin, die rote, unterbrochene Kurve das LysPro-Insulin und die schwarze, durchgezogene Kurve das Wildtyp-Insulin ( $T_2$ -Dimer) dar. Die blauen Markierungen heben Positionen von Aminosäuren hervor, die durch die Dissoziation beeinflusst werden.

Die im N-terminalen Sequenz-Bereich der B-Kette zu beobachtenden Unterschiede der DOP's, wie z. B. für das Asparagin B3 des Wildtyps und das Glycin B8 des LysPro-Analogons in den  $\phi$ -Winkeln oder für das Valin B2 des Aspart-Analogons sowie für den Sequenzabschnitt von Cystein B7 bis zum Serin B9 des LysPro-Analogons in den  $\psi$ -Winkeln lassen sich wieder über die unterschiedlichen Konformationen der Ausgangsstrukturen erklären und haben nichts mit der Dissoziation der Dimere zu tun.

**Tabelle 9.1:** DOP-Werte wichtiger Aminosäuren der B-Kette

Positionsnummer	Wildtyp-Insulin			Aspart-Mutante			LysPro-Mutante		
	Aminosäure	Diederwinkel		Aminosäure	Diederwinkel		Aminosäure	Diederwinkel	
		$\phi$	$\psi$		$\phi$	$\psi$		$\phi$	$\psi$
B2	Val	0,800	0,825	Val	0,668	0,693	Val	0,860	0,854
B3	Asn	0,237	0,845	Asn	0,843	0,815	Asn	0,877	0,910
B7	Cys	0,920	0,947	Cys	0,928	0,940	Cys	0,916	0,665
B8	Gly	0,860	0,907	Gly	0,934	0,934	Gly	0,683	0,818
B19	Cys	0,719	0,206	Cys	0,914	0,930	Cys	0,921	0,773
B20	Gly	0,152	0,365	Gly	0,902	0,923	Gly	0,596	0,813
B21	Glu	0,489	0,752	Glu	0,873	0,819	Glu	0,876	0,861
B23	Gly	0,283	0,748	Gly	0,893	0,455	Gly	0,798	0,802
B24	Phe	0,821	0,912	Phe	0,450	0,907	Phe	0,595	0,926
B26	Tyr	0,866	0,908	Tyr	0,911	0,865	Tyr	0,796	0,561
B27	Thr	0,917	0,908	Thr	0,866	0,736	Thr	0,668	0,818
B28	Pro	0,947	0,270	Asp	0,708	0,847	Lys	0,698	0,872
B29	Lys	0,195	0,408	Lys	0,728	0,802	Pro	0,952	0,800

Entscheidend für die Dissoziation des Dimers sind allerdings die Veränderungen im C-terminalen Sequenzbereich der B-Kette. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass die Positionen B28 bzw. B29 bei beiden Analoga wesentlich in der Beweglichkeit eingeschränkt sind, während beim Wildtyp-Insulin sich diese Aminosäuren sowohl um den  $\phi$ - als auch  $\psi$ -Winkel fast uneingeschränkt bewegen können.

Das Prolin des Wildtyp-Insulins zeigt in Position B28 den erwarteten hohen DOP im Falle des  $\phi$ -Winkels, was allerdings durch einen überraschend niedrigen DOP-Wert im  $\psi$ -Winkel kompensiert wird. Im Gegensatz dazu haben die Aminosäuren an Position B28 der Analoga in beiden Winkeln unerwartet niedrige DOP-Werte. Und das, obwohl diese Position bei dem Aspart-Analogon durch ein Aspartat und bei dem LysPro-Analogon durch ein Lysin ersetzt wurde. Beide Aminosäuren verfügen nicht über die Rigidität des Prolins.

Noch extremer verhält sich die Position B29. Im Wildtyp-Insulin ist das Lysin an dieser Stelle mit DOP-Werten von 0,195 für den  $\phi$ - bzw. 0,408 für den  $\psi$ -Winkel nahezu frei drehbar, während bei den Analoga wie in Tabelle 9.1 ersichtlich kein DOP unter 0,7 erreicht wird.

Umgekehrt verhalten sich die Werte im Bereich des Glycin B23 bis zum Tyrosin B26. Diese Positionen sind in den Insulinanaloga beweglicher als im Wildtyp-Insulin-Dimer. Vor allem sind in dieser Hinsicht die Aminosäuren Phenylalanin B24 und Threonin B27 bei den  $\phi$ -Winkeln sowie Glycin B23 und Tyrosin B26 bei den  $\psi$ -Winkeln zu erwähnen. Diese Aminosäuren bilden als Kontaktbereich zwischen den Monomeren ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt und stabilisieren durch die zwischen den Strängen gebildeten Wasserstoffbrücken den Dimerkomplex.

Zusammenfassend ist somit zu postulieren, dass sich die Beweglichkeiten des Proteinrückgrates in der Monomer-Monomer bindenden Domäne von B19 -B29 in den Analoga im Vergleich zum Wildtyp-Insulin umkehren.

### 9.2.7 Seitenkettenbeweglichkeit der Salzbrücken bildenden Aminosäuren

Im Folgenden werden exklusiv die Beweglichkeiten der Aminosäure-Seitenketten dokumentiert, die für Bindungen zwischen den Monomeren eines Dimers von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich ausschließlich um die Seitenketten von Aminosäuren, die Salzbrücken zwischen den Monomeren bilden. Zumindest in der Ausgangsstruktur werden H-Brücken nur zwischen dem Proteinrückgrat der beiden Monomere gebildet.

**Tabelle 9.2:** DOP der Seitenketten der Salzbrücken bildenden Aminosäuren.

	Amino-Säure	Position	DOP-Werte			
			$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$
<b>Aspart-Mutante</b>	Glu	B21	0,542	0,647	0,647	—
	Lys	B29	0,116	0,647	0,647	0,647
<b>Lyspro-Mutante</b>	Glu	B21	0,124	0,611	0,611	—
	Lys	B28	0,404	0,611	0,611	0,611
<b>Wildtyp-Insulin</b>	Glu	B21	0,332	0,528	0,528	—
	Lys	B29	0,528	0,528	0,528	0,528

Bei der Auswertung der Daten von Tabelle 9.2 ist besonders auffällig, dass die  $\chi_1$ -Winkel der Seitenketten bei den Analoga deutlich niedriger liegen als im Wildtyp-Insulin.

Einzige Ausnahme ist die Seitenkette des Glutamat B 21 der Aspart-Mutante. Hier ist der DOP des  $\chi_1$ -Winkels mit 0,542 relativ hoch, was jedoch durch den mit 0,116 extrem niedrigen DOP des  $\chi_1$ -Winkels des Lysin B28 kompensiert wird. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Seitenketten der Aminosäuren in den Analoga im Gegensatz zu Wildtyp-Insulin stärker bewegen müssen, um die Salzbrücke aufrecht zu erhalten.

### 9.2.8 RMSD-Werte der freien Monomere nach der Relaxationssimulation

Ziel der Relaxationssimulation ist es, zu überprüfen, ob nach der Dissoziation der Dime-re die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Monomere noch erhalten sind. Hierfür wurde die Struktur der freibeweglichen Monomere nach der Dissoziation und nach einer weiteren 2 ns langen Simulation mit der jeweiligen Ausgangsstruktur (Kristallstruktur) des Monomers verglichen.

Da für den Erhalt der Sekundär- sowie der Tertiärstrukturen und damit der Wirkstruktur hauptsächlich das Proteinrückgrat verantwortlich ist, wurde der RMSD-Wert nur über diese Atome ermittelt.

**Tabelle 9.3:** RMSD-Werte der freien Monomere

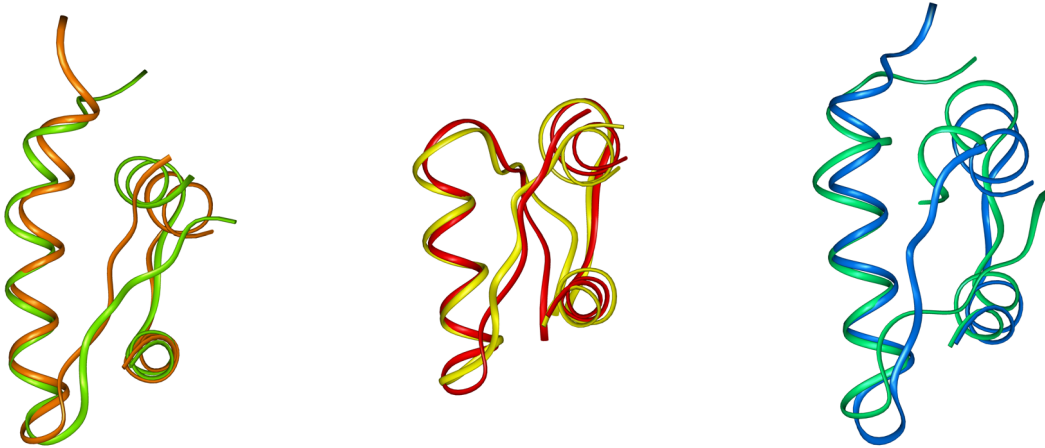
	RMSD-Werte	
	Proteinrückgrat	Schweratome
<b>Aspart-Mutante</b>	0,275	0,391
<b>LysPro-Mutante</b>	0,385	0,518
<b>Wildtyp-Insulin</b>	0,189	0,239

Wie aus Tabelle 9.3 zu entnehmen ist, liegen die RMSD-Werte der Analoga deutlich höher als beim Wildtyp-Insulin. Diese durch die erhöhten RMSD-Werte dokumentierte Deformation der Insulinstrukturen reicht aber nicht aus, die Sekundärstrukturen wie in Abbildung 9.16 gezeigt zu zerstören. Untermuert wird dieses Ergebnis, wenn die RMSD-Werte der einzelnen in Tabelle 9.4 dargestellten Protein-Ketten separat berechnet werden.

Durch die Überlagerung ausschließlich im Bereich einzelner Strukturelemente wird deutlich, dass die einzelnen Elemente nur wenig beeinflusst wurden, durch die Dissoziation sich aber die Lage zueinander geändert hat. Um dieses Ergebnis besser zu verdeutlichen, werden in Abbildung 9.16 die Überlagerungen der Endstrukturen mit den Kristallstrukturen dargestellt.

**Tabelle 9.4:** RMSD-Werte der einzelnen Ketten eines freien Monomers

	RMSD-Werte	
	A-Kette	B-Kette
<b>Aspart-Mutante</b>	0,262	0,233
<b>LysPro-Mutante</b>	0,224	0,275
<b>Wildtyp-Insulin</b>	0,094	0,156



**Abbildung 9.16:** Überlagerung der freien Monomere mit den jeweiligen Ausgangsstrukturen. Links ist das freie Monomer des Aspart-Analogon (grün), in der Mitte das freie Monomer des Wildtyp-Insulins (gelb) und rechts das freie Monomer des LysPro-Analogon (cyan) mit dem jeweiligen Monomer der Kristallstruktur (von rechts nach links: blau, rot, orange) überlagert.

Außerdem ist in Abbildung 9.16 zu erkennen, dass große Teile der Moleküle praktisch unverändert sind und fast ausschließlich die Molekülregionen, die für die Dimerbildung verantwortlich sind, größeren strukturellen Veränderungen unterworfen waren.

Weiterhin ist in der B-Kette der beiden Analoga ein Öffnen der Struktur im N-terminalen Bereich (B1-B9) der  $\alpha$ -Helix zu erkennen, was einem Übergang von der R- in die R<sup>f</sup>-Konformation entspricht.

Zusammengefasst zeigt die Auswertung der Simulationen, dass man den beschleunigten Zerfall der Insulinanaloga nicht nur an der durch die Mutation geänderten Salzbrücke definieren darf. Vielmehr wird durch die Mutation das Verhalten des Proteinrückgrates im gesamten Bereich der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen beeinflusst.



# Kapitel 10

## Diskussion und weitere Entwicklungen

Bei der Weiterentwicklung der Insulin-Substitutionstherapie haben gentechnologisch gewonnene Insulinanaloga grosses Interesse gefunden. Neben dieser pharmazeutischen Anwendung sind die Zn-Hexamere-Komplexe des Insulins ein wichtiges Modellsystem für das Verhalten von Metalloproteinen. Daher ist die Aufklärung des Dissoziationsmechanismus dieser Insuline in mehrerer Hinsicht von grossem Interesse.

Mit den bisherigen experimentellen Methoden ist es jedoch noch nicht gelungen, den Mechanismus der Dissoziation eines Protein-Komplexes aufzuklären. Daher stellen theoretische Modelle einen wichtigen Beitrag zur Erweiterung der vorhandenen Kenntnisse dar.

Natürlich kann ein theoretisches Modell nicht den exakten, realistischen Ablauf der Dissoziation eines der hier gezeigten Insuline darstellen, da für die Berechnung solcher grossen Systeme viele Näherungen gemacht werden müssen. Aber durch diese Modelle können wichtige, charakteristische Eigenschaften wiedergegeben werden, die als Erklärung experimenteller Daten dienen können.

Durch die hier vorgestellten Simulationen konnte eine Möglichkeit zur Klärung der beschleunigten Dissoziation zweier Insulinanaloga gefunden werden. Die Richtigkeit dieser Aussagen ist allerdings nur an wenigen vorhandenen Kristallstrukturen überprüfbar. Für eine genauere Bestätigung der ermittelten Daten müssten Methoden zur strukturellen Analyse von Proteinen zur Verfügung stehen, die die dynamischen Eigenschaften dieser Moleküle während der gesamten Dauer der Dissoziation darstellen können.

## 10.1 Dissoziation der Wildtyp-Insulin-Konformere

Leider konnte mit den Simulationen der Insulin-Dimere nicht die höhere Stabilität der  $R_6$ - und  $T_3R_3$ - Hexamere wiedergegeben werden, da die Raumstrukturen eines Großteils der Moleküle bei der Simulation der Dissoziation zerstört wurden.

Hier muß die Frage gestellt werden, warum gerade die vermeintlich stabileren Moleküle die größten Deformationen unter den Simulationsbedingungen erfahren haben. Zur Beantwortung dieser Fragestellung müssen der Mechanismus der Konformationsänderung und die daraus resultierenden Änderungen der intramolekularen Wechselwirkungen genauer betrachtet und mit den aus den Simulationen erhaltenen Daten kombiniert werden.

In Kapitel 7.4.3 wurde festgestellt, dass für die Transformation des  $R_6$ -Komplexes in den  $T_6$ -Komplex das Chelatzentrum total umorganisiert werden muss. Hierfür müssen sich die Dimere eines Hexamers gegeneinander verschieben können, da es anderenfalls zu starken Spannungen innerhalb des neugebildeten Komplexes kommen würde.

Daraus resultiert, dass die Monomere in der Lage sein müssen, sich flexibel der neuen Situation anzupassen. Denn würde ein Monomer sich nicht auf die veränderte Lage am Chelatzentrum einstellen, könnten die Monomer-Monomer-Wechselwirkungen eines Dimers in Mitleidenschaft gezogen werden und somit zur Destabilisierung des gesamten Komplexes führen.

In den Simulationen konnte gezeigt werden, dass durch die Transformation von der R- in die T-Konformation einige Wechselwirkungen innerhalb der Monomere aufgegeben werden und dadurch tatsächlich ein flexibleres Monomer entsteht. Zur gleichen Zeit aber werden die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren nicht oder nur kaum beeinflusst.

Aus diesen Ergebnissen könnte man für den Mechanismus der Konformationsänderung postulieren, dass zuerst die Monomere flexibilisiert werden. Dann bildet sich das neue Chelatzentrum aus und durch die generierten Wechselwirkungen zwischen den drei Monomeren des neuen Chelatkomplexes (s. Abb. 9.5) stabilisieren sich die Monomere wieder und festigen den Komplex.

Auf die Monomer-Monomer-Wechselwirkungen eines Dimers hat die Änderung des Aufbaus der beiden Chelatkomplexe eines Hexamers nur geringfügige Auswirkungen, so dass der Zusammenhalt der beiden Chelatzentren über diese Wechselwirkungen auch während der Konformationsänderung gesichert wird.

Der schnellere Zerfall der  $R_2$ - und TR-Dimere in den Simulationen ist ausschließlich auf die Destabilisierung aufgrund der Änderung der Struktur innerhalb des Monomers zurückzuführen, nicht jedoch auf die Veränderung von Monomer-Monomer-Wechselwirkungen untereinander. Dies könnte ein wichtiger Hinweis für die Erklärung des Mechanismus einer Konformationsänderung der Insulin-Hexamere sein.

Außerdem liefern diese Ergebnisse eine logische Erklärung dafür, dass für das Pro-Insulin nur Hexamere mit der  $T_3R_3$ -Struktur gefunden werden. Bei diesen Strukturen kann durch die noch vorhandene Verbindung zwischen den Protein-Ketten A und B keine ausreichende Flexibilität der einzelnen Monomere erzeugt werden. Deshalb erfolgt nach der Bildung des ersten  $R_3$ -Trimers wegen der inneren Spannung des Komplexes keine weitere Konformationsänderung, ohne eine Destabilisierung der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen der drei Dimere eines Hexamer auszulösen.

Es stellt sich jetzt die Frage, ob Veränderungen wie Mutationen im Bereich der Aminosäuren 1-9 der B-Kette neben einer Stärkung der Wechselwirkungen zwischen den Monomeren eines Chelat-Trimers darüber hinaus auch zu einer weiteren Stabilisierung des  $R_6$ -Hexamers beitragen würden. Das wäre unter Umständen eine Möglichkeit, die  $R_6$ -Hexamerkomplexe weiter zu stabilisieren und dadurch noch langsamer zerfallende Komplexe als die Wildtyp- $R_6$ -Hexamere zu entwickeln.

Zur genaueren Klärung der Konformationsänderung wäre es allerdings auch erforderlich, den gesamten Hexamer-Komplex unterschiedlicher Insulin-Konformere und den Übergang in die unterschiedlichen Konformere zu simulieren. Leider sind diese Komplexe zu groß, um sie mit den zur Zeit zur Verfügung stehenden Mitteln ausreichend lange simulieren zu können.

## 10.2 Dissoziation der Insulinanaloga

Bei den Simulationen der Insulinanaloga wurde im Gegensatz zu den Wildtyp-Konformeren das erwartete Ergebnis erhalten. Beide Analogas dissoziieren deutlich früher als das zum Vergleich verwendete  $T_2$ -Dimer des Wildtyp-Insulins.

Die fast identische Zerfallszeit der beiden Analogas überraschte zunächst, denn man ging vor den Simulationen von zwei unterschiedlichen Einflüssen auf die Dissoziation der Analogas aus.

Bei dem Aspart-Analogen wurde vermutet, dass durch den Austausch des Prolins B28

gegen ein Aspartat und damit durch das Einführen einer weiteren negativen Ladung diese eine entscheidende Rolle spielen würde. Man nahm an, dass die zusätzliche negative Ladung des Aspartats mit der positiven Ladung des Lysins B29 wechselwirkt und dadurch das Lysin weniger mit der Carboxylgruppe des Glutamats B21 des zweiten Monomers interagiert. Dieses hätte eine Schwächung der Monomer-Monomer-Interaktion und damit eine schnellere Dissoziation des Dimers zur Folge.

Bei dem LysPro-Analogen wurde durch den Tausch der Position des Prolins mit der des Lysins darauf gesetzt, dass durch den daraus folgenden scheinbar größeren Abstand zwischen dem jetzt an Position B28 liegenden Lysin und dem Glutamat B21 des zweiten Monomers die Salzbrücke nicht mehr zustande kommt.

Derartige Annahmen konnten mit den vorliegenden Simulationen nicht bestätigt werden. Zwar hatten die Ausgangskristallstrukturen größere Abstände zwischen den geladenen Gruppen des Lysins und des Glutamats; diese konnten sich im Verlauf der Simulation aber auf das nahezu gleiche Maß wie beim Wildtyp-Insulin verringern. Bei den Salzbrücken ist, wie in Kapitel 9.2.5 gezeigt wird, kaum ein Unterschied zwischen denen des Wildtyp-Insulins und der Insulinanaloge festzustellen.

Deutliche Unterschiede treten allerdings bei den H-Brücken auf, die bei den Insulinanaloge zwischen den Monomeren gebildet werden können. Hier fluktuiert die Zahl der H-Brücken zwischen den Monomeren sehr stark, während beim Wildtyp-Insulin die Anzahl der H-Brücken über lange Zeit sehr konstant bleibt. Das lässt den Schluss zu, dass die H-Brücken zwischen den Monomeren der Insulinanaloge in ihrer Stabilität gestört sind.

Ein Grund für die unterschiedliche Stabilität der H-Brücken könnte die unterschiedliche Beweglichkeit des Proteinrückgrates sein. Beim Vergleich der Beweglichkeit des Proteinrückgrates im Bereich der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen (von B19 bis B29) stellt man fest, dass sich die Insulinanaloge fast genau entgegengesetzt zum Wildtyp-Insulin verhalten. So ist das Wildtyp-Insulin in den Bereichen von B19 bis B22 und B28 bis B29 wesentlich beweglicher als die Insulinanaloge, während diese im Bereich B23 bis B27 die wesentlich größere Beweglichkeit zeigen.

Die unterschiedliche Beweglichkeit lässt sich über die Mutationen in den Insulinanaloge erklären. Das Prolin B28 wurde entfernt bzw. verschoben, wodurch das  $\beta$ -Faltblatt in diesem Bereich wie in Kapitel 7.4.2 beschrieben nicht mehr durch das Prolin unterbrochen wird. Das hat zur Folge, dass das Lysin, das zur Bildung der Salzbrücke dient, mit in dieses Faltblatt einbezogen und dadurch dessen Beweglichkeit eingeschränkt wird.

Da aber Salzbrücken hauptsächlich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen zwei entgegengesetzt geladenen Polen erzeugen, ist es für diese Bindungen von Nachteil, wenn die an Salzbrücken beteiligten Aminosäuren in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden, da dann unter Umständen der Abstand zwischen den geladenen Gruppen zu groß ist und die Salzbrücke zerstört wird.

Die Einschränkung des Proteinrückgrates macht sich auch bei den Seitenketten der an der Salzbrücke beteiligten Aminosäuren bemerkbar. Denn bei den Analoga bewegen sich die Seitenketten der Aminosäuren stärker als beim Wildtyp-Insulin. Das ist jedoch nur ein unzureichender Ausgleich für die eingeschränkte Beweglichkeit des Proteinrückgrates dieser Aminosäuren, da durch die Drehung um die  $\chi$ -Winkel nur noch wenige Raumsektoren durch die Seitenketten erreicht werden können.

Zusätzlich bewirkt die Einbeziehung des Lysins in das Faltblatt, dass sich das Proteinrückgrat der H-Brücken bildenden Aminosäuren stärker bewegt. Dieses wiederum hat für die H-Brücken dramatische Folgen: Da die Bindungen in hohem Maß von der Geometrie abhängig sind, lösen schon kleinere Bewegungen einen Verlust der H-Brücke aus.

Eine erhöhte Beweglichkeit im Bereich der Salzbrücken bildenden Aminosäuren wirkt sich positiv auf die Stabilität der Dimere aus, während sie bei den H-Brücken bildenden Aminosäuren zum schnelleren Zerfall der Dimere führt.

Durch die Schwächung der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen innerhalb eines Dimers werden die festgehaltenen Monomere der Analoga weit weniger deformiert als dieses bei den Wildtyp-Konformeren der Fall ist. Das geschieht, obwohl die Ausgangsstrukturen des Aspart-Analogons als  $R_2$ -Dimer und die des LysPro-Analogons als TR-Dimer vorliegen. Die geringere Deformation der Analoga-Monomere ist nicht auf eine Stärkung der Wechselwirkungen innerhalb eines Monomers zurückzuführen, sondern auf die Schwächung der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen und dem daraus resultierenden schwächeren Zugeffekt des freien Monomers. Denn das freie Monomer wirkt als Treibanker auf das festgehaltene Monomer. Durch die Schwächung der Monomer-Monomer-Wechselwirkungen werden diese Effekte allerdings auch schwächer auf das festgehaltene Monomer übertragen und somit kommt eine schwächere Deformation der Analoga in der  $R_2$ - bzw. TR-Konformation zustande.

Derartige Ergebnisse liefern einen Hinweis dafür, dass die Umwandlung der Analoga in der R-Konformation nicht so stabilisierend wirkt wie beim Wildtyp-Insulin, und dass eine Dissoziation der Analoga schon in den unterschiedlichen R-Konformationen möglich

sein muss. Die geringere Stabilisierung der R-Konformere wird dadurch belegt, dass bei dem LysPro-Analogen nur  $T_3R_3$ -Konformere bekannt sind und  $R_6$ -Konformere bei diesem Analogen nicht gebildet werden können.

Auch bei den nicht festgehaltenen Monomeren wurden wie in Kapitel 9.2.8 gezeigt die Veränderungen in der Struktur untersucht. Damit sollte hauptsächlich gezeigt werden, dass nach der Dissoziation die Struktur des Monomers noch erhalten und in der Lage ist, die Hormonwirkung zu entfalten. Während der Dissoziation kommt es bei den Analoga zu stärkeren Veränderungen als beim Wildtyp-Insulin. Diese Veränderungen sind allerdings nicht gravierend und sollten auf das Vorliegen der R-Konformation bei den Analoga zurückzuführen sein. Da, wie in Abbildung 9.16 zu erkennen ist, noch alle Sekundärstrukturen der Analoga vorhanden sind, sollten die Veränderungen reversibel sein. Es konnte gezeigt werden, dass auch nach der Simulationszeit von annähernd 6 ns und der Belastung durch die Wasserströmung die Monomere noch in ihrer nativen Struktur und damit in der angenommenen Wirkstruktur vorliegen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: Die Simulationen haben gezeigt, dass durch die Zerstörung der Salzbrücken zwischen den Monomeren eines Dimers keine Beschleunigung der Dissoziation erreicht wird. Vielmehr wird durch die unterschiedlichen Mutationen der Insulinanaloga das Verhalten der Moleküle innerhalb des Komplexes entscheidend beeinflusst und dadurch das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Bindungskomponenten gestört.

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wäre es hilfreich, wenn weitere Analoga in diesem System berechnet werden könnten.

Bei den Analoga sollten ebenfalls Berechnungen mit den Hexamerkomplexen erfolgen. Für die Berechnung dieser wesentlich komplexeren Hexamerstrukturen würden sich jedoch deutlich längere Simulationszeiten und damit ein erheblich größerer rechnerischer Aufwand ergeben.

### 10.3 Allgemeine Fehlerdiskussion

In diesem Abschnitt werden die durch die unter Simulationsbedingungen enthaltenen Nahrungen hervorgerufenen Fehler diskutiert.

Die ersten Fehler ergeben sich bei den als Startmolekülen verwendeten Ausgangsstrukturen. Deren Präzision ist entscheidend von der Auflösung der Struktur abhängig.

In den hier zur Verfügung stehenden Strukturen liegt die Auflösung zwischen 1,9 und 2,8 Å; damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es zu Fehlinterpretationen der spektroskopischen Daten kommt. So können Lage und Ausrichtung der Aminosäuren drastisch von der wirklichen Struktur abweichen. Außerdem wurden verschiedene spektroskopische Methoden zur Erfassung der Strukturen verwendet und somit auch unter Umständen unterschiedliche Interpretationsfehler bei deren Messung begangen. Diese Interpretationsfehler können sich natürlich unterschiedlich auf die Simulation auswirken.

Daneben ist ebenfalls zu bedenken, dass die verwendeten Strukturen nur Teile eines Komplexes darstellen und somit Wechselwirkungen verloren gehen können, die Einfluss auf die Struktur nehmen. Ebenso sind in einem Kristall in der Regel viele Strukturen regelmäßig angeordnet, wodurch sogenannte Packungskräfte auf die einzelnen Substrukturen ausgeübt werden, die ebenfalls Auswirkungen auf die Geometrie oder Koordinaten haben.

Eine weitere wichtige „Fehlerquelle“ stellt die Simulation selbst dar. Hierbei ist festzuhalten, dass für alle Rechnungen die Kraftfeldtheorie, ein mechanisches Modell zur Simulation von Molekülen, verwendet wurde. Dieser molekülmechanische Ansatz beinhaltet durch viele Standardisierungen der dort eingesetzten Methoden Fehler. Leider ist es zur Zeit nicht möglich, Moleküle dieser Größe und über die in den Simulationen betrachteten Zeitspannen mit genaueren Methoden zu berechnen.

Dazu kommen noch die Fehler, die durch den Ablauf der Simulation selbst hervorgerufen werden. Es ist zu beachten, dass die Dissoziation der Dimere in natürlicher Umgebung nicht so abläuft, wie sie in der Simulation dargestellt wurde. Da die Dissoziation sogar von den schnell wirkenden Insulinanaloga mindestens mehrere Minuten dauert, mußte dieser Ablauf gerafft werden, um die Dissoziation in dem nur mehrere Nanosekunden großen Zeitfenster darstellen zu können. Wie in der Durchführung gezeigt mussten hierfür einige Umgebungsbedingungen stark vereinfacht werden. So sind Rückhaltekräfte und Strömungen bei der natürlichen Dissoziation nicht so vorhanden, wie dies in den vorgestellten Simulationen der Fall ist.

Die Idee für diese Simulation beruht aber auf Erfahrungsberichten, bei denen gezeigt wird, dass durch Massage der Insulin-Injektionsstelle der Wirkungseintritt drastisch beschleunigt werden kann [38]. Derartige Massagen unterstützen den Fluss von extrazellulärer Flüssigkeit und beschleunigen dadurch die Dissoziation des injizierten Insulins. Das wurde in den Simulationen durch die Wasserströmung nachempfunden.

Bei den Rückhaltekräften ist zu bedenken, dass diese in ihrer Stärke sehr artifiziell sind.

Aber auch diese Kräfte können zumindest im Ansatz beim natürlichen Dissoziationsverlauf, wenn auch nicht so stark, beobachtet werden. Beispielsweise stellen andere in der Lösung vorliegende Proteine Hindernisse dar, an denen Teile eines Moleküls gebunden werden könnten und dadurch zurückgehalten würden. Des Weiteren sind Strömungen von Flüssigkeiten im Körper nicht wie in der Simulation laminar, sondern werden durch Hindernisse und mitgerissene Partikel turbulent. Durch diese Wirbel werden auf den Insulinkomplex mit Sicherheit ebenfalls starke Scherkräfte ausgeübt, die unterschiedliche Teile des Komplexes in verschiedene Richtungen beschleunigen. So können auch die hier verwendeten Rückhaltekräfte durch natürliche Bedingungen gerechtfertigt werden. Daraus folgt: Auch wenn alle Komponenten von natürlichen Gegebenheiten abgeleitet wurden, kann durch die Simulationen kein exaktes Bild einer Dissoziation dargestellt werden. Vielmehr können durch die idealisierten Bedingungen nur eingeschränkte Aussagen über die Dissoziation erhalten werden. So lassen sich durch die Simulation keine physikalischen Werte wie Dissoziationskonstanten ermitteln. Die gefundenen Zerfallszeiten sind nur als relative Größe zu betrachten, um mit diesen auf unterschiedliche Verhaltensweisen eingehen zu können. Jedoch können im Vergleich der Strukturen über den Simulationen Unterschiede im Mechanismus der Dissoziation ermittelt werden, die die unterschiedlichen Geschwindigkeiten derselben erklären könnten.



## **Teil III**

# **Homologiemodell der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase**



# Kapitel 11

## Einleitung

Die Behandlung von Mykosen, insbesondere systemischer Mykosen, stellt heute trotz des großen medizinischen Fortschritts vielfach noch ein großes Problem dar. Ein Grund dafür liegt in der ausgesprochen schnellen Anpassungsfähigkeit der Pilze an veränderte Umgebungsbedingungen.

Zur Behandlung von Mykosen wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Arzneistoffen eingesetzt, die sich sowohl im Wirkmechanismus als auch in ihren Wirkspektren gegenüber verschiedenen Pilzarten unterscheiden. Zu den am häufigsten eingesetzten Breitband-Antimykotika gehören die Arzneistoffe vom Azoltyp. Die antimykotische Wirkung dieser Gruppe beruht auf der Hemmung von Enzymen, die für die Ergosterolbiosynthese des Pilzes benötigt werden. Der Hauptangriffspunkt ist die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (LDM), ein Schlüsselenzym der Ergosterolsynthese, das zur Gruppe der Cytochrom P-450-Enzyme gehört. Die LDM katalysiert die Umsetzung von Lanosterol zu Ergosterol durch oxidative Entfernung der Methylgruppe am C14 des Steroidgerüsts. Da die LDM jedoch kein pilzspezifisches Enzym darstellt und es beim Menschen ein analoges Enzym für die Synthese des Cholesterols gibt, kann es bei der Anwendung der Azol-Arzneistoffe durch die Hemmung der menschlichen LDM und anderer Cytochrome zu starken Nebenwirkungen kommen. Zur Reduktion der Nebenwirkungen ist es daher notwendig, möglichst spezifische, ausschließlich auf die LDM der Pilze (wie z. B. *Candida albicans* (*C. albicans*)) wirkende Inhibitoren zu entwickeln.

Da derzeit weder die Struktur der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase des *C. albicans* noch die des menschlichen Enzyms bekannt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit Protein-Modelle des humanen sowie des *Candida albicans* Enzyms der LDM entwickelt. Als Grundlage für den Bau der Protein-Modelle diente die Ende 2000 aufgeklärte Kris-

tallstruktur der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase aus *Mycobacterium Tuberculosis* [71]. Mit Hilfe dieser Modelle sollten die Bindungseigenschaften von Lanosterol, dem natürlichen Substrat der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase, aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte der Bindungsmodus verschiedener als Leitsubstanzen üblicher Inhibitoren genauer untersucht werden.

Zur Untersuchung des Bindungsmodus der Inhibitoren wurden nicht die üblichen Dockingverfahren benutzt, sondern mittels moleküldynamischer Methoden stabile Protein-Ligand-Komplexe generiert. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass Flexibilitäten der Proteinstruktur berücksichtigt werden.

# Kapitel 12

## Mykosen

In den letzten Jahren ist die Zahl der invasiven Pilzinfektionen stark gestiegen. Waren es im Jahre 1980 in den USA noch 828 Todesfälle, so wurden dort im Jahre 1997 schon 2370 Todesfälle erfasst, die direkt auf eine Pilzinfektion zurückzuführen waren. Damit liegen invasive Mykosen in den Statistiken für Infektions-verursachte Todesfälle vor der Tuberkulose auf Platz sieben. Hauptursache hierfür ist das drastische Ansteigen der Anzahl immunsupprimierter Patienten zum Beispiel bei Organ- und Knochenmarktransplantationen sowie auch der AIDS Patienten. Weiterhin entstehen erhöhte Infektionsrisiken durch Veränderung bzw. Intensivierung medizinischer Maßnahmen, wie verstärkter Einsatz von Chemotherapien bei Tumorerkrankungen, vermehrter Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika, routinemäßige Anlage zentraler Venenkatheter und Durchführung einer hochkalorischen parenteralen Infusionstherapie oder ähnliche „aggressive“ intensivmedizinische Behandlungsmethoden [72].

### 12.1 Pathogene Pilze

Bis auf wenige Ausnahmen stellen Pilze für einen Organismus mit funktionierender Immunabwehr keine Gefahr dar. Als typische Opportunisten kommen viele Pilze wie *Aspergillus*- und *Candida*-Arten in der Umgebung oder gar als Kommensalen<sup>1</sup> des Menschen vor und warten auf eine Gelegenheit, ihre Virulenzfaktoren einzusetzen.

In der Medizin werden die unterschiedlichen Pilze nicht nach ihrer Morphologie eingeteilt, sondern immer noch nach dem wissenschaftlich inkorrekten DHS -System. Dieses

---

<sup>1</sup>siehe Glossar

teilt die pathogenen Pilze in **D**ermatophyten, **H**efepilze und **S**chimmelpilze ein.

Dermatophyten sind Pilze, die auf Nährstoffe wie Keratin angewiesen sind und sich somit nur in der Haut und Hautanhangsgebilden (Nägel, Haare) von Mensch und Tier ansiedeln. Zu den Dermatophyten gehören *Trichophyton*-, *Microsporum* sowie *Epidermophyton*-Arten, die je nach Spezies unterschiedliche Hautregionen besiedeln.

Durch Dermatophyten hervorgerufene Mykosen werden auch als topische Mykosen bezeichnet, da sie sich nur auf Haut, Haare und Nägel erstrecken. Sie können dort zwar schwere Schäden hinterlassen und äußerst schmerzhaft sein, sind allerdings mit relativ großem Erfolg behandelbar.

Auch Schimmel- und Hefepilze können die Haut eines geschwächten Organismus besiedeln. Bei den Schimmelpilzen handelt es sich vor allem um *Aspergillus*-Arten, während bei den Hefepilzen die *Candida*-Arten die am weitest verbreiteten Pilzarten darstellen. Beide siedeln sich bevorzugt auf den Schleimhäuten oder vorgeschädigter Haut (z.B. große Brandwunden) an.

Im Gegensatz zu Dermatophyten sind diese Hefe- und Schimmelpilze wesentlich weniger vom Milieu abhängig und können sich daher auf andere Organe ausbreiten.

Schimmelpilzmykosen spielen in den gemäßigten Klimazonen nur eine untergeordnete Rolle als Pathogene, da sie nur ca. 2-5 % aller Mykosen ausmachen. Schimmelpilze kommen zwar ubiquitär vor, können sich aber erst dann durchsetzen, wenn der Patient einer erhöhten Sporenkonzentration ausgesetzt wird, z.B. bei Baumaßnahmen in einem Klinikbereich, durch verseuchte Erde (Pflanzerde von Zimmerpflanzen) und Nahrung (Nüsse, abgepacktes Brot, Gewürze). Am häufigsten kommt hier *Aspergillus fumigatus* (>80 % aller Aspergillose) in der systemischen Form meist als invasive pulmonale Aspergillose (IPA) vor.

Die Hauptgruppe der Mykosen wird durch Hefe- oder Sprosspilze hervorgerufen. Sie machen mehr als 75 % aller Mykosen aus. Davon werden allein 70-80 % aller Infektionen durch *C. albicans* verursacht, gefolgt von den Nicht-albicans-*Candida*-Arten (wie z.B. *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*). Da *Candida*-Mykosen am häufigsten vorkommen, wird *C. albicans* als Hauptvertreter dieser Pilzart im folgenden Abschnitt genauer beschrieben [72, 73].

### 12.1.1 *C. Albicans*

Das Wort *candida* kommt aus dem Lateinischen und bedeutet soviel wie blass oder weiß. Der Arname *albicans* bedeutet soviel wie „weiß machend“. Die Namensgebung bezieht sich auf den weißen Belag, der sich bei von *Candida* befallenen Schleimhäuten bildet. Als Fachausdruck für eine durch *Candida* hervorgerufene Mykose werden auch „Candidose“ oder „Candidiasis“ genannt. Im deutschen Sprachraum sind Candidosen besser unter dem Namen „Soor“ bekannt, der häufig bei schwächlichen Säuglingen oder Greisen auftritt. Sprachlich kommt die Bezeichnung „Soor“ aus dem altdeutschen Wort „sohren“, was so viel wie wundmachend bedeutet. Noch heute bedeutet „sore“ im Englischen so viel wie „wund“, „weh“ oder „entzündet“ [74].

Zur Besiedlung eines Wirtes nutzt *C. albicans* ein ganze Reihe von Virulenzfaktoren, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

**Dimorphismus:** Als Dimorphismus wird die Fähigkeit des *C. albicans* bezeichnet, von der Hefeform in die Filamentform zu wechseln, so dass sich der Pilz sehr schnell an unterschiedliche Umgebungen anpassen kann. Diese Fähigkeit wird auch als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren der *Candida*-Arten betrachtet. In der Hefeform liegt der Pilz als kleine kugelförmige Zelle vor, während er in der Filamentform mit langen Hyphen ein Mycel ausbildet. Belegt wurde diese Annahme durch *Candida*-Stämme, die im Tiermodell avirulent waren, da sie durch bestimmte Mutationen die Fähigkeit zum Dimorphismus verloren hatten [75].

**Adhärenz:** *Candida*-Arten besitzen verschiedene Proteine, die ihnen das Besiedeln unterschiedlicher Oberflächengewebe ermöglicht. Hierfür ist eine hohe Zell-Zell-Akzeptanz zwischen dem Wirts- und dem Pilzgewebe notwendig.

Beispiele für die Adhärenz sind Zellwandmannoproteine. Diese können durch Manno-syltransferasen entweder N-glycosidisch an Asparagin- oder O-glycosidisch an Serin oder Threonin-Resten binden und sich so auf dem Gewebe festsetzen.

Weitere Proteine, die für die Besiedlung anderer Gewebe zur Verfügung stehen, sind Agglutinin-ähnliche Sequenz-(Als)-Proteine sowie andere Zellwandproteine wie Hwp1p1 und einzelne sekretorische Aspartat-Proteasen. Diese werden je nach Gewebe und Entwicklung des Pilzes unterschiedlich aktiviert.

Vor allem bei *Candida*-Arten treten daneben noch Moleküle mit sehr hoher Homologie

zu Integrinen von Vertebraten auf, was deren Virulenz und Verbreitung erklärt. Integrine sind in der Lage, an extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen und Laminin aber auch an Liganden von Wirtszellen zu binden. Bei *C. albicans* wurde zum Beispiel ein Protein mit starker Ähnlichkeit zu einem Leukozyten-Integrin entdeckt.

Daneben wurden auch Lektine und weitere Oberflächenproteine auf *C. albicans* Zellen gefunden, so dass die Bindung der Pilzzellen zu Zellen des Wirtsgewebes außerordentlich hoch wird und durch die hohe Diversität der unterschiedlichen Oberflächenproteine der Pilz die Möglichkeit hat, eine Vielzahl unterschiedlicher Gewebe zu besiedeln [75].

**Sekretorische Hydrolasen:** Für ein tieferes Eindringen in die Gewebe reichen die Adhärenzfaktoren nicht aus. Hierfür sind Enzyme nötig, die Zellwände verändern, schädigen oder zerstören können. Zu diesem Zweck kann *C. albicans* eine Reihe von Phospholipasen und Aspartatproteasen sezernieren, um das umliegende Gewebe anzugreifen oder Angriffe des Wirtes abzuwehren. So kann *C. albicans* durch die unterschiedlichen Aspartatproteasen nicht nur Schleimhautbarrieren durchdringen, sondern auch einen Angriff von Makrophagen und Granulozyten abwehren und somit die unspezifische Abwehr des Wirtes ausschalten.

Dies ist besonders verheerend bei Patienten, die über keine spezifische oder eine geschwächte Immunabwehr verfügen (HIV- oder Immunsuppression), so dass sich *C. albicans* ebenso wie auch andere Pilze fast ungehindert ausbreiten können [75].

## 12.2 Symptome einer Mykose

Die Symptomatik einer Mykose ist äußerst uneinheitlich, da Pilze sich je nach befallendem Gewebetyp und Reaktionsweise des Patienten unterschiedlich verhalten können. In der Regel befallen Pilze Haut, Schleimhäute und zuweilen auch Haare oder Nägel. Von dort aus kann es bei invasiven Pilzinfektionen zu einem weiteren Vordringen auf innere Organe kommen. In der Regel reagieren allerdings nur geschwächte Patienten; aus diesem Grund werden Mykosen auch als „Erkrankungen von Erkrankten“ bezeichnet. Daher kann eine auftretende Mykose ein Hinweis auf eine ernstere Erkrankung sein.

Voraussetzung für das optimale Wachstum einer Mykose ist ein Milieu, in dem es



feucht, warm, weich und dunkel ist. So sind die Zartheit und Feuchtigkeit des Gewebes von Hautfalten und inneren Schleimhäuten bei der dort vorherrschenden Körperwärme die idealen Lebensbedingungen für Pilze.

Auf der **Haut** äußert sich eine Mykose meist durch juckende und nässende Hautentzündungen, die nicht abheilen, sondern eher die Tendenz zur Ausbreitung haben. Die bekannteste Form einer Hautmykose ist der **Fußpilz**; es können allerdings auch alle anderen Hautfalten befallen werden, sogar im Gehörgang werden Mykosen angetroffen.

Am häufigsten wird jedoch der **Mund** befallen. Hierbei wird der Pilz durch Haut-zu-Mund oder Mund-zu-Mund-Kontakt übertragen. Die feuchte Wärme sowie Speisereste auf oder zwischen den Zähnen sorgen für optimale Wachstumsbedingungen. *C. albicans* führt in der Mundhöhle zu weißen Belägen des Zahnfleisches, der Zunge und der Wangenschleimhaut. Derartige Soorbeläge treten zuerst als weiße Schwämmchen auf, die sich mit der Zeit ausbreiten und zusammenfließen können. Kratzt man die Beläge mit einem Löffel ab, kommen darunter hochrote, leicht blutende Entzündungen zum Vorschein. Gleichzeitig ist ein Übergreifen auf die äußere Haut möglich. Dabei treten in den Mundwinkeln feine gerötete und leicht nässende Hautrisse auf. Bei der Behandlung mit üblichen Heilsalben verschwinden diese auch „Faulecken“ genannten Entzündungen nicht; erst eine antimykotische Behandlung zeigt Erfolge.

Häufig treten Mykosen der **Mundhöhle** erst nach einer operativen Zahnbehandlung zu Tage; anscheinend fördern die Wunde und/oder das Nahtmaterial das Wachstum eines Pilzes. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass die Mundhöhle erheblich von Pilzen besiedelt sein kann, ohne irgendwelche Symptome zu zeigen, somit aber zur Brutstätte und zum Nachschubreservoir für die nachfolgenden Organe des Verdauungstraktes wird.

Mykosen der Speiseröhre treten meist nur im unteren Drittel kurz vor dem Magen auf. Schmerzgefühl hinter dem Brustbein und Sodbrennen können die Folge sein.

Geschluckte Pilze passieren den **Magen** ohne weiteres. Magensäure, soweit überhaupt vorhanden, macht ihnen nichts aus. *C. albicans* kann sogar sowohl im stark sauren Milieu des Magens als auch im alkalischen Milieu des Zwölffingerdarms die Schleimhäute besiedeln. Ob Pilze als Auslöser für Magen- und Darmgeschwüre in Frage kommen, ist noch unklar. Tatsache ist aber, dass sie oft auf diesen siedeln und das Ausheilen der Geschwüre erschweren.

**Dünndarm** und **Dickdarm** sowie der **Enddarm** bieten überaus ideale Bedingungen für

die Besiedlung durch *C. albicans* und viele andere Pilzarten. In den reichlich vorhandenen Falten und Zotten der Darmschleimhaut finden sich unendliche Möglichkeiten des ungestörten Wachstums. Dabei gehen die Pilzzellen mit den Epithelzellen der Darmschleimhaut enge Verbindungen ein. Es kann ein Pseudogeflecht auf den obersten Zellschichten des Darms entstehen und so kleinere Nester oder ganze Pilzrasen bilden.

Zwar gilt die Darmschleimhaut immer noch als Oberfläche des Körpers, doch durch die schlechte Zugänglichkeit dieser Region birgt eine Pilzinfektion dieser Schleimhäute eine wesentlich höhere Gefahr weiterer schwerwiegender Folgeerkrankungen.

Damit vollziehen sich Infektionen der Darmschleimhäute lange im Verborgenen. Kein frühzeitiger Juckreiz weist auf eine Rötung oder Entzündung hin, so dass erst in fortgeschrittenen Stadien Symptome auftreten. Diese sind häufig sehr uncharakteristisch und vielfältig.

Es können kneifende Bauchschmerzen und Durchfälle oder Verstopfungen im Wechsel auftreten; des weiteren sind Blähungen oder ein Blähbauch sehr häufig. Dieses sind allerdings noch sehr unspezifische Symptome, die auch auf andere Erkrankungen zurückgeführt werden können.

Die Blähungen entstehen durch den vom Pilz verursachten Aufschluss von Zucker und anderen Kohlenhydraten. Dabei bilden sich  $\text{CO}_2$  und Alkohol. Die Gasbildung treibt den Bauch auf und führt zu Blähungen. Der Alkohol hingegen wird rasch ins Blut aufgenommen und der Leber zugeführt. Dieser Alkohol ist im Blut von Patienten mit massiven Darm-Mykosen nachweisbar. Die dauerhafte Alkoholbelastung der Leber kann zu Fehlleistungen des Organs führen und sich auf den ganzen Organismus auswirken. Vor allem Einflüsse auf die in den Darm abzugebenden Verdauungssäfte führen zu einer Verdauungsschwäche und können einer Darmmykose weiteren Vorschub leisten.

Neben Alkohol können noch weitere Ekto- aber auch Endotoxine eines Pilzes den Organismus des Patienten beeinflussen. Viele dieser Toxine, über die bisher noch wenig bekannt ist, werden resorbiert und gelangen über Lymphe und die Blutbahn in die Leber und alle anderen Organe. Somit treten Symptome auf, die nichts mit dem eigentlich befallenen Organ zu tun haben. Eine Darmmykose, bspw. durch *C. albicans*, kann neben Leber- und Hauterkrankungen auch zu Gelenkbeschwerden, Allergien, Migräne und Depressionen führen.

Bei Frauen können Pilzinfektionen der **Scheide** auftreten. Diese machen sich durch Ausfluss, Juckreiz oder brennende Schmerzen bemerkbar. Eine Vaginalmykose tritt

allerdings nur dann auf, wenn auch die natürliche Besiedlung durch Schutzbakterien gestört ist.

Bei Säuglingen und Kleinkindern kann es zur sog. **Windeldermatitis** kommen. Dabei wird durch den erweichenden Kontakt der Haut mit der feuchten Windel und dem Kontakt mit befallenem Stuhl eine Infektion der Haut verursacht, die sich über den gesamten Windelbereich erstrecken kann. Das Kind wird durch den ständigen Juckreiz oder das Brennen bei jeder Bewegung stark in Mitleidenschaft gezogen. Hauterscheinungen über den Windelbereich hinaus sind als sog. „Mykide“ zu betrachten. Ein Mykid ist eine allergische Reaktion der Haut auf bestimmte Toxine der Pilze. Sie tritt auch bei anderen vorher beschriebenen Mykosen auf und kann Flecken, Schüppchen oder ekzemähnliche Entzündungen an unterschiedlichen Stellen der Haut hervorrufen. Selbst im Mund können sich Mykide als aphtenartige Gebilde entwickeln [74].



# Kapitel 13

## Antimykotika und ihre Wirkung

Zur medizinischen Behandlung von Mykosen kommen unterschiedliche Stoffe mit verschiedenen Wirkmechanismen zum Einsatz.

Ursprünglich wurden unspezifisch wirkende Antiseptika wie Undecylensäure, PVP-Jod und Triarylaminfarbstoffe, bspw. Fuchsin, verwendet. Ein erster wesentlicher Fortschritt in der Therapie von Mykosen konnte erst in den 60er Jahren mit der Einführung der Polyen-Antimykotika erzielt werden. Entscheidend war letztlich die Entwicklung von Antimykotika des Azol-Typs.

Im Gegensatz zu den Bakterien gehören Pilze zu den Eukaryoten und verfügen somit über einen von einer Zellmembran umschlossenen Kern, ein endoplasmatisches Retikulum und über Mitochondrien. Diese strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit der Pilzzellen zu den menschlichen Zellen macht die Entwicklung selektiver und nebenwirkungsarmer Antimykotika äußerst schwierig.

Auf der Suche nach selektiv auf den Pilz einwirkende Arzneistoffe konzentrierte man sich daher verstärkt auf Substanzen, die an der Zellmembran des Pilzes angreifen; die Zellmembran des Pilzes unterscheidet sich nämlich von der menschlichen Membran in Aufbau und Zusammensetzung recht deutlich.

### 13.1 Antiseptika

Für die lokale Behandlung der Mykosen von Haut, Haaren und Nägeln können Desinfektionsmittel mit fungistatischer bzw. fungizider Wirkung, wie z. B. Jod, Thymol, Salicylsäure, Hydroxychinolin-Derivate, Invert- und Amopholseifen verwendet werden. Durch

die Entwicklung neuerer Substanzen haben die meisten der genannten Stoffe allerdings an Bedeutung verloren.

Der Einsatz von Farbstoffen wie Gentianaviolett, Malachit- oder Brillantgrün verbietet sich wegen möglicher kanzerogener Effekte.

## 13.2 Polyen-Antimykotika

Die Grundstruktur der Polyen-Antimykotika stellt ein Makrolid mit 4 bis 7 Doppelbindungen dar. Die wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse sind das Amphotericin B und das Nystatin als fungizid wirkende Substanzen und das Natamycin, welches nur fungistatische Eigenschaften hat.

Die Wirkung dieser Stoffe beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen des lipophilen Molekülteils mit Sterolen der Zellmembran. Durch die Komplexbildung mit den Sterolen werden diese daran gehindert, mit den Phospholipiden der Zellmembran zu interagieren. Dadurch ist der Aufbau der Membran gestört, und es können wichtige Eigenschaften der Membran nicht mehr aufrechterhalten werden. Auf diese Weise werden wichtige Transportprozesse, wie z. B. der für Kaliumionen unterbrochen, was ein Absterben der Zellen zur Folge hat. Der Polyen-Wirkstoff ist jedoch nur dann therapeutisch einsetzbar, wenn er zum Ergosterol der Pilzmembran eine höhere Affinität als zum Cholesterol der tierischen Zellen aufweist. Doch selbst dann stellen parenteral verabreichte Polyen-Antimykotika vergleichsweise toxische Pharmaka dar.

**Amphotericin B** (s.Abb. 13.1) wird aus *Streptomyces nodosus* isoliert. Es ist das einzige Polyen, das auch systemisch (parenteral) gegeben werden kann. Es ist bei zahlreichen Mykosen von Spross- und Schimmelpilzen, wie z. B. *Blastomykosen*, *Kryptokokkosen*, *Kandidosen* und *Aspergillosen* sehr wirksam. Da die fungizide Wirkung sehr schnell eintritt, eignet sich Amphotericin B zur Notfalltherapie lebensbedrohlicher Pilzinfektionen.

Wie alle anderen Polyen-Antimykotika kann Amphotericin B auch lokal angewendet werden.

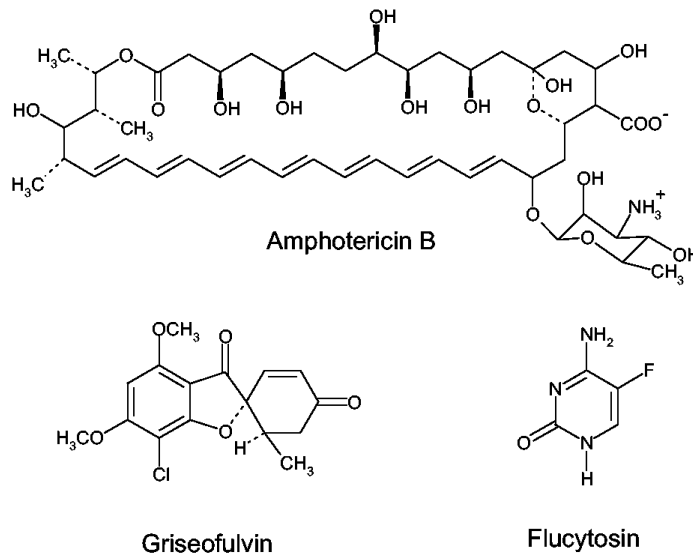


Abbildung 13.1: Amphotericin B (Polyen-Antimykotikum), Griseofulvin und Flucytosin.

### 13.3 Griseofulvin

Griseofulvin (s. Abb 13.1) wird aus verschiedenen Schimmelpilzen, z. B. *Penicillium griseofulvum* isoliert. Es entfaltet seine Wirkung durch Störung der Mitose und anderer zellulärer Stofftransportprozesse des Pilzes. Darüberhinaus bindet Griseofulvin am Keratin der Wirtszelle und vermindert so den Abbau durch Keratinasen. Das Wirkungsspektrum von Griseofulvin ist ausschließlich auf Dermatophyten beschränkt.

Da die Resorption des Wirkstoffs stark von der Teilchengröße abhängt, kommt es nahezu ohne Ausnahme mikronisiert zum Einsatz [40].

### 13.4 Flucytosin

Das schmale Wirkspektrum von Flucytosin (s. Abb 13.1) umfasst nur Hefen, insbesondere *Cryptococcus neoformans* und *Candida*-Arten sowie einige Schimmelpilze wie *Aspergillus*-Arten und die Erreger der Chromomykose.

Da 20-50 % der *Candida*-Arten eine primäre Resistenz gegen Flucytosin aufweisen und sich häufig eine Sekundärresistenz unter der Therapie entwickeln kann, muss ein Sensibilitätstest vor Therapiebeginn und während der Behandlung durchgeführt wer-

den.

Flucytosin kann nur bei Pilzen, die Cytosindesaminase bilden, d.h. bei Candidosen, Kryptokokkosen und Chromomykosen eingesetzt werden. Das aus Flucytosin gebildete 5-Fluordesoxyuridin-monophosphat blockiert die Thymidilat-Synthetase und führt zur Hemmung der DNA-Synthese, oder es wird als falscher Baustein in die RNA eingebaut mit der Folge einer Störung der RNA- und Proteinsynthese [40].

## 13.5 Hemmstoffe der Ergosterolbiosynthese

Bei den Inhibitoren der Ergosterolbiosynthese wird ausgenutzt, dass der Pilz Ergosterol statt des in der menschlichen Zelle enthaltenen Cholesterols benötigt. Diesen Unterschied hat man sich bei den Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren (Hemmstoffe) zu Nutze gemacht, da sich die Enzyme zur Biosynthese des Ergosterols im Pilz deutlich von den Enzymen zur Biosynthese des Cholesterols in menschlichen Zellen unterscheiden.

Bisher sind drei Klassen der Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren bekannt: Allylamine, Morpholine und Azolderivate. Von diesen sind die Azole die mit Abstand am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe.

Zum besseren Verständnis der Wirkmechanismen der drei Arzneistoff-Klassen, soll hier zuerst kurz auf die Biosynthese und die Funktion des Ergosterols in den Pilzzellen eingegangen werden.

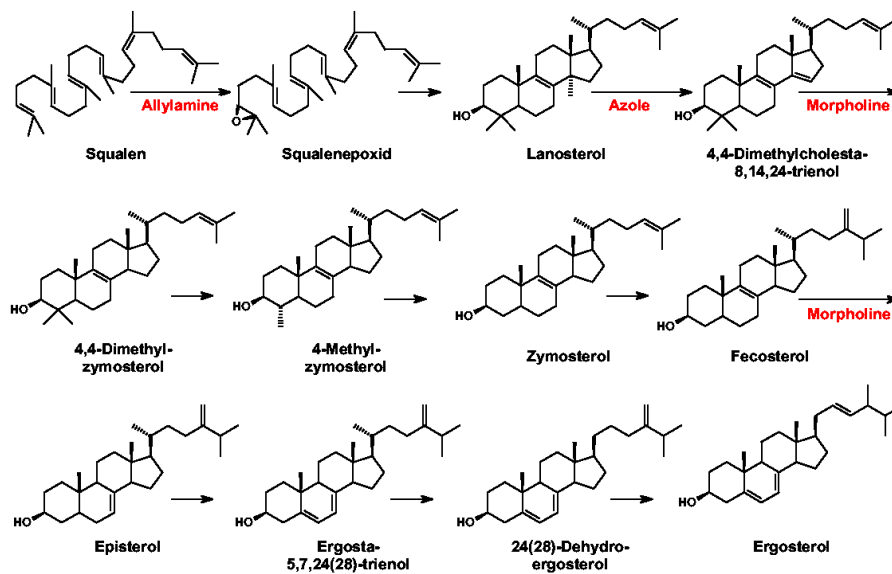
### 13.5.1 Biosynthese des Ergosterols

Bei der Biosynthese des Ergosterols in Pilzen dient Acetyl-Coenzym A als Ausgangsverbindung. Der Aufbau des Squalens erfolgt dann über HMG-CoA, Mevalonsäure und Farnesyldiphosphat.

Mittels Squalenepoxidasen wird das Squalen anschließend zum Squalenepoxid (2,2-Oxidosqualen) umgesetzt. Über den durch die Oxidosqualencyclase vermittelten Ringchluss wird das Lanosterol gebildet. Beim Lanosterol trennen sich die Wege der Sterolsynthese der Pilze und der Tiere. Mit Lanosterol als Ausgangsprodukt wird bei den Pilzen Ergosterol hergestellt, bei Tieren/Mensch Cholesterol.

Der nächste Schritt zur Synthese des Ergosterols ist eine oxidative Abspaltung der Methylgruppe am C-14 durch das Enzym Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (LDM) zu Di-





**Abbildung 13.2:** Vereinfachter Syntheseweg des Ergosterols. Die Angriffsstellen innerhalb der Reaktionsfolge für die jeweiligen Ergosterolbiosynthese-Inhibitoren sind rot gekennzeichnet.

methylcholestatrienol. Als weitere wichtige Syntheseschritte sind noch die Reduktion in Ring D mit Hilfe der  $\Delta^{14}$ -Reduktase zu Dimethylzymosterol und die Isomerisierung der Doppelbindung in Ring B mit der  $\Delta^8, \Delta^7$ -Isomerase von Fecosterol zu Episterol zu erwähnen, da diese ebenfalls von pharmazeutischem Interesse sind (s. Abb. 13.2) [76].

### 13.5.2 Funktion des Ergosterols

Die bisher bekannten Hauptfunktionen des Ergosterols liegen in der Steuerung der Zellmembran der Pilze. Ergosterol moduliert die Membranfluidität. Es wird in die Phospholipid-Bilayer der Zellmembran eingebaut. Durch den Einbau des Ergosterols erhält die Zellmembran die erforderliche Festigkeit und Struktur, um die Membranpermeabilität und die optimale Funktion der membranständigen Proteine (Chitinsynthetase, Membran-ATPase u.a.) zu gewährleisten. Da für die Zellmembran sehr viel Ergosterol benötigt wird (ca. 15  $\mu\text{g/mL}$ ) spricht man auch von einer „bulk“-Funktion. Diese Funktion ist allerdings relativ unabhängig von der Ergosterolstruktur und kann auch durch andere Sterole übernommen werden.

Für die zweite Funktion des Ergosterols als Wachstumpromotor müssen allerdings min-

destens Spuren (10 ng/mL) von Ergosterol vorhanden sein, um das Pilzwachstum zu initiieren. Diese Aufgabe wird auch „*sparking*“-Funktion genannt und kann nur von Ergosterol übernommen werden. Das gesamte Spektrum der Funktionen von Ergosterol im Wachstumsprozess der Pilze ist bis heute nicht bekannt. Allerdings führt die Beeinträchtigung der Ergosterol-Biosynthese zu einem Mangel an Ergosterol und einer Akkumulation von Biosynthesevorstufen und somit zur Veränderung der Zellmembran der Pilze. Das hat eine Beeinträchtigung der Funktion membranständiger Enzyme zur Folge oder kann zum Austreten essentieller Zellbestandteile durch die erhöhte Membranpermeabilität führen. Solche Effekte und die dadurch hervorgerufenen Folgereaktionen führen dann zu einer Wachstumshemmung oder zum Absterben des Pilzes [76].

### 13.5.3 Squalenepoxidasehemmer

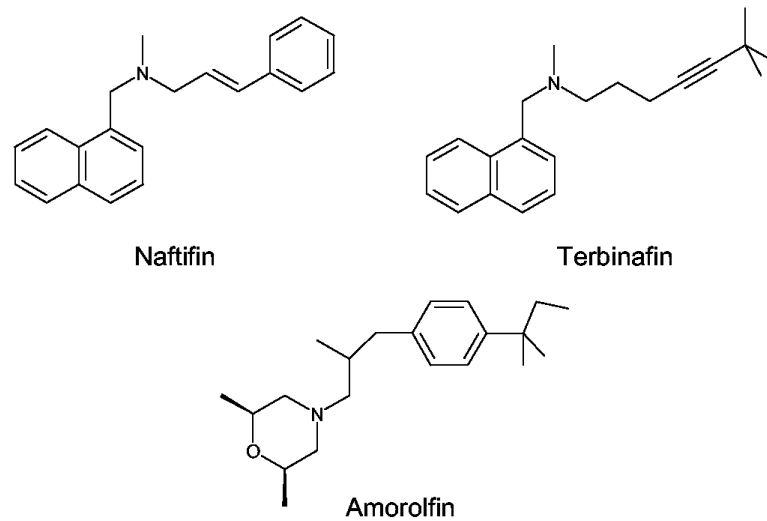
Die Allylamin-Derivate Terbinafin und Naftifin sind nicht-kompetitive Inhibitoren der Squalenepoxidase. Dadurch wird die Umwandlung von Squalen in Lanosterol und gleichzeitig die Bildung von Ergosterol gehemmt. Deshalb haben Allylamine in den meisten Fällen eine fungistatische Wirkung. In einigen Fällen, wie z. B. bei den Dermatophyten, kommt es wegen der Akkumulation von Squalen zu einer fungiziden Wirkung.

**Terbinafin** (s. Abb. 13.3) ist trotz seines weiten Wirkungsspektrums *in vitro* fast ausschließlich nur gegen Dermatophyten aktiv.

Hauptanwendungsgebiet ist daher die systemische Behandlung von Dermatophyten der Haut und der Schleimhaut, die lokal nicht ausreichend behandelt werden können. In der Regel wird Terbinafin gut vertragen, es können als Nebenwirkung leichte gastrointestinale Beschwerden auftreten. In seltenen Fällen werden auch schwerwiegende Hautreaktionen und Geschmacksstörungen hervorgerufen.

Da Terbinafin keine Affinität zu Cytochrom-P-450 hat, werden weder der Hormonstoffwechsel des Patienten noch die Metabolisierung anderer Arzneistoffe verändert [40].

**Naftifin** (s. Abb. 13.3) wirkt stark gegen Dermatophyten, während die Wirkung gegen Hefepilze deutlich schwächer ist. Daneben besitzt es noch einen antiphlogistischen Effekt. Wegen des starken *First-pass*-Effekts von Naftifin wird es ausschließlich lokal zur Behandlung von Pilzinfektionen der Haut und der Schleimhaut verwendet [40].



**Abbildung 13.3:** Antimykotisch wirkende Allylamine und Morpholin-Derivate.

#### 13.5.4 Morpholin-Derivate

Derzeit wird **Amorolfin** (s. Abb. 13.3) als einziger Vertreter dieser Substanzklasse genutzt. Das Wirkspektrum erstreckt sich über eine Reihe human pathogener Pilze wie Dermatophyten und dimorphe Pilze.

Die Wirkung kommt durch die Inhibition der  $\Delta^{14}$ -Reduktase und der  $\Delta^8, \Delta^7$ -Isomerase zustande. Durch die Hemmung dieser Enzyme akkumulieren ähnliche Ergosterolbiosynthesestufen wie bei den Azol-Derivaten. Daher werden die Folgereaktionen erst im nächsten Abschnitt (Azol-Derivate) beschrieben.

Da Amorolfin bei oraler Gabe rasch metabolisiert wird und es überdies noch zu einer hohen Eiweißbindung kommt, kann es nur topisch bei Haut- und Nagelmykosen angewendet werden [40].

#### 13.5.5 Antimykotisch wirksame Azolderivate

Die Azol-Antimykotika kann man in zwei strukturelle Klassen einteilen, die beide das gleiche Wirkprinzip haben. Die erste Klasse enthält einen Imidazolring zur Bindung an das Enzym, während in der zweiten Klasse die Bindung über einen Triazolring erfolgt. Der Imidazol- bzw. Triazolring sind der essentielle Teil der Azol-Antimykotika, da durch

diese Heterocyclen, wie in der folgenden Arbeit noch genauer beschrieben wird, eine Bindung zum Häm-Eisen der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (LDM oder P-450<sub>14DM</sub>) ausgebildet wird und so das Enzym in seiner Funktion gehemmt wird.

Allgemein weisen Azole ein breites Wirkspektrum gegen Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze auf, unterscheiden sich aber stark in der Wirkstärke gegen die verschiedenen Pilzarten.

In der Regel haben Azole durch die Hemmung des Cytochrom P-450<sub>14DM</sub> eine fungistatische Wirkung. Bei einigen Azolen können jedoch auch zusätzliche fungizide Effekte beobachtet werden. Diese fungiziden Effekte werden meist durch Veränderungen in der Struktur der Zytoplasmamembran hervorgerufen; allerdings sind hierfür höhere Azol-Konzentrationen notwendig, die nur bei lokaler Anwendung erreicht werden.

Ein indirekter fungizider Effekt entsteht durch die Hemmung weiterer mitochondrialer Enzyme der Pilzzellen. Dabei kommt es zur Anreicherung von toxischen Peroxiden, die zum Absterben der Pilzzellen führen.

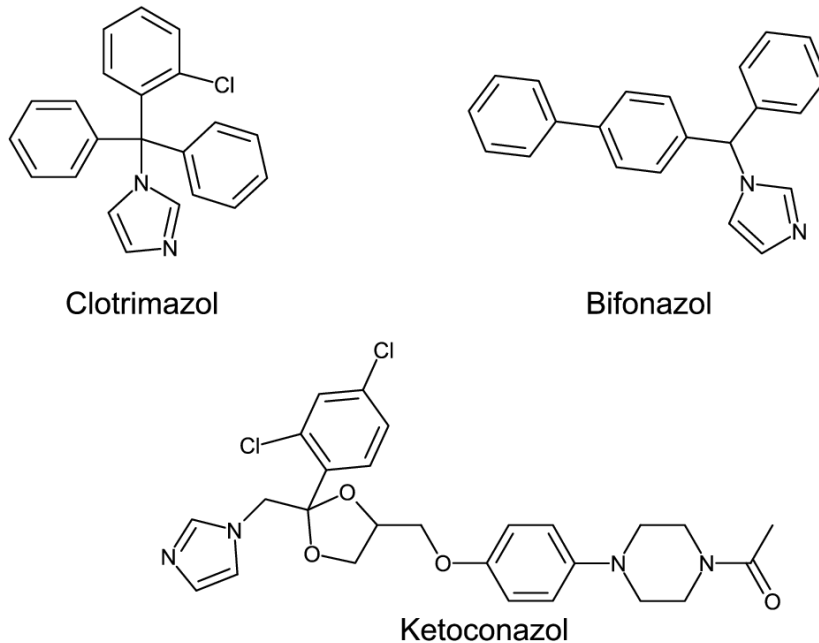
Derzeit sind in Deutschland 14 Azol-Antimykotika in den unterschiedlichsten Darreichungsformen auf dem Markt, von denen 12 zu den Imidazol- und 2 zu den Triazol-Derivaten zählen.

Im Folgenden werden einige Azol-Antimykotika genauer beschrieben; das Augenmerk wird dabei neben der Häufigkeit der Anwendung auch auf die in den später folgenden Simulationen verwendeten Substanzen gelegt.

Das am häufigsten verwendete Azol-Antimykotikum ist **Clotrimazol** (s. Abb. 13.4). Es wird in einer Reihe unterschiedlicher Darreichungsformen zur Behandlung von Haut- und Genitalmykosen verwendet. Da es aber über eine ausgeprägte First-pass-Metabolisierung verfügt, steht Clotrimazol für eine systemische Behandlung nicht zur Verfügung.

**Bifonazol** (s. Abb. 13.4) kann zwar auch nur lokal verwendet werden, hat jedoch zusätzlich eine antiphlogistische Wirkung, so dass sich eine begleitende Behandlung mit Glucocorticoiden erübrigt. Ausserdem wird Bifonazol häufig als Vergleichssubstanz für die Testung antimykotischer Substanzen verwendet.

**Ketoconazol** (s. Abb. 13.4) war das erste oral applizierbare Azol-Antimykotikum und die bisher einzige systemisch einsetzbare Substanz aus der Gruppe der Imidazol-Derivate. Da Ketoconazol aber die menschlichen Cytochrom P-450-Isoenzyme angreift, kommt es zu Störungen der Biosynthese menschlicher Steroide, wie Corticosteroide und Testosteron, was mit den entsprechenden Folgen einer Gynäkomastie und Inferti-



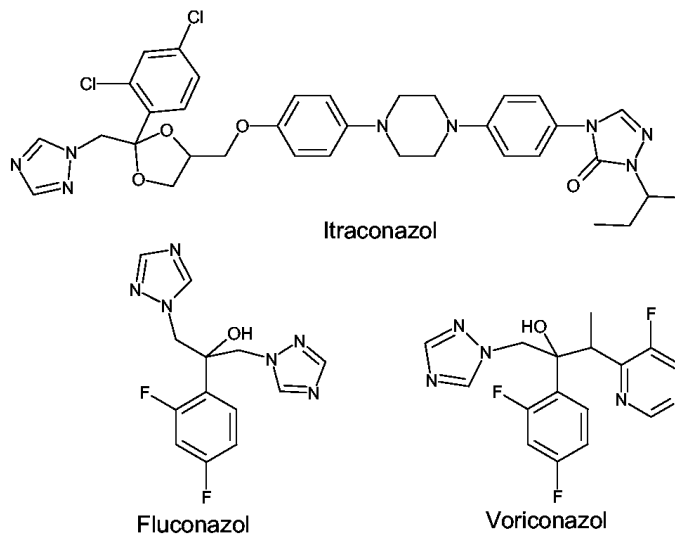
**Abbildung 13.4:** Imidazol-Derivate der Azol-Antimykotika

lität verbunden ist. Daneben hat eine zwar nur selten auftretende, aber meist lebensbedrohliche Lebertoxizität dazu geführt, dass Ketoconazol eigentlich nur noch für die Behandlung einer Infektion mit der Hefe *Malassezia furfur* und für Forschungszwecke als Standardsubstanz verwendet wird.

**Fluconazol** (s.Abb. 13.5) ist ein Vertreter der Triazol-Antimykotika. Die Substanz wird zur Behandlung systemischer Candidosen und Candidosen der Schleimhäute eingesetzt, die einer lokalen Therapie nicht zugänglich sind. Gegen Schimmelpilze der Aspergillus-Arten ist die Substanz inaktiv. Aufgrund der beiden Triazolringe und der Hydroxylgruppe des Moleküls ist Fluconazol das polarste der verwendeten Azole und daher gut wasserlöslich. Somit steht es auch zur Herstellung von Injektionslösungen zur Verfügung. Außerdem sind die Triazolringe des Fluconazols wesentlich biotransformationsstabiler als die Imidazolringe der bisher beschriebenen Antimykotika, so dass Triazol-Antimykotika generell langsamer eliminiert werden als die entsprechenden Imidazol-Derivate .

Trotz der relativ hohen Tagesdosis von 400 mg hat Fluconazol keinen klinisch relevanten Einfluss auf die Steroidhormon-Biosynthese. Außerdem ist die Lebertoxizität bei allen Triazol-Derivaten wesentlich geringer als beim Ketoconazol.

Das Triazol-Derivat **Itraconazol** (s.Abb. 13.5) zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeit zum Ketoconazol. Für Dermatophyten und Schimmelpilze ist es das derzeit stärkste auf



**Abbildung 13.5:** Triazol-Derivate der Azolantimycotika.

dem Markt befindliche Antimykotikum. Bei *Candida*-Arten hingegen ist es erst bei sehr hohen Konzentrationen wirksam. Es wird daher ausschließlich zur oralen Behandlung schwerer Schimmelpilzinfektionen verwendet.

**Voriconazol** (s. Abb. 13.5) ist das neueste Azol-Antimykotikum und soll in den nächsten Monaten auch in Deutschland in den Handel eingeführt werden. Es ist strukturell sehr ähnlich zu Fluconazol, zeigt jedoch eine höhere Wirkstärke. Durch seine immer noch gute Löslichkeit wird es sowohl oral als auch zur intravenösen Behandlung von schweren invasiven Infektionen von *Aspergillus*-, *Candida*- und einiger anderer Spezies verwendet.

Alle Azol-Derivate hemmen durch Interaktionen mit den Cytochrom-P-450-Isoenzymen (CYP) der Leber, insbesondere des CYP3A4, die Elimination oder Metabolisierung einiger Arzneistoffe und können somit zu deren Wirkungsverlängerung oder Erhöhung der Nebenwirkungen führen [40, 76].

# Kapitel 14

## Die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51)

Die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase gehört zu der großen Familie der Cytochrom P-450-Enzyme. Diese wurden im Jahre 1955 [77] in Extrakten von Ratten- bzw. Schweinelebern entdeckt [78,79] und stellten eine zu dieser Zeit unbekannte Klasse der Hämoproteine dar [80,81]. Der Name P-450 rührt daher, dass diese Enzyme zuerst als Pigmente mit einer Absorptionsbande bei 450 nm auffielen [82].

Anfänglich ging man davon aus, dass P-450-Enzyme nur in den Mikrosomen der Leber vorkommen und ausschließlich zum oxidativen Abbau von Xenobiotika<sup>1</sup> oder anderer exogener Stoffe dienen.

Sehr schnell wurden jedoch weitere Vertreter dieser Enzymgruppe in anderen tierischen Geweben gefunden. Hohe P-450-Konzentrationen fanden sich in der Nebenniere, der Plazenta, den Hoden und in anderen vor allem Steroidhormone bildenden Organen. Daneben wurden P-450-Enzyme entdeckt, die wichtige Funktionen in der Biosynthese von Gallensäuren und der metabolischen Aktivierung von Vitamin D<sub>3</sub> übernehmen. Alle P-450-Enzyme, die an der Biosynthese endogener Stoffe beteiligt sind, haben eine hohe Substratspezifität und metabolisieren keine xenobiotischen Substanzen. Zu dieser Gruppe der hoch spezifischen P-450-Enzyme gehört auch die Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase.

Erst Mitte der 60er Jahre wurden Enzyme der P-450-Klasse auch in anderen Spezies identifiziert. So wurden 1964 Cytochrome in Extrakten der Bäckerhefe *Saccharomyces*

---

<sup>1</sup>siehe Glossar

*cerevisiae* entdeckt [83]. Danach fand man sehr schnell in fast allen eukaryotischen Lebewesen Cytochrome des P-450-Typs [77].

## 14.1 Vorkommen und Funktion der CYP51

Aus dem 1964 beschriebenen Extrakt der Bäckerhefe konnte erst Jahre später die CYP51 isoliert und erstmalig charakterisiert werden [84, 85]. Da CYP51 zunächst in Hefen gefunden wurde und man davon ausging, dass es sich um ein pilzspezifisches Cytochrom handelt, wurde es unter der Familienziffer 51<sup>2</sup> in die Familie der Pilz- und Pflanzen-Cytochrome eingereiht. Daraus resultiert die Bezeichnung CYP51<sup>3</sup>. In älterer Literatur wird meist die Bezeichnung P-450<sub>14DM</sub> angetroffen.

Kurz darauf wurde dann die CYP51 auch in Tieren und sogar in höheren Pflanzen entdeckt [88–90]. Mittlerweile geht man davon aus, dass CYP51 das am weitesten verbreitete Cytochrom P-450 überhaupt ist.

So ist CYP51 auch das einzige bisher bekannte P-450, das mit einer ausgeprägten Sequenzidentität in unterschiedlichsten Spezies vorkommt.

Die Identität zwischen tierischer CYP51, wie die der Ratte, der Maus, des Schweins und der humanen Spezies liegt bei über 90 % [91]. Von Interesse ist, dass die Identität der CYP51 aus der Ratte und der Hefe *S. cerevisiae* über 40 % beträgt, in Substratbindenden Bereichen sogar über 80 % [92].

Bei der Sequenz der CYP51 aus *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), des einzigen CYP51, dessen Enzymstruktur bislang aufgeklärt werden konnte, liegt die Sequenzidentität zu den tierischen Vertretern des Enzyms bei 33 - 35 %, zu den Vertretern der fungalen Enzyme nur bei 26 - 29 %.

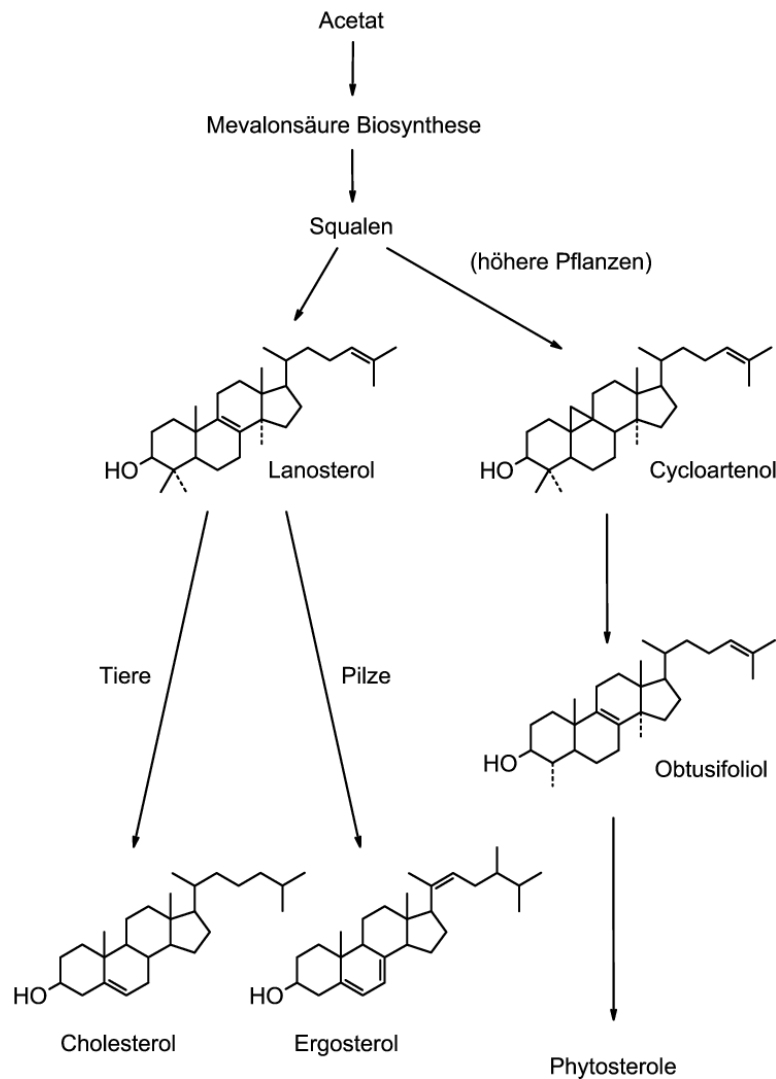
Somit gehört die CYP51 zwar zu derselben Familie, widerspricht aber der in Literatur [86] definierten Familieneinteilung, deren Grenzwert für die Familienzugehörigkeit einzelner Vertreter bei einer Sequenzidentität von 36 % liegen soll. Dieses stellt die prinzipielle Einteilung der P-450-Familien unterschiedlicher Gattungen in Frage. Denn die P-450-Familie CYP51 kommt sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich vor und bil-

---

<sup>2</sup>Cytochrome werden anhand ihrer Abstammung und des Vorkommens in Familien eingeteilt, die durch römische Ziffern gekennzeichnet sind. So haben tierische Cytochrome die Ziffern I bzw. V, X, Pflanzen und Pilze L sowie Bakterien C. Heute werden in der Regel die römischen durch arabische Ziffern ersetzt [86].

<sup>3</sup>CYP steht für **C**ytochrome **P**-450 [87].





**Abbildung 14.1:** Schema der Steroidbiosynthese von Tieren, Pilzen und Pflanzen. Während Tiere und Pilze Lanosterol als erstes Steroid nutzen, um Cholesterol bzw. Ergosterol zu synthetisieren, wird bei den Pflanzen Squalen zu Cycloartenol umgesetzt. Dient bei Tieren und Pilzen Lanosterol als Substrat für die CYP51, so ist es bei den Pflanzen Obtusifoliol.

det demnach eine gattungsübergreifende oder auch orthologe Protein-Familie. CYP51 ist die bisher einzige P-450-Familie, die so weit verbreitet ist. Des Weiteren zeigt sie zwar in den Sequenzbereichen des aktiven Zentrums eine hohe Sequenzidentität, in der Gesamtsequenz allerdings offenbart sie die größte Diversität aller Cytochrom P-450-Familien [93, 94]. Das ist ein Hinweis darauf, dass das Prinzip der CYP51 evolutionär schon sehr früh entwickelt und beibehalten, jedoch an den Stoffwechsel der

jeweiligen Spezies angepasst wurde.

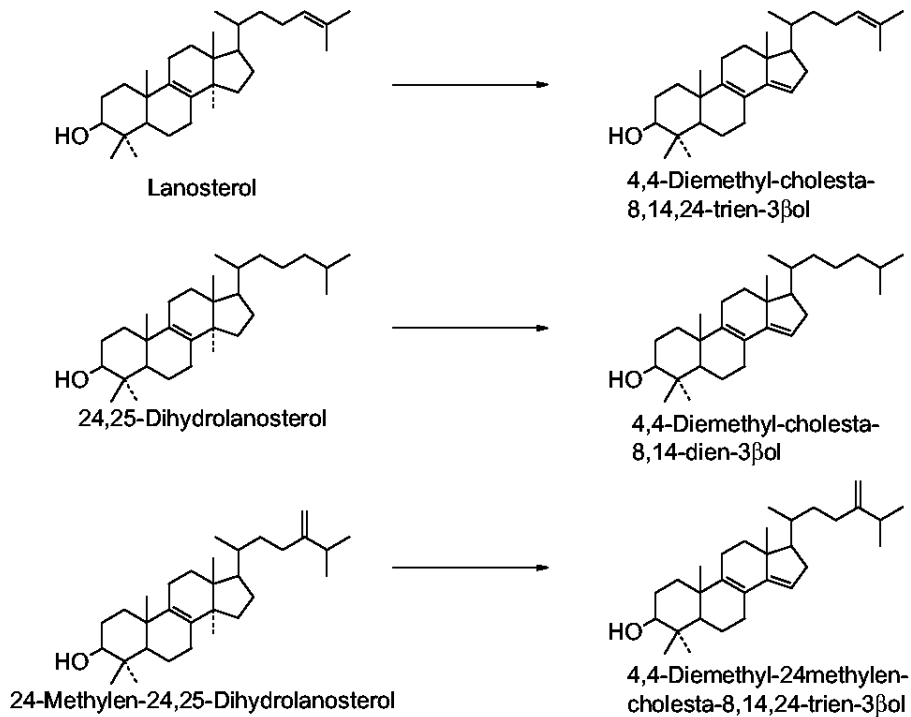
Mittlerweile sind CYP51-orthologe Strukturen in Spezies bekannt, die sich vor mehr als 600 Millionen Jahren vom Stammbaum der Tiere und Menschen (als evolutionär jüngste Spezies) abgespalten haben (s. Abb. 14.6). Dies macht CYP51 und die P-450 insgesamt zu einem wichtigen Instrument, um das genetische Alter und die Verwandtschaft zweier Spezies genau zu bestimmen.

Als Grund für das hohe Alter der CYP51 wird die essentielle Funktion bei der Synthese von funktionalen Steroiden vermutet. Es gibt nämlich kein aktives Steroid, an dem die C14-Methylgruppe noch erhalten ist [77]. So werden bei Tier und Mensch Lanosterol und 24,25-Dihydrolanosterol, in Pilzen jedoch Lanosterol und 24-Methylen-24,25-Dihydrolanosterol als Substrat umgesetzt. Durch die Demethylierung entstehen die entsprechenden 4,4-Dimethyl-cholesta-trien bzw. -dien-3 $\beta$ -ole. Lanosterol wird damit zum 4,4-Dimethyl-cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol und 24,25-Dihydrolanosterol zum 4,4-Dimethyl-cholesta-8,14-dien-3 $\beta$ -ol umgesetzt. Als Endprodukte der Steroidbiosynthese entstehen dabei in tierischen Spezies hauptsächlich Cholesterol und in Pilzen Ergosterol (s. Abb. 14.2).

Das weit verbreitete Vorkommen der CYP51 stellt natürlich ein Problem für die Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen dar. Denn durch die weite Verbreitung des Enzyms auch in den von Pilzen befallenen Wirtsorganismen ist es nicht auszuschließen, dass man ebenso den Wirt schädigt. Eine derartige Annahme ist durch die teilweise erheblichen Nebenwirkungen einiger Antimykotika gut dokumentiert.

Andererseits eröffnet sich dadurch auch die Möglichkeit, andere bisher schwer therapierbare Infektionskrankheiten zu heilen, wie zum Beispiel die derzeit wieder auf dem Vormarsch befindliche Tuberkulose. Auch im Erreger der Tuberkulose wurde vor kurzem ein CYP51-ähnliches Enzym gefunden, das sich durch viele der bisher bekannten Antimykotika ebenfalls inhibieren lässt. Allerdings ist die Funktion des Enzyms in diesem Bakterium noch nicht bekannt, da Bakterien kaum Steroide enthalten. Diese Steroide haben in Bakterien ausschließlich hormonelle Funktionen. Von *Mycobacterium smegmatis*, das dem *Mycobacterium tuberculosis* nahe verwandt ist, weiß man, dass es Cholesterol synthetisiert. Daneben haben Versuche mit *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt, dass es dieselben Substrate wie alle CYP51 anderer Spezies demethylieren kann [95,96]. Somit haben die Azolderivate nicht nur antimykotische, sondern in einigen Fällen auch antibiotische und herbizide Wirkungen.

Weiterhin ist die Funktion des CYP51 in anderen Spezies ungeklärt. Sogar bei Tieren



**Abbildung 14.2:** Strukturformeln der Edukte (rechts) und Produkte (links) bei der katalytischen Reaktion des CYP51.

bzw. Menschen ist noch nicht sicher, ob alle Funktionen der CYP51 geklärt sind. Bisher wurde nur die Funktion der CYP51 in der Cholesterolsynthese genauer untersucht, und hier werden spezifische Azolderivate als mögliche Cholesterolspiegel senkende Therapeutika diskutiert.

Aber auch das Dimethylierungsprodukt der CYP51, 4,4-Dimethyl-cholesta-8,14,24-trien-3β-ol (FF-MAS<sup>4</sup>), besitzt physiologische Aufgaben im Körper. So wird durch die Demethylierung von Lanosterol die Meiose-Reaktion in den Ovarien weiblicher Tiere ausgelöst. In den männlichen Hoden wird diese Aufgabe von 4,4-Dimethyl-cholesta-8,24-dien-3β-ol (T-MAS<sup>5</sup>), das durch die  $\Delta 14$ -Reduktase aus der FF-MAS gebildet wird, übernommen. Somit dient CYP51 nicht nur zur Herstellung von Steroiden, sondern ihm kommt in den Geschlechtsorganen auch eine Art Steuerfunktion zu. Denn ab einer bestimmten Konzentration der T-MAS bzw. FF-MAS wird die Meiose-Reaktion in den Gonaden ausgelöst. Somit könnte durch die gezielte Steuerung der Demethylierungs-

<sup>4</sup>folicular fluid meiosis activating sterol

<sup>5</sup>testis meiosis activating sterol

reaktion die Reproduktionsfähigkeit von Tieren und Menschen beeinflusst werden. Auf diesem Gebiet steht die Erforschung hinsichtlich dieser Funktion und Steuerung von CYP51 allerdings noch am Anfang [97, 98].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass CYP51 eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Steroiden hat. In vielen Spezies ist jedoch noch nicht klar, welche Funktion die durch CYP51 demethylierten Produkte haben. Aus diesem Grund sind noch viele weitere Anwendungsgebiete von potentiellen und potenten CYP51-Inhibitoren zu erwarten [99].

## 14.2 Mechanismus der 14 $\alpha$ -Demethylierung

Durch die katalytische Reaktion der CYP51 wird das C-Atom 32 vom C-Atom 14 des Sterolgerüsts entfernt. Hierfür benötigt das CYP51 wie alle anderen mikrosomalen Cytochrome NADPH als Reduktionsmittel, um die fest gebundene Methylgruppe oxidativ entfernen zu können [100, 101]. Damit gehört es zu den Klasse II<sup>6</sup>-Cytochromen.

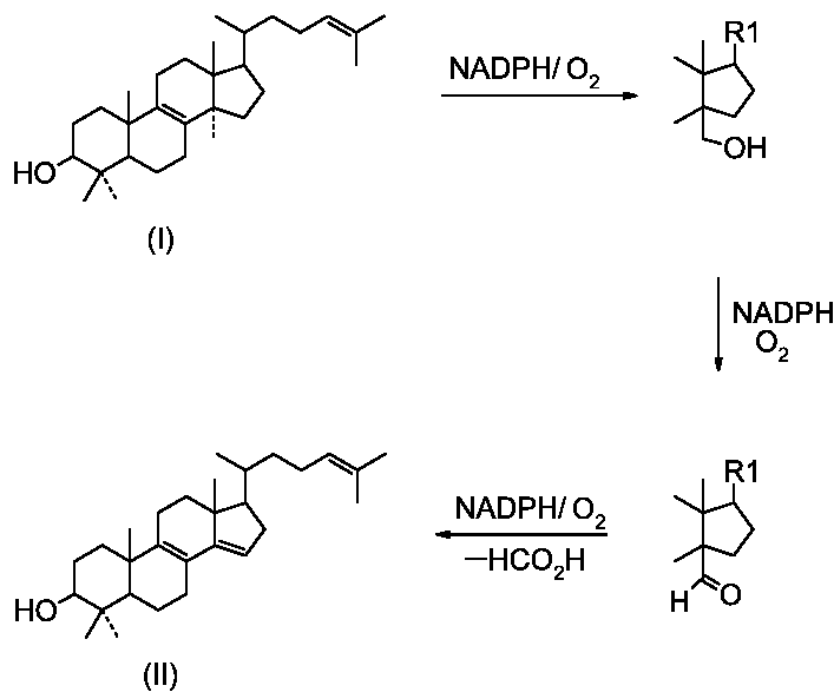
Diese Reaktion stellt den ersten Schritt der Cholesterol- bzw. Ergosterol-Biosynthese nach der Bildung des Steroidgrundgerüsts aus Squalen dar (s. Abb. 13.2) [77]. Die genaue Aufklärung der katalysierten Reaktion erweist sich als sehr komplex und wird in der Literatur kontrovers diskutiert [102, 103]. Der im Folgenden vorgestellte Mechanismus entspricht dem mit den derzeitigen Methoden aktuellen Wissensstand [77].

So ist allgemein akzeptiert, dass die Methylgruppe am C-32 als Ameisensäure abgespalten wird [104]. Dabei wird Lanosterol über die Metaboliten 32-Hydroxy- [105] und 32-Oxo-lanosterol [106, 107] in 4,4-Dimethyl-cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol überführt. Daraus ist schlüssig, dass für die oxidative Abspaltung der Methylgruppe drei Monooxygenase-Zyklen benötigt werden. Die beschriebenen Intermediate beim Umsatz von Lanosterol können nicht detektiert werden. Es wird daher davon ausgegangen, dass alle drei Oxidationsschritte direkt nacheinander stattfinden, ohne die Metaboliten aus dem Enzym zu entlassen. Dafür spricht auch die in der Literatur beschriebene erhöhte Affinität der Metabolite zur CYP51 im Vergleich zum Substrat Lanosterol [77, 106].

Die ersten beiden Oxidationen können wie in Abb. 14.4 gezeigt als typische Monooxy-

---

<sup>6</sup>Es gibt insgesamt vier unterschiedliche Klassen von Cytochromen, die sich durch das Reduktionsmittel und oder ihr Vorkommen in bestimmten Zellorganellen unterscheiden. Dabei werden in die Klasse II alle mikrosomalen, membranständigen, NADPH abhängigen Cytochrome eingeteilt. Eine genauere Beschreibung der Klassen findet man in folgender Literatur [1]

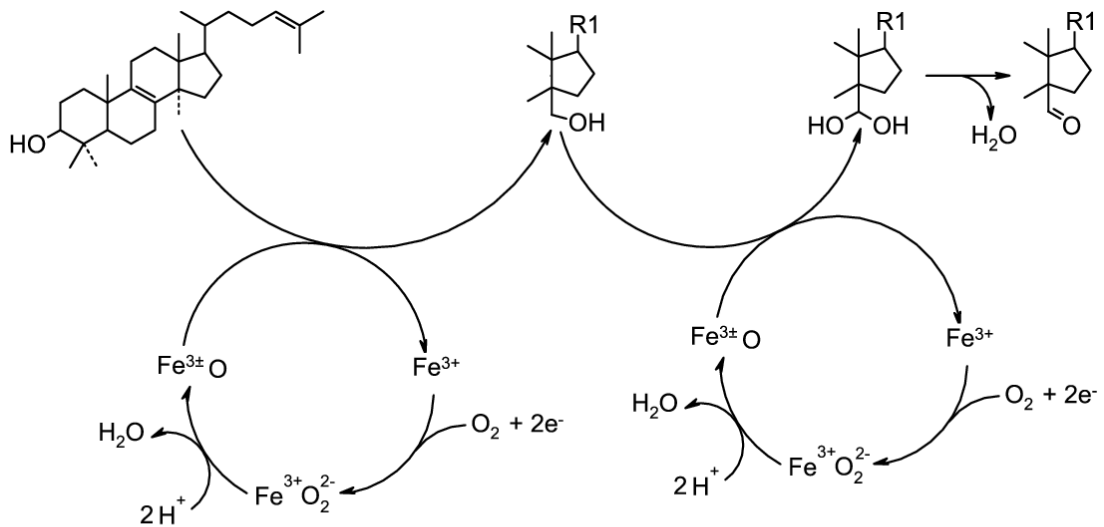


**Abbildung 14.3:** Der durch die CYP51 katalysierte Mechanismus in einer allgemeinen Darstellung. (I) kennzeichnet Lanosterol als Edukt und (II) stellt 4,4-Dimethyl-cholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol als Produkt der Reaktion dar. Des Weiteren werden 32-Hydroxy- und 32-Oxo-lanosterol gezeigt.

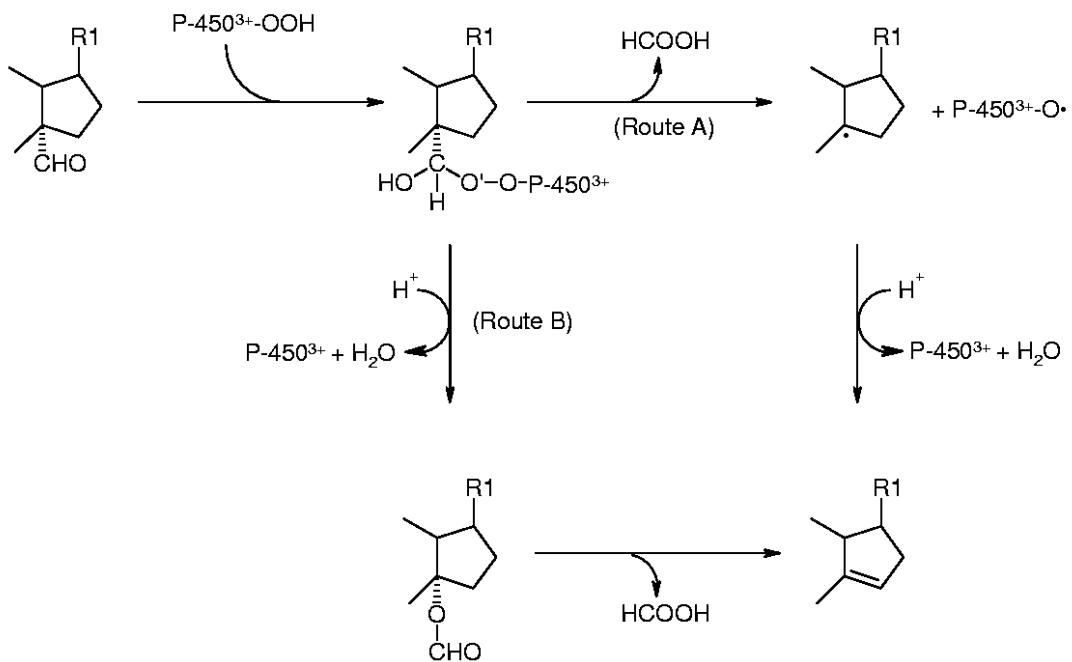
genasereaktionen beschrieben werden. Im ersten Schritt wird Lanosterol zu 32-Hydroxy-lanosterol umgesetzt. Der P-450-Produktkomplex des ersten Schrittes wird daraufhin sofort zu 32,32-Dihydroxy-lanosterol oxidiert. Dabei werden 2 mol Sauerstoff und 2 mol NADPH verbraucht (s. Abb. 14.3). Das geminale Diol spaltet sofort nach der Reaktion Wasser ab und wird zu 32-Oxolanosterol (s. Abb. 14.4) .

Der dritte Schritt, bei dem durch einen weiteren Angriff eines aktivierten Sauerstoffs die C-C Bindung zwischen C-14 und C-32 gebrochen wird, ist noch nicht komplett aufgeklärt. Bewiesen ist, dass hierbei die Methylgruppe und ein Wasserstoffatom des C-15 als Ameisensäure abgespalten werden und dabei das Endprodukt 4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol entsteht [77, 108–110]. Somit kann es sich nicht um eine typische Monooxygenase-Reaktion handeln, da hierbei Kohlensäure als Abgangsgruppe entstehen müsste.

Bei Ameisensäure als Abgangsgruppe sind zwei unterschiedliche Mechanismen vorstellbar. Beiden ist gemein, dass zuerst ein peroxidischer Übergangszustand gebildet werden muss. Danach können theoretisch unterschiedliche Wege eingeschlagen wer-



**Abbildung 14.4:** Darstellung des ersten und zweiten Reaktionsschrittes. Darunter ist auch ein vereinfachter Redoxcyclus des Häm-Eisens dargestellt.



**Abbildung 14.5:** Bruch der C-C Bindung zwischen C-14 und C-32.

den.

Der eine Mechanismus verläuft über einen radikalischen Zerfall des Peroxids unter Abspaltung der Ameisensäure (s. Abb. 14.5 Route A). Dabei entstehen zwei Radikale, die durch Abspaltung von Wasser zum Produkt und zum freien Enzym umgelagert werden können.

Der zweite Mechanismus ist analog zu einer Baeyer-Villiger Reaktion. Dabei wird im ersten Schritt die peroxidische Übergangsstruktur in den entsprechenden Ameisensäureester umgelagert, der dann unter Bildung der Doppelbindung am Steroid in das Produkt und die freie Ameisensäure zerfällt (s. Abb. 14.5 Route B).

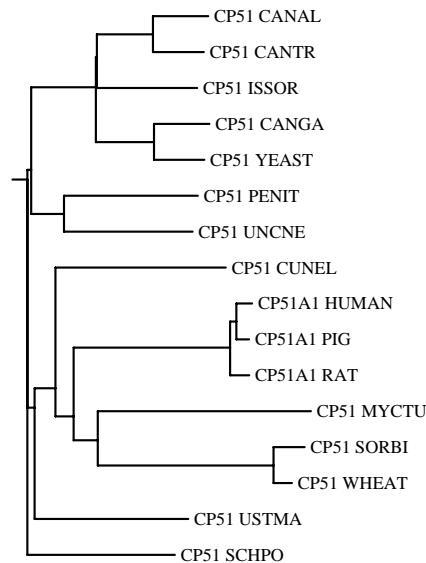
Beide Mechanismen konnten in unterschiedlichen Modellsystemen nachgewiesen werden, so dass derzeit eine Zuordnung nicht möglich ist [77].

## 14.3 Struktur des Enzyms und Charakterisierung des aktiven Zentrums der CYP51

Die Struktur eines Proteins ist sehr stark von seiner Funktion abhängig. Dabei wird die Struktur durch evolutionäre Prozesse ständig weiter entwickelt, um auf Veränderungen in der Proteinumgebung reagieren zu können.

### 14.3.1 Primärstruktur

Wie schon im Abschnitt 14.1 gezeigt ist die Primärstruktur der einzelnen CYP51 sehr heterogen. Dies kann durch die unterschiedliche Entwicklung der Spezies erklärt werden. Der in Abb. 14.6 dargestellte phylogenetische Baum zeigt die Ähnlichkeit der CYP51-Sequenzen zwischen den einzelnen Spezies. In diesem Diagramm wurden die Proteinsequenzen nach ihrer Sequenzidentität geordnet. Man erkennt einzelne Cluster innerhalb des Baumes. Die obersten fünf Sequenzen bilden den Cluster der Hefen. Der Weizen und eine Hirseart (SORBI) repräsentieren den Cluster der Pflanzen und die Sequenzen von Mensch, Ratte und Schwein bilden den Cluster der Tiere. Die Sequenz des *Mycobacterium tuberculosis* ist hier der einzige bakterielle Vertreter der CYP51. Die restlichen Sequenzen gehören zu den Schleim- (USTMA), Spalt- (SCHPO, CUNEL) oder zu den Schimmelpilzen (PENIT, UNCNE).



**Abbildung 14.6:** Phylogenetischer Baum der bekannten CYP51 Protein Sequenzen (erstellt mit ClustalW). Neben der Sequenz *Candida albicans* (CANAL), der menschlichen (HUMAN) und der Sequenz des *Mycobacterium tuberculosis* (MYCTU) sind noch einige weitere Pilze [*Candida tropicalis* (CANTR), *Candida krusei* (ISSOR), *Candida glabrata* (CANGA), *Saccaromyces cerevisiae* (YEAST), *Penicillium italicum* (PENIT), *Uncinula necator* (UNCNE), *Cunninghamella elegans* (CUNEL), *Ustilago maydis* (USTMA), *Schizosaccharomyces pombe* (SCHPO)], Tiere [*Sus scrofa* (PIG), *Rattus norvegicus* (RAT)] und Pflanzen [*Triticum aestivum* (WHEAT), *Sorghum bicolor* (SORBI)] enthalten.

Die Länge der Sequenz und damit das Gewicht von CYP51-Enzymen können stark variieren. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass CYP51 je nach Spezies als Membran-gebundenes oder auch als im Cytosol gelöstes Enzym vorliegt.

Da CYP51 des *Mycobacterium tuberculosis* (CYP51MTB) ein Cytosol-lösliches Enzym ist, hat es eine relativ kurze Sequenz mit 451 Aminosäuren und ist mit 50877 Da ein eher leichter Vertreter dieser CYP51-Familie. Im Gegensatz dazu gehören die humane und die CYP51 aus *C. albicans* als Membran-gebundene Enzyme zu den schweren Vertretern der CYP51-Familie. So ist die Sequenz des humanen CYP51 503 Aminosäuren lang und 56805 Da. schwer; die Sequenz des *C. albicans* beträgt sogar 528 Aminosäuren und ist 60675 Da. schwer. Die unterschiedlichen Längen der beiden Enzyme lassen sich auf die Anpassung an die unterschiedlichen Gegebenheiten der jeweiligen Spezies zurückführen. Zum Beispiel ist die Zellmembran von Mensch und Pilz sehr un-



terschiedlich aufgebaut und damit sind auch die Membrananker der beiden Enzyme sehr verschieden. Die Unterschiede der Sequenzen von *Mycobacterium tuberculosis*, *C. albicans* und der humanen CYP51 werden im Kapitel 15 noch genauer beschrieben.

```
MSAVALPRVS GGHDEHGHLE EFRTDPIGLM QRVRDECGDV GTFQLAGKQV VLLSGSHANE 60
FFFRAGDDDL DQAKAYPFMT PIFGEGVVD ASPERRKEML HNAALRGEQM KGHAATIEDQ 120
VRRMIADWGE AGEIDLLDFE AELTIYTSSA CLIGKKFRDQ LDGRFAKLYH ELERGTDPLA 180
YVDPYLPIS FRRRDEARNG LVALVADIMN GRIANPPTDK SDRDMLDVLI AVKAETGTPR 240
FSADEITGMF ISMMFAGHHT SSGTASWTLI ELMRHRDAYA AVIDELDELY GDGRSVSFHA 300
LRQIPQLENV LKETLRLHPP LIILMRVAKG EFEVQGHRIH EGDVAASPA ISNRIPEDFP 360
DPHDFVPARY EQPRQEDLLN RWTWIPFGAG RHRCVGAFA IMQIKAIKFSV LLREYEFEMA 420
QPPESYRNDH SKMNVQLAQP ACVRYRRRTG V 451
```

**Abbildung 14.7:** Sequenz des CYP51 aus *Mycobacterium tuberculosis*. Die fett gedruckten Aminosäuren kennzeichnen wichtige Motive oder haben funktionelle Aufgaben.

### 14.3.2 Sekundär- und Tertiärstruktur

Die Sekundär- und Tertiärstruktur der CYP51 ist prinzipiell sehr ähnlich zu den Strukturen der bisher bekannten Cytochrom P-450-Enzyme. Aufgrund dieser hohen strukturellen Ähnlichkeit der P-450, die sich aus der allen Typen gleichen Funktion als Monooxygenase ergibt, lassen sich die inzwischen aufgeklärten Strukturen unterschiedlicher Vertreter zum Vergleich und als Grundlage für ein Proteinmodell heranziehen. Deshalb wird die Kristallstruktur des CYP51MTB mit anderen P-450-Kristallstrukturen verglichen, um einen besseren Einblick in die Funktion zu bekommen und eventuelle Eigenheiten der CYP51-Familie erkennen zu können.

Wie alle bisher bekannten Kristallstrukturen werden auch in der einzigen bisher bekannten Kristallstruktur der CYP51 alle 12  $\alpha$ -Helices und ein Großteil der 5  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen gefunden.

Die Helices werden der Reihe nach mit den Buchstaben A-L benannt. Einige der Helices bilden variable Nebenhelices aus; diese Helices werden dann mit einem Apostroph markiert. Bekanntestes Beispiel für eine solche Nebenhelix ist die B'-Helix. Die B'-Helix ist der am wenigsten konservierte Bereich aller Cytochrome und spielt anscheinend eine essentielle Rolle in der Substraterkennung. Daneben sind noch die Nebenhelices A', F', K', J' und die K'' als  $\alpha$ -Helices bekannt. Diese sind allerdings bisher fast ausschließlich in den bakteriellen P-450-Kristallstrukturen von P-450<sub>BM3</sub>, P-450<sub>Terp</sub> und P-450<sub>Cam</sub> entdeckt worden [111–113]. Neu sind die Helices F''' und K''', die zum ersten Mal in der

Kristallstruktur der CYP51MTB aufgeklärt wurden. Bei diesen Helices handelt es sich um  $3_{10}$ -Helices<sup>7</sup>. Alle diese mit Apostrophen bezeichneten Helices kommen in den unterschiedlichen Kristallstrukturen in anderer Ausprägung vor, so dass deren Funktion noch nicht ganz geklärt werden konnte [114].

Bei den  $\beta$ -Faltblättern werden die einzelnen Sekundärstrukturen von 1 bis 5 nummeriert, deren einzelne Stränge wiederum von 1 bis x gekennzeichnet werden<sup>8</sup>. Die  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen sind allerdings nicht so stabil wie Helix-Strukturen und variieren daher in ihrer Größe von Kristallstruktur zu Kristallstruktur. In Helix-Strukturen jedoch sind Größe und Ausdehnung sehr gut konserviert und unterscheiden sich meist nur in ihrer relativen Lage zueinander oder in der Länge um ein bis zwei Windungen zwischen den bekannten Strukturen [71, 115].

Die Tertiärstruktur der Cytochrome P-450 setzt sich aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne zusammen, die durch das Häm getrennt werden (s. Abb. 14.8). Die kleinere  $\beta$ -Domäne wird aus den A- und B-Helices und aus den  $\beta$ -Faltblättern 1 und 2 gebildet, die zum Aufbau der aktiven Tasche beitragen [116].

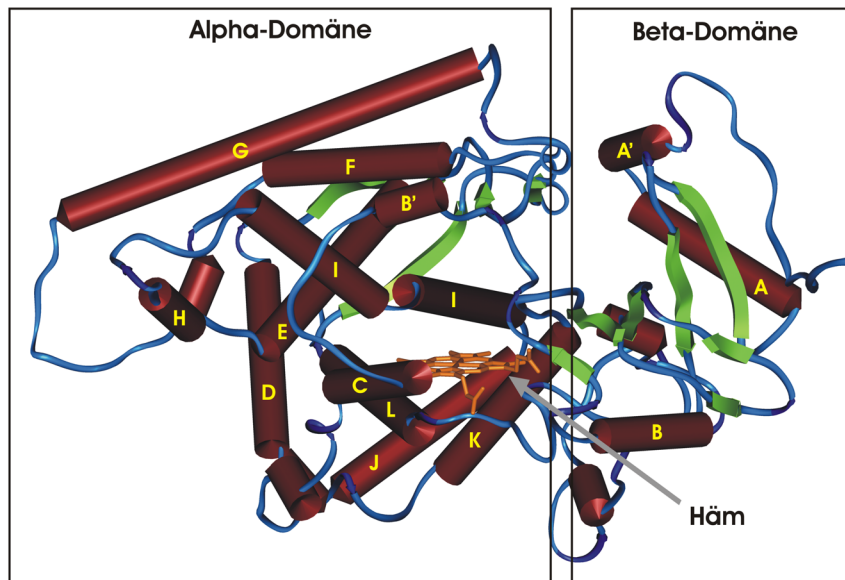
Die größere  $\alpha$ -Domäne bildet in ihrem Zentrum ein Helixbündel aus den vier  $\alpha$ -Helices D, E, I und L. Die  $\alpha$ -Helices K und L bewirken die Stabilisierung dieses Bündels, wahrscheinlich dient hierfür die konservierte ExxR-Struktur der K-Helix. Des Weiteren sind in dieser Domäne die B', C-, F- und G-Helix sowie die  $\beta$ -Faltblattstrukturen 3, 4 und 5 enthalten. Teile dieser Strukturen bilden die aktive Tasche bzw. die Reduktasebindungsstelle [111, 116].

Wie in allen P-450 stellen die zentrale I- und L-Helix die längsten Helices dar. Zwischen diesen Helices liegt das katalytisch wirkende Häm; es wird mit einer Schwefel-Eisen-Bindung über ein Cystein am N-terminalen Ende der L-Helix am Protein befestigt. Da das aktive Zentrum auf der anderen Seite des Häms liegt, wird die Seite der L-Helix meist als Unterseite definiert (siehe auch Abb. 14.9). Daraus folgt, dass die I-Helix einen großen Teil des aktiven Zentrums bildet, da sie über dem Häm liegt. Die Strukturen unterhalb des Häms sind in der Regel die am besten konservierten Bereiche, da sie zur

---

<sup>7</sup>Bei einer  $3_{10}$  Helix wird eine Windung durch das Proteinrückgrat von drei Aminosäuren gebildet. Dadurch sind die Donor- und Akzeptor-Atome der Helix-bildenden H-Brücken nur 10 Atome voneinander entfernt. Durch diese engeren Windungen der  $3_{10}$ -Helix im Vergleich zur  $\alpha$ -Helix ist die  $3_{10}$ -Helix deutlich instabiler und kommt daher meist nur in Form einer einzelnen Helix Windung, eines sog. Turns vor.

<sup>8</sup>So wäre der Name des ersten Stranges im zweiten  $\beta$ -Faltblatt demnach 2-1. Zwei steht für die Faltblatt Domäne 2 und eins kennzeichnet den ersten Strang; beide Ziffern werden durch einen Bindestrich getrennt. Alternativ ist auch die Bezeichnung  $\beta$ 1-2, um explizit auf ein  $\beta$ -Faltblatt hinzuweisen, in Gebrauch.



**Abbildung 14.8:** Struktur der CYP51MTB. Die  $\alpha$ -Helices sind als dunkelrote Zylinder mit ihren jeweiligen Bezeichnungen dargestellt.  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind ohne nähere Bezeichnung als hellgrüne Bänder dargestellt.

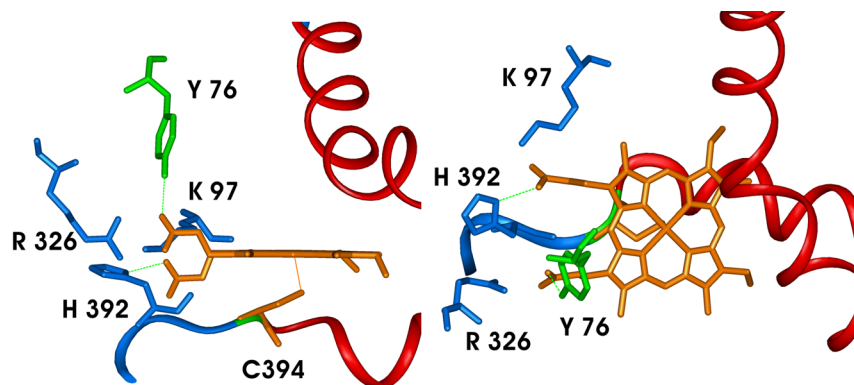
Befestigung des Häms und anscheinend auch zur Interaktion mit dem Reduktasesystem dienen. Hierzu gehören die sogenannte Mäander-Region und die Cysteintasche.

Die Cysteintasche ist die am besten konservierte Sequenz aller P-450-Enzyme, gut erkennbar an dem typischen Sequenzmotiv FGxGxxCxG. Dabei dient das Cystein als fünfter Ligand des Häms. Die Mäander Region ist weniger gut konserviert. Ein Mäander ist eine Folge mehrerer Turns<sup>9</sup> hintereinander. Bei den Cytochrom-P-450-Enzymen liegt diese Sequenz kurz vor der Cysteintasche und ist in der Regel an einer typischen Aminosäurenabfolge zu erkennen. Diese beginnt mit einer aromatischen Aminosäure, gefolgt von einem Prolin, einer sauren und zum Schluß einer basischen Aminosäure.

Neben dem Cystein als fünften Liganden wird das Häm über seine Propionat-Seitenketten durch mehrere basische Aminosäuren fixiert. Bei der Kristallstruktur CYP51MTB übernehmen diese Funktion die Aminosäuren Lysin 97, Arginin 326, Histidin 392 und daneben noch das Tyrosin 76, das mit seiner OH-Gruppe eine H-Brücke zu einer der beiden Propionatgruppen bildet (s. Abb. 14.9).

Neben den Häm-bindenden Aminosäuren gibt es konservierte Bereiche, die für die

<sup>9</sup>Ein Turn ist eine enge Windung der Proteinkette mit einer bestimmten Sekundärstruktur. Häufig trifft man diese Strukturen an, wenn unterschiedliche Sekundärstrukturen in kurzer Abfolge ineinander übergehen.



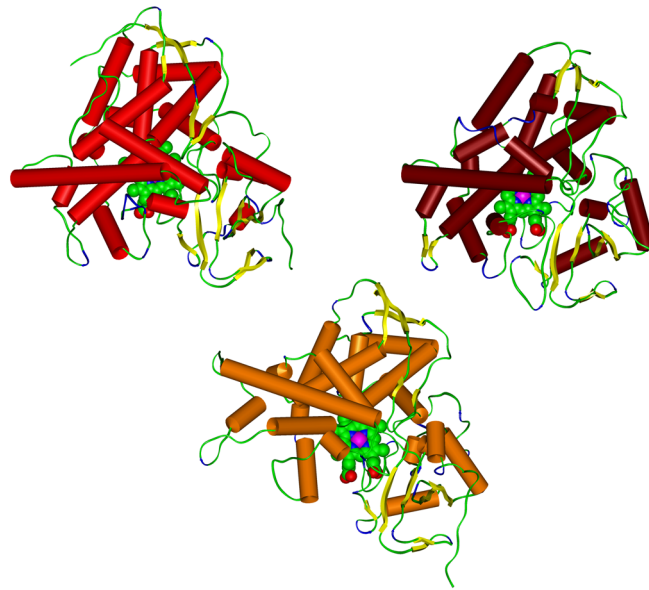
**Abbildung 14.9:** Befestigung des Häm im aktiven Zentrum des Cyp51MTB. In Orange sind das Häm und der fünfte Ligand, Cystein 394, gezeigt. Das rote Proteinrückgrat ist Teil der I- bzw. L-Helix. Blau sind die basischen Aminosäuren Lysin 97, Arginin 326 und Histidin 392 und grün ist das Tyrosin 76 dargestellt. Gestrichelte grüne Linien symbolisieren H-Brücken.

Funktion des Cytochroms wichtig sind. So ist die I-Helix sehr gut konserviert, besonders ist hierbei das **GxHT**-Motiv im Zentrum der Helix zu nennen. Das invariante Threonin dient wahrscheinlich als Bindungspartner für Sauerstoff, während das Histidin als Protonenlieferant fungiert. In der Nähe dieses Motivs bildet sich auch der in Abbildung 14.13 gezeigte Knick in der I-Helix aus.

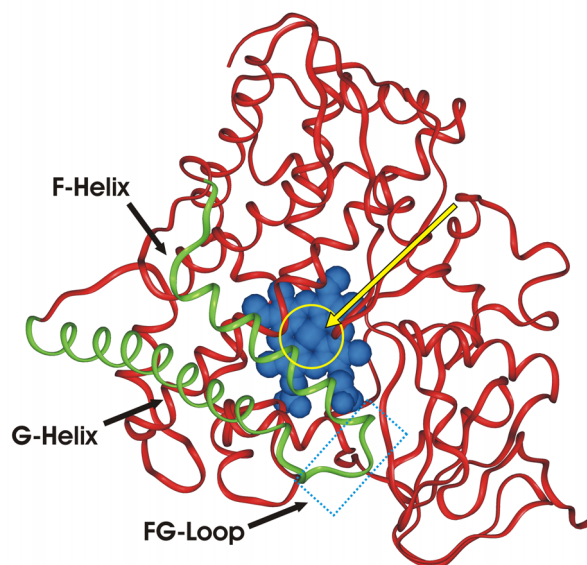
### 14.3.3 Zugang zum aktiven Zentrum einiger P-450-Kristallstrukturen

Da der Aufbau und die einzelnen Strukturelemente der Cytochrome schon sehr ausführlich in der Literatur beschrieben wurden, sollen hier nur die wichtigsten Strukturelemente der P-450-Enzyme und die Unterschiede der CYP51-Kristallstruktur zu den in Abbildung 14.10 gezeigten Kristallstrukturen des P-450<sub>BM3</sub> (CYP102) und des P-450<sub>eryF</sub> (CYP107A1) beschrieben werden [111, 115, 117, 118].

Die Struktur des CYP102 ist aus *Bacillus megaterium* isoliert worden. In diesem Bakterium dient es als Monooxygenase-Enzym für Fettsäuren. Von Interesse bei dieser Struktur ist, dass es sowohl mit als auch ohne Substrat kristallisiert wurde. Daher konnte man feststellen, dass sich F- und G-Helix sowie der FG-Loop in ihrer Lage verändern (s. Abb. 14.11). Die maximale Auslenkung der Strukturen beträgt bis zu 7 Å. Diese Konformationsänderung zwischen der Struktur mit und ohne Substrat war der erste Nachweis für die Beweglichkeit der Substrat-bindenden Regionen der P-450. Dabei wurde der Substratkanal senkrecht über der Hämebene vermutet [119–121].



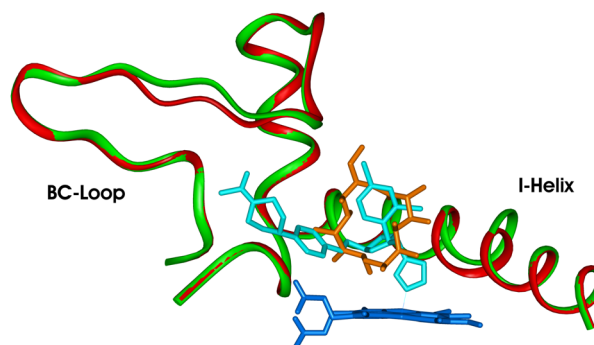
**Abbildung 14.10:** Kristallstrukturen im Vergleich. Oben links CYP102 (rot), rechts CYP107A1 (dunkelrot) und unten Mitte CYP51 (orange). Dabei stellen die Zylinder helix Strukturen dar und die Bänder deuten  $\beta$ -Faltblattstrukturen an



**Abbildung 14.11:** CYP102 Kristallstruktur mit geöffneten Substratkanal. Der gelbe Kreis kennzeichnet den Eingang des Kanals.

Mit Erythromycin hat CYP107A1 als einzige bisher bekannte Struktur ein Substrat in ähnlicher Größe wie das CYP51 mit Lanosterol. Daneben ist mittlerweile auch eine

Struktur des CYP107A1 bekannt, in der Ketoconazol im aktiven Zentrum enthalten ist. Auch hier hatte der Austausch des gebundenen Moleküls Änderungen in der Enzymstruktur zur Folge (s. Abb. 14.12). Allerdings erfolgte die Strukturänderung diesmal in Teilen des BC-Loops und der I-Helix. Außerdem waren die Strukturänderungen mit etwa 2 Å nur sehr gering. Dieses verwundert auch nicht, da das kleinere Erythronolid durch Soaken<sup>10</sup> gegen das Ketoconazol ausgetauscht wurde. In beiden CYP107A1 konnte kein potentieller Substratkanal gefunden werden. Daher wird davon ausgegangen, dass sich die Struktur stärker bewegen muss, um das Substrat oder den Inhibitor wieder zu entlassen [122].



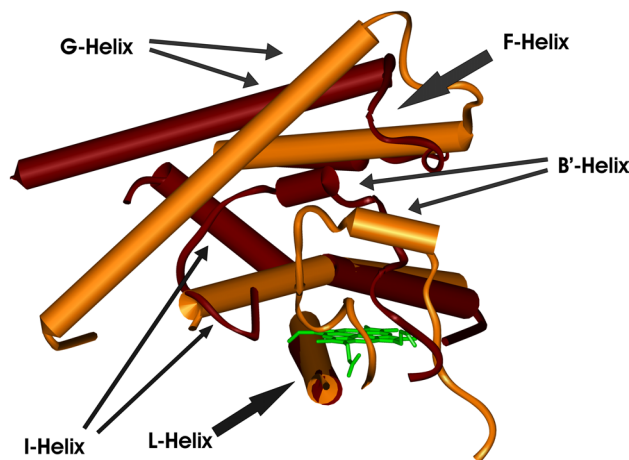
**Abbildung 14.12:** Flexible Bereiche der Cyp107A1 Kristallstrukturen. Das grüne Proteinrückgrat entspricht den Strukturbereichen des Enzyms mit Ketoconazol (cyan) im aktiven Zentrum. Die rote Proteinstruktur des CYP107A1 hat 6-Deoxyerythronolid B (orange) als Ligand im aktiven Zentrum gebunden.

Ein weiteres Indiz für die ausgeprägte Beweglichkeit einiger Struktursegmente der P-450-Enzyme ist der in der Kristallstruktur des CYP51MTB geöffnete Kanal, über dessen Existenz vorher nur theoretisch diskutiert wurde und in Abschnitt 14.3.4 genauer beschrieben wird [71, 123]. Hat der vorher von P-450<sub>BM3</sub> und anderen Kristallstrukturen bekannte Kanal sich senkrecht über dem Häm geöffnet, so öffnet sich dieser Kanal sozusagen seitlich in einem Winkel von 90° am Enzym. Um den neuen Kanal zu öffnen, knickt die I-Helix am N-terminalen Ende um 35° ab; dadurch werden die F- und die G-Helix so verschoben, dass der B-C-Loop<sup>11</sup> den Kanal des CYP51 freigeben kann. In Abbildung 14.13 wird im Vergleich der CYP102- und CYP51-Kristallstrukturen gezeigt,

<sup>10</sup>soaken (engl.) für einweichen oder einsaugen. Dabei wird ein Proteinkristall in seiner Mutterlauge einem anderen Liganden ausgesetzt, der den ursprünglich gebundenen Liganden aus der aktiven Tasche verdrängt. So kann ein Kristall mit einem weiteren Liganden im aktiven Zentrum vermessen werden.

<sup>11</sup>Ein Loop ist die Sequenz zwischen zwei Sekundärstrukturen, die keine bestimmte Struktur besitzt.

wie durch die Lageänderung der I-Helix sich die Lage der B'-Helix und damit auch die Lage des B-C-Loops links und rechts der B'-Helix ändert [71, 115]. Diese Lageänderung des B-C-Loops führt nun dazu, dass dieser wie ein Tor den in der CYP51MTB beschriebenen Kanal öffnet. In Abbildung 14.13 ist der Kanal als dunkelrotes Proteinrückgrat links und rechts der B'-Helix dargestellt, besser zu sehen ist die Kanalöffnung in Abbildung 14.14. Dort entspricht der Kanal dem roten Proteinrückgratbereich [124]. Die rot eingerahmten Loopbereiche entsprechen dabei den Flügeln einer Tür, die den Kanal öffnen oder schließen können.



**Abbildung 14.13:** Strukturvergleich zwischen CYP51 (dunkelrot) und CYP102 (orange). Dargestellt sind die Helices B' mit BC-Loop, F und G mit FG-Loop, I und L der jeweiligen Strukturen. Das Häm ist grün dargestellt. Helices werden durch Zylinder und Loop-Bereiche durch Bänder in der Farbe der jeweiligen Kristallstruktur zeigt.

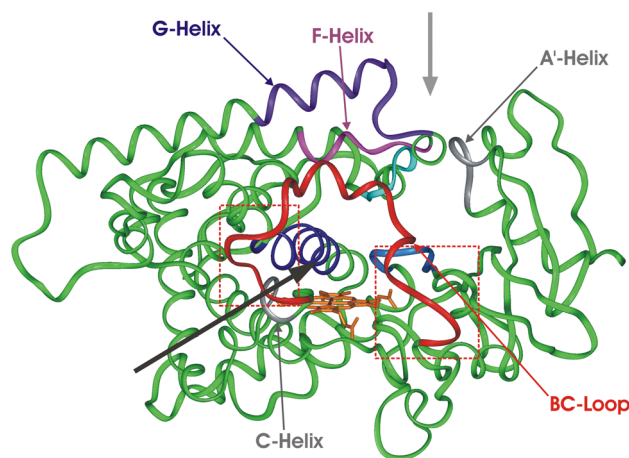
#### 14.3.4 Das aktive Zentrum der CYP51

Anfang der 90er Jahre nach der Veröffentlichung der ersten P-450-Kristallstrukturen wurden sechs Substraterkennungsbereiche (SRS= substrate recognition sites) in P-450 unterschiedlicher Spezies charakterisiert, die die aktive Tasche um das Häm aller P-450 definieren. Wie in Abbildung 14.14 dargestellt erstreckt sich die erste SRS über den B-C-Loop; die zweite SRS entspricht dem Bereich des C-Terminus der F-Helix; in der dritten SRS ist das N-terminale Ende der G-Helix enthalten; der vierte SRS Bereich

In der Regel werden zur Beschreibung des Loops die beiden Sekundärstrukturen genannt, zwischen denen dieser liegt. Hier liegt er zwischen den Helices B und C.

entspricht dem mittleren Bereich der I-Helix; die fünfte SRS erstreckt sich auf das N-terminale Ende des  $\beta$ 1-4; die sechste SRS enthält den Loop zwischen  $\beta$ 4-1 und  $\beta$ 4-2. Durch die hohe Substratvielfalt der einzelnen P-450 ergibt sich eine hohe Variabilität der Sequenz im Bereich der SRS [115, 123, 125]. Vergleicht man nun die stark beweglichen Teile der P-450 mit den SRS-Bereichen, so fällt auf, dass diese fast deckungsgleich sind.

Diese SRS-Bereiche werden in ähnlicher Ausbreitung auch in CYP51 gefunden. Sie konnten aber erst in Frühjahr 2001 genauer charakterisiert werden (s. Kapitel 15.2), da erst jetzt eine Kristallstruktur der CYP51 zur Verfügung stand.



**Abbildung 14.14:** Kristallstruktur der CYP51MTB. Dargestellt ist das Proteinrückgrat. Die bisher definierten SRS sind dabei farblich hervorgehoben. So entspricht rot dem ersten, purpur dem zweiten, violett dem dritten, blau dem vierten, hellblau dem fünften und cyan dem sechsten SRS. Graue Strukturbereiche stellen die neuen SRS des Cyp51MTB dar. Der dunkelgraue Pfeil markiert den bei CYP51 offenen Substratkanal, während der hellgraue Pfeil den Substratkanal aus CYP102 markiert (s. Abb. 14.11). Dabei dient der B-C-Loop der Cyp51 als Pforte zum aktiven Zentrum. Rot eingerahmte Teile des B-C-Loop sind nicht mehr am aktiven Zentrum beteiligt.

Es ist auffällig, dass sich bei der Kristallstruktur des CYP51MTB durch die Öffnung des Kanals auch eine Veränderung in den vor der Ermittlung der Kristallstruktur definierten SRS beobachten lässt. Durch die veränderte Lage der F- und G-Helices sind die Aminosäurereste auf diesen Sekundärstrukturen nur noch bedingt in der Lage, einen Teil des aktiven Zentrums zu bilden, so dass sich die SRS-Bereiche 2 und 3 in der Kristallstruktur verschieben. Der Bereich des F-G-Loops interagiert mit der A'-Helix (F22-P26, s. Abb. 14.14, graues Ribband rechts oben). Daraus folgt, dass die SRS2 weiter in die Mitte der F-Helix verschoben wird. Die bisher als SRS3 definierte Region (s. Abb. 14.14,

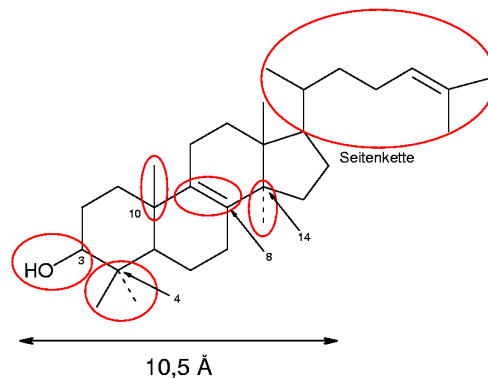


violett) ist gar nicht mehr am aktiven Zentrum beteiligt. Auch die SRS1 ( der BC-Loop) ist durch die Öffnung des Kanals, wie in Abb. 14.14 durch die rot gestrichelten rechteckigen Markierungen gezeigt wird, teilweise außerhalb des aktiven Zentrum. Dafür kommen Aminosäuren der Helix C (K97-H101) an die Oberfläche des aktiven Zentrums und könnten dort Wechselwirkungen mit dem Substrat bzw. Inhibitoren ausbilden.

## 14.4 Substraterkennung der CYP51

Noch bevor Daten über die Struktur von P-450 Enzymen bekannt waren, hatte man schon konkrete Vorstellungen über das aktive Zentrum der CYP51. Diese hat man durch Untersuchung der Substraterkennung erhalten. Dabei wurde die Umsetzung unterschiedlicher Substrate getestet.

Bei der CYP51 wurde hierfür das Lanosterol in allen wichtigen Strukturelementen variiert. So konnten sehr schnell die für die Substraterkennung wichtigen Bereiche des Substratmoleküls beschrieben werden.



**Abbildung 14.15:** Struktur des Lanosterols mit den für die Substraterkennung entscheidenden Substrukturen. Die sechs markierten Bereiche von links nach rechts: ganz links die OH-Gruppe in  $\beta$ -Stellung des C-Atom 3, dann die beiden  $\text{CH}_3$ -Gruppen an C-Atom 4, eine weitere  $\text{CH}_3$ -Gruppen in  $\beta$ -Stellung am C-Atom 10, dann die Doppelbindung zwischen C 8 und C 9 und die gesamte Seitenkette des Steroids. Auch die  $\text{CH}_3$ -Gruppe an C 14 ist als entscheidende Stelle des Steroids markiert.

Generell können alle CYP51-Enzyme nur Lanosterol, 24,25-Dihydrolanosterol (DHL), 24-Methyldihydrolanosterol (MDHL) und Obtusifoliol umsetzen. Dabei werden von unterschiedlichen Spezies ein oder mehrere Substrate bevorzugt (s. Abb. 14.1). Hefen setzen Lanosterol und MDHL etwa gleich gut um. DHL wird von Hefe nur halb so

gut umgesetzt. Tierische CYP51 setzt bevorzugt Lanosterol, erst dann DHL mit der niedrigsten Effizienz um. Das zeigt, dass trotz der geringen Verwandtschaft der beiden Spezies das CYP51 der beiden sehr ähnlich aufgebaut ist, sich aber in bestimmten Regionen unterscheiden muss [126].

Es ist bekannt, dass die OH-Gruppe am Atom 3 des Steroidgerüsts in  $\beta$ -Stellung und die Doppelbindung zwischen den Atomen 8 und 9 liegen muß, damit Lanosterol-Derivate als Substrat erkannt werden [127, 128].

An Position 4 des Steroidgerüsts muss mindestens eine Methylgruppe erhalten bleiben, damit das Steroid noch als Substrat für die CYP51 dienen kann.

Die  $\beta$ -Methylgruppe an C10 des Steroidgerüsts darf nicht verändert werden, da sonst das Steroid nicht als Substrat erkannt wird. Z. B. kann Cycloartenol nicht als Substrat der CYP51 dienen und muss in Pflanzen erst zu Obtusifoliol umgesetzt werden [96].

Von entscheidender Bedeutung ist die Länge der Seitenkette an C17. Schon die Entfernung einer Methylgruppe hat zur Folge, dass die Affinität des Steroids sinkt. Daraus folgt, dass die Seitenkette die genaue Positionierung der 14 $\alpha$ -Methylgruppe über dem Hämeisen bestimmt [129–131].

Daneben wurde gezeigt, dass Substituenten an den Positionen 7, 14 und 15, die mit dem Hämeisen interagieren können (z.B. 7-oxo-Lanosterol), das Enzym inhibieren [132–135].

## 14.5 Inhibitor-Häm-Bindung

Wie bei der Substratbindung ist auch zur Bindung der Inhibitoren im aktiven Zentrum der CYP51 noch sehr wenig bekannt. Die wichtigste Wechselwirkung der Inhibitoren ist eine koordinative Bindung eines Imidazolstickstoffs mit dem zentralen Eisen des Hämsystems. Dieses kann sehr gut UV-spektroskopisch nachgewiesen werden, da durch den Angriff des Inhibitors eine Rotverschiebung der Soret-Bande<sup>12</sup> verursacht wird, die dem Austausch von Wasser gegen den jeweiligen Liganden entspricht.

Das bedeutet, dass sich im unbesetzten aktiven Zentrum Wasser als sechster Ligand am aktiven Zentrum anlagert. Prinzipiell sind nun zwei Möglichkeiten der Ligandenbindung denkbar [137, 138].

---

<sup>12</sup>Schon 1883 entdeckte Soret eine intensive Absorptionsbande bei ca. 400 nm für den im Blut enthaltenen Farbstoff. Später konnte diese Bande eindeutig dem Porphyrin-Komplex zugeordnet werden [136].

**Typ-I-Liganden** füllen das aktive Zentrum in der Nähe des Häms. Dadurch wird das Wasser aus seiner Koordination gedrängt, ohne dass der Ligand mit dem Häm wechselwirkt. Das ist an einer Blauverschiebung des UV-Spektrums zu erkennen. Diese erfolgt, weil der Eisen-Komplex von seinem ursprünglichen low-spin- in den energiereicheren high-spin-Komplex übergeht. In der Regel fallen unter diesen Liganden-Typ alle von dem entsprechenden CYP umsetzbaren Substrate [1, 87].

Bei den **Typ-II-Liganden** wird wie zu Beginn dieses Abschnitts erwähnt das Wasser durch einen anderen Liganden ausgetauscht. Dabei kommt es je nach Ligand zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Rotverschiebung [1, 87]. Diese Art von Liganden sind in der Regel Enzym-Inhibitoren, da Liganden mit hoher Feldstärke das aktive Zentrum der P-450 sehr gut blockieren.

Neben diesen beiden Ligand-Typen wird noch eine dritte Art von Liganden beschrieben. Diese werden als **reverse-Typ-I-** oder **modifizierte Typ-II-Liganden** bezeichnet. Sie rufen keine Verschiebung der Soret-Bande im UV-Spektrum der P-450 hervor, die auf zwei mögliche Bindungssituationen zurückgeführt werden können. Eine Möglichkeit sind Liganden, die das aktive Zentrum besetzen, ohne das Wasser des Hämeisens zu entfernen. Eine andere Möglichkeit sind Liganden, die zwar das Wasser des Hämeisens abstreifen können, aber eine ähnliche Wechselwirkung wie das Wasser mit dem Häm eingehen [87].

Für das CYP51 sind bisher nur Typ-II-Inhibitoren bekannt. In den in Abschnitt 14.3.2 beschriebenen Kristallstrukturen des CYP51MTB sind 4-Phenylimidazol bzw. Fluconazol als Inhibitoren im aktiven Zentrum enthalten. Da beide Moleküle sehr klein sind, können sie nur mit wenigen Aminosäuren wechselwirken.

Mit dem 4-Phenylimidazol interagiert ausschließlich die Seitenkette des Histidin 259. Das Histidin bildet eine H-Brücke zum zweiten N-Atom des Imidazols. Beim Fluconazol kann der Fluorophenyl-Rest mit den aromatischen Seitenketten der Phenylalanine 83 und 255 Wechselwirkungen eingehen. Ansonsten können keine weiteren Aminosäuren mit den Inhibitoren wechselwirken, da diese zu weit von den Inhibitoren entfernt liegen [71].

## 14.6 Resistenzentwicklung durch Mutation der CYP51

Durch die Aufklärung der Struktur von Cyp51MTB und damit auch des aktiven Zentrums erhoffte man genauere Kenntnis über die Resistenzentwicklung einiger Spezies, vor allem von Pilzen wie *Candida albicans* gegenüber Azolen zu erhalten.

Sehr früh stellte sich jedoch heraus, dass nicht die Mutation der CYP51 der Hauptmechanismus der Resistenz ist, sondern dass viele Spezies über ein ganzes Arsenal unterschiedlicher anderer Resistenzmechanismen verfügen. Mittlerweile sind vier unterschiedliche Mechanismen der Resistenzentwicklung bei verschiedenen Spezies bekannt. Dabei können alle Spezies in der Regel mehr als einen Mechanismus zur Abwehr von Azolen verwenden.

Der Hauptresistenzmechanismus liegt in der aktiven Ausschleusung von Azolen aus den Zellen des Zielorganismus. Bei 85 % aller Resistenz entwickelnden Spezies wird ein solcher Mechanismus bei Anwesenheit von Azolen ausgelöst. Dabei werden in der Regel bei den meisten *Candida*-Arten Effluxpumpen<sup>13</sup> vom Typ der ATP-bindenden Cassette (ABC)-Pumpen verwendet. Man nennt die Gene dieser Effluxpumpen auch *Candida* drug resistance gene family (CDR). Zur Zeit sind sieben Gene dieser Familie bekannt, wobei nur CDR1 und CDR2 mit der Resistenzentwicklung gegen Azole in Verbindung gebracht werden konnten. Eine weitere wichtige Effluxpumpe dieser Familie ist die MDR1 (**M**ultidrug **R**esistance Protein). Sie hat zwar nur ein sehr kleines Spektrum an Transportsubstanzen, aber leider gehört Fluconazol zu dessen bevorzugten Substraten [139–141].

Ein weiterer Resistenzmechanismus vieler Spezies besteht darin, die Konzentration des CYP51 in der Zelle zu erhöhen. Dieser Mechanismus ist allerdings bisher nur bei 35 % aller Resistenzentwicklungen beobachtet worden [139].

Der spektakulärste Resistenzmechanismus wurde ohne Frage bei *S. cerevisiae* entdeckt. Dort konnte bei der Inhibition der CYP51 durch Azole eine Umstellung der Steroidbiosynthese beobachtet werden. Dabei wird das Ergosterol der Membran durch 14 $\alpha$ -Methyl-cholestra-3,6-diol ersetzt. Auf diese Weise kann die Wachstumshemmung durch die Anreicherung von 14 $\alpha$ -Fecosterol umgangen werden. Dieser Mechanismus konnte bisher nur in sehr wenigen Pilzen nachgewiesen werden, unter anderem aber in Isolaten von *C. albicans* aus Proben einiger AIDS-Patienten [139].

---

<sup>13</sup>Effluxpumpen sind Membran-ständige Proteine, die als aktive Transporter bestimmte Moleküle aus Zellen befördern können.

Ein vierter Mechanismus beruht auf Mutationen der CYP51. Er konnte bisher in ca. 65 % aller Resistenz-entwickelnden Pilzstämmen nachgewiesen werden. Bisher kennt man eine ganze Reihe von Mutationen, die zur Resistenz von Pilzen beitragen. Allerdings ist bislang noch nicht geklärt, wie die Mutationen diese Resistenz erzeugen, da die meisten der mutierten Aminosäuren zu weit vom aktiven Zentrum entfernt sind, um einen direkten Einfluss auf die Bindung der Inhibitoren haben zu können. Bei den wenigen Mutationen, bei denen eine direkte Wechselwirkung in Frage kommt, sinkt gleichzeitig auch die Aktivität des Enzyms, da diese Mutationen zumeist die Stellung des Häms beeinflussen. Derartige Mutationen werden daher auch nur äußerst selten beobachtet. So sind bei *C. albicans* nur zwei Mutationen in der Nähe des Häms bekannt (G464S, R467K). Die Änderung dieser Aminosäuren erhöht die Azolresistenz um das 7,5-fache, allerdings haben die Allele auch nur noch ein Viertel ihrer enzymatischen Aktivität [139].

Bisher sind drei Bereiche identifiziert, in denen Mutationen eine Resistenz gegen Azole zur Folge haben. Diese Bereiche liegen bei *C. albicans* in den Sequenzbereichen 105 bis 165, 266 bis 287 und 405 bis 488 [142]. Häufig sind in den isolierten Pilzstämmen nicht nur eine Aminosäure, sondern mehrere in unterschiedlichen Sequenzbereichen mutiert und nur die Kombination dieser Mutationen erzeugt einen resistenten Pilz [143]. Des Weiteren fällt auf, dass die Sequenzbereiche der Mutationen auch den beweglichen Bereichen des Enzyms entsprechen. Daraus ergibt sich, dass durch die Mutationen die Beweglichkeit des Enzyms stark beeinflusst und dadurch die Bindung von Inhibitoren und Substraten verändert wird. Es muss befürchtet werden, dass eine ganze Reihe der bisher als ineffektiv angesehenen Mutationen durch Kombination mit neuen Mutationen allele Strukturen hervorbringen, die ebenfalls gegen Azole nur geringe Sensitivität zeigen.

Doch die Mutation des CYP51 bewirkt neben der Resistenzentwicklung auch immer eine gewisse Verringerung der Enzymaktivität [139, 144]. Deswegen ist es bisher nur in wenigen Ausnahmefällen gelungen, die Resistenzentwicklung durch Mutation der CYP51 zu erklären. Sehr ähnlich sieht die Situation bei allen anderen *Candida*-Arten wie *C. glabrata* und *C. kursei* aus [145, 146].



# Kapitel 15

## Bau der Cytochrom P-450-Modelle

Ausgehend von der Kristallstruktur des CYP51MTB wurden Strukturmodelle der CYP51 von Mensch und *C. albicans* erstellt.

Die Sequenzen der Lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase von *C. albicans* [147] und der humanen CYP51 [148] konnten der SWISS-PROT-Datenbank [149] entnommen werden.

Im nächsten Schritt wurden bestimmte Sequenzabschnitte den unterschiedlichen Sekundärstrukturen zugeordnet. Für diese Aufgabe wurde das Vorhersageprogramm PSIpred verwendet.

### 15.1 Sekundärstruktur-Vorhersagen mit PSIpred

Nach Eingabe der Sequenzen von *C. albicans* und der humanen CYP51 in das Sekundärstruktur-Vorhersagemodul von PSIpred erhält man einen Score für die Wahrscheinlichkeit der vorhergesagten Sekundärstruktur jeder Aminosäure der geprüften Sequenz.

Dieser Score ist von 1 bis 9 aufgeteilt, wobei 1 einer niedrigen und 9 einer hohen Wahrscheinlichkeit der vorhergesagten Sekundärstruktur entspricht. In Abb. 15.1 ist die grafische Auswertung für *C. albicans* dargestellt, in Abb. 15.2 diejenige für die humane Sequenz. Die Darstellung der jeweiligen Scores erfolgt in beiden Bildern mit Hilfe entsprechend großer cyanfarbener Balken. Die genauen Scores beider Sequenzen können aus Anhang G entnommen werden.

Unter den Score-Balken ist die jeweils bevorzugte Sekundärstruktur angegeben.  $\alpha$ -Helices werden als grüne Zylinder und  $\beta$ -Faltblattstrukturen als gelbe Bänder markiert. Unter den grafisch dargestellten Sekundärstrukturen sind alle Vorhersagen auch als



**Abbildung 15.1:** Sekundärstrukturvorhersage für die Sequenz von *C. albicans*. Der rot eingerahmte Sequenzbereich ist ein pilzspezifischer Loop zwischen Mäander und Cystein-Tasche (Loop 8).

Buchstabencode angegeben. Dabei steht H für Helix, E für  $\beta$ -Faltblattstrukturen und C (coil) für Sequenzbereiche ohne definierte Sekundärstruktur.

Wie man in Abb.15.3 erkennen kann, entsprechen die PSIpred-Vorhersagen für beide Sequenzen häufig der Kristallstruktur von CYP51MTB. Die vorhergesagten Helix- und Faltblatt-Bereiche sind in vergleichbarer Länge in der bekannten Struktur vorhanden. Ebenso können alle bekannten Helices der Struktur in den Vorhersagen gefunden werden. Sogar ein Teil der Nebenhelices wurde gefunden, wodurch eine hohe Vorhersagequalität bestätigt wird.



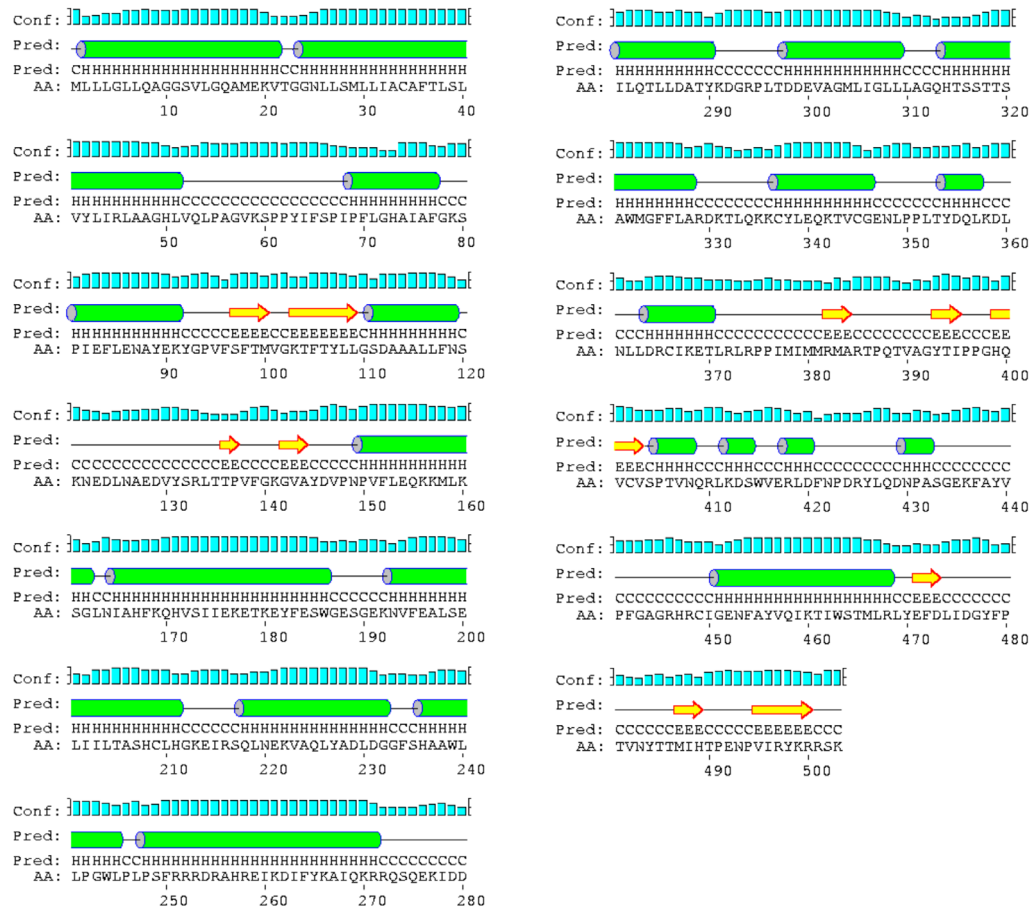


Abbildung 15.2: Sekundärstrukturvorhersage für die Sequenz des humanen Cyp51.

## 15.2 Alignment der beiden Sequenzen

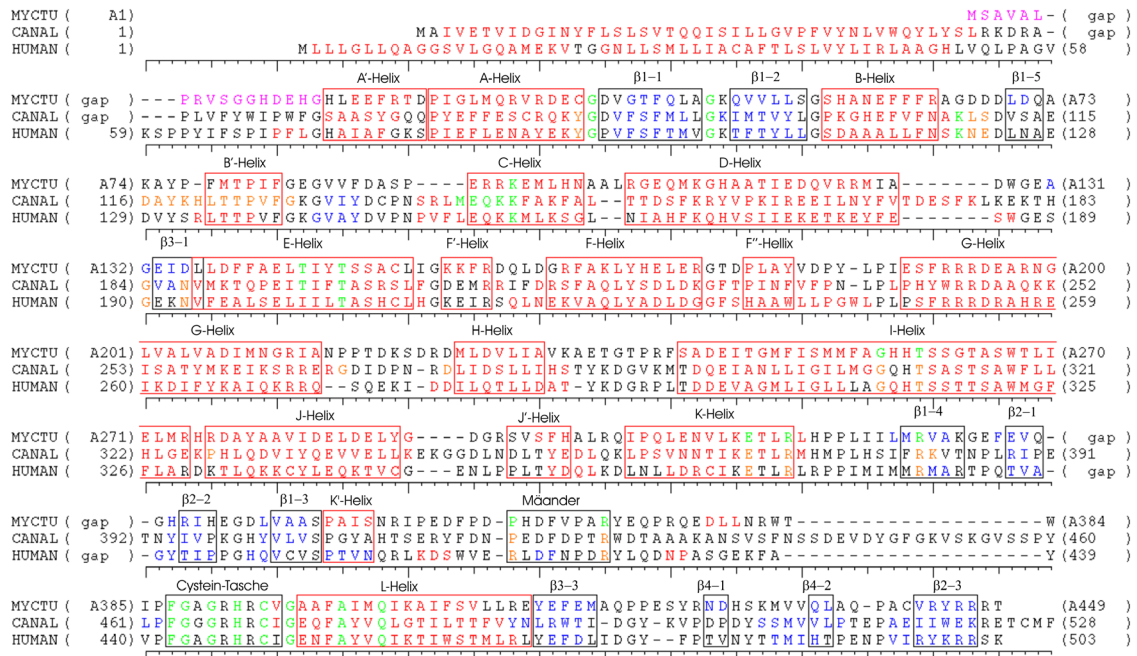
Bei einem Alignment<sup>1</sup> werden mehrere Sequenzen untereinander geschrieben und dabei darauf geachtet, dass analoge Bereiche direkt untereinander liegen. In diesem Alignment wurden die Sequenzen so angeordnet, dass sie in ihrer Homologie und ihrer Sekundärstruktur-Vorhersage zueinander passten.

Als homolog werden Sequenzen bezeichnet, die sich sehr ähneln. Entweder weil sie überwiegend aus identischen Aminosäuren aufgebaut sind oder weil die Seitenketten der mutierten Aminosäuren ähnliche physikalische Eigenschaften wie die der Template-Sequenz haben.

Um fehlende Sequenzbereiche zu überbrücken, werden in den unterschiedlichen Se-

<sup>1</sup>siehe Glossar

quenzen Lücken sog. Gaps eingefügt. Das Fehlen von Sequenzbereichen (Deletionen<sup>2</sup>) oder zusätzliche Sequenzbereiche (Insertionen<sup>3</sup>) ergibt Hinweise zu Anpassungen des Enzyms auf unterschiedliche Bedingungen in den verschiedenen Spezies.



**Abbildung 15.3:** Alignment der Cytochromsequenzen CYP51. Die obere Zeile stellt die Sequenz des *Mycobacterium tuberculosis*, die mittlere Zeile die des *C. albicans* und die untere Zeile die der humanen CYP51 dar. Dabei ist die Sequenz des CYP51MTB nach dem Auftreten der Sekundärstrukturen, die beiden anderen Sequenzen nach den PSIPred-Vorhersagen eingefärbt. Rote Sequenz-Bereiche repräsentieren Helix-Strukturen, blaue Falblatt-Strukturen. Grüne Aminosäuren sind in allen drei Sequenzen konserviert und generell wichtig für alle CYP-Enzyme. Für orange gefärbte Aminosäuren ist die Funktion oder Zuordnung noch nicht mit Sicherheit geklärt.

Neben einigen kleineren Gaps, die durch Insertionen oder Deletionen in den unterschiedlichen Sequenzen zu Stande kommen, fallen vor allem zwei große Insertionen in der Sequenz des *C. albicans* zwischen der Helix D und dem  $\beta$ -Faltblatt  $\beta$ 1-3 sowie dem Mäander und der Cystein-Tasche auf. Die Funktion der ersten Insertion ist bis jetzt noch unklar. Für die Insertion zwischen Mäander und Cystein-Tasche wird vermutet, dass sie einen Teil der Reduktase-Bindungsstelle darstellt.

Die Insertionen im N-terminalen Bereich der *C. albicans*- und der humanen Sequenz

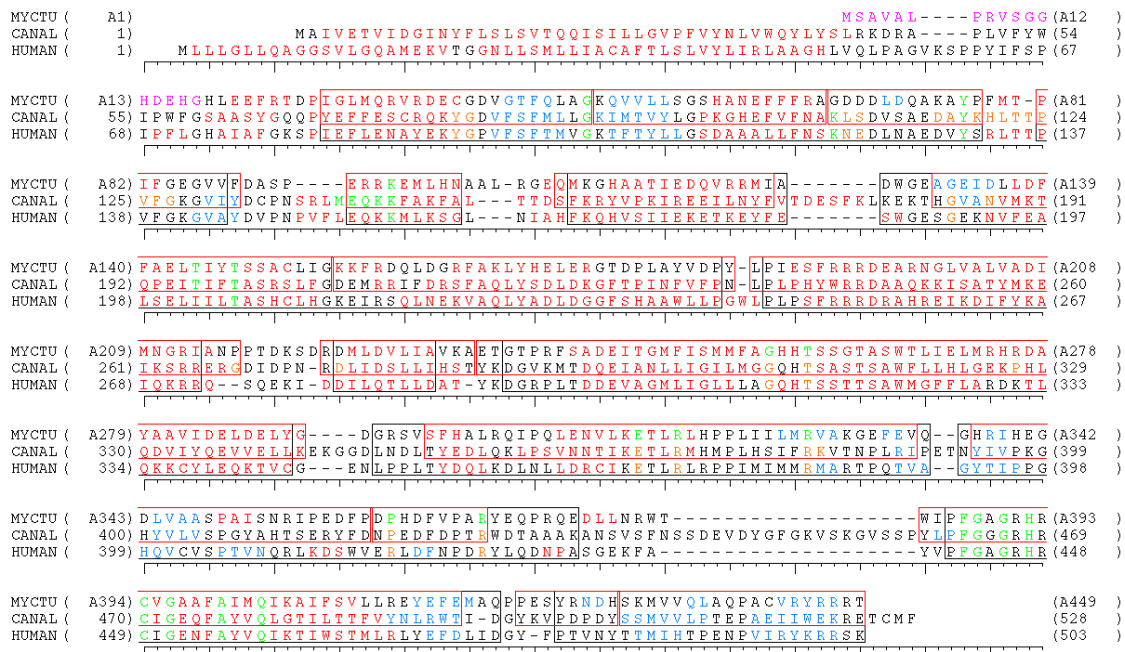
<sup>2</sup>Deletion engl. für Streichung. Genetisch bedingter Verlust eines Aminosäure Abschnittes.

<sup>3</sup>Insertion engl für Einfügung. Genetisch bedingter Einschub eines Aminosäure Abschnittes.

stellen den helikalen Membran-Anker dar, wie in anderen aus der Literatur bekannten CYP-Modellen gezeigt werden konnte [150].

## 15.3 Generierung der Modellstrukturen

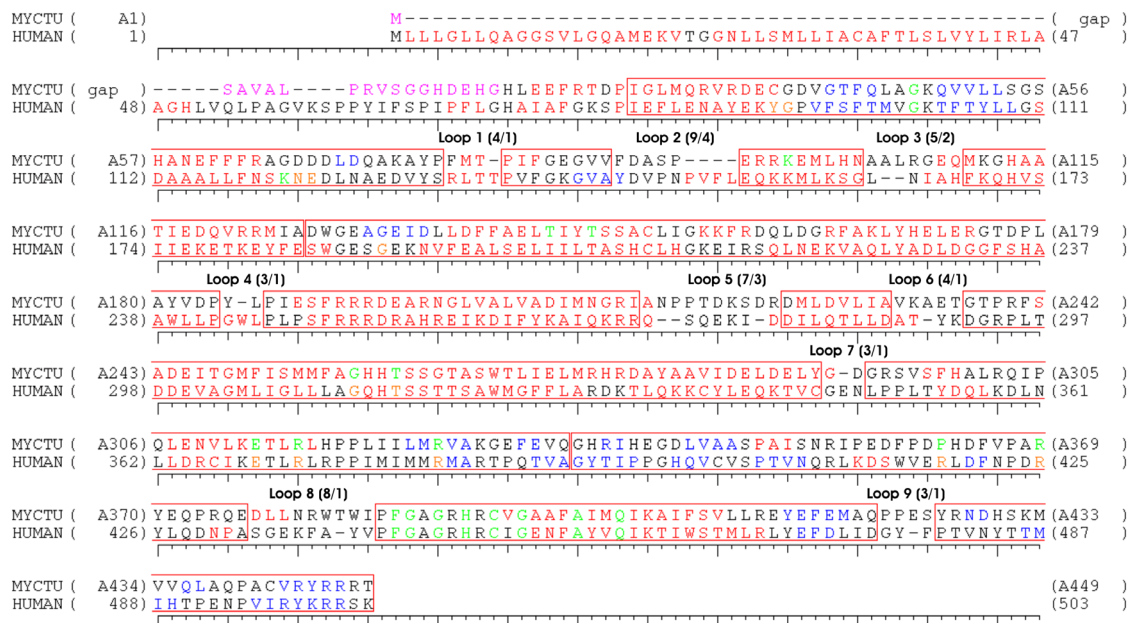
Mit dem in Abschnitt 15.2 beschriebenen Alignment konnten nun die Koordinaten der strukturkonservierten Bereiche auf die jeweiligen Sequenzen übertragen werden.



**Abbildung 15.4:** Alignment der CYP51-Sequenzen (gleiche Reihenfolge und Färbung der Sequenzen wie in Abb. 15.3). Rot eingerahmt wurden die strukturkonservierten Bereiche des *C. albicans*-Modells. Schwarz eingerahmt sind die strukturkonservierten Bereiche des humanen Modells.

Wie der Abb. 15.4 zu entnehmen ist, wurden bei *C. albicans* die ersten 68 und bei der humanen Sequenz die ersten 81 Aminosäuren nicht modelliert. Diese Sequenzbereiche entsprechen bei beiden Strukturen dem Membrananker und der A'-Helix. Die A'-Helix wurde nicht modelliert, da aus Literatur [151] bekannt ist, dass es nicht ausreicht, nur den Membrananker zu entfernen, sondern es muss bei der CYP51 des *C. albicans* auch die A'-Helix entfernt werden, um ein aktives und zugleich Cytosol lösliches Enzym zu erhalten. Für das humane Enzym lagen zwar derartige Informationen nicht vor, aber aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden auch in diesem Modell die entsprechenden

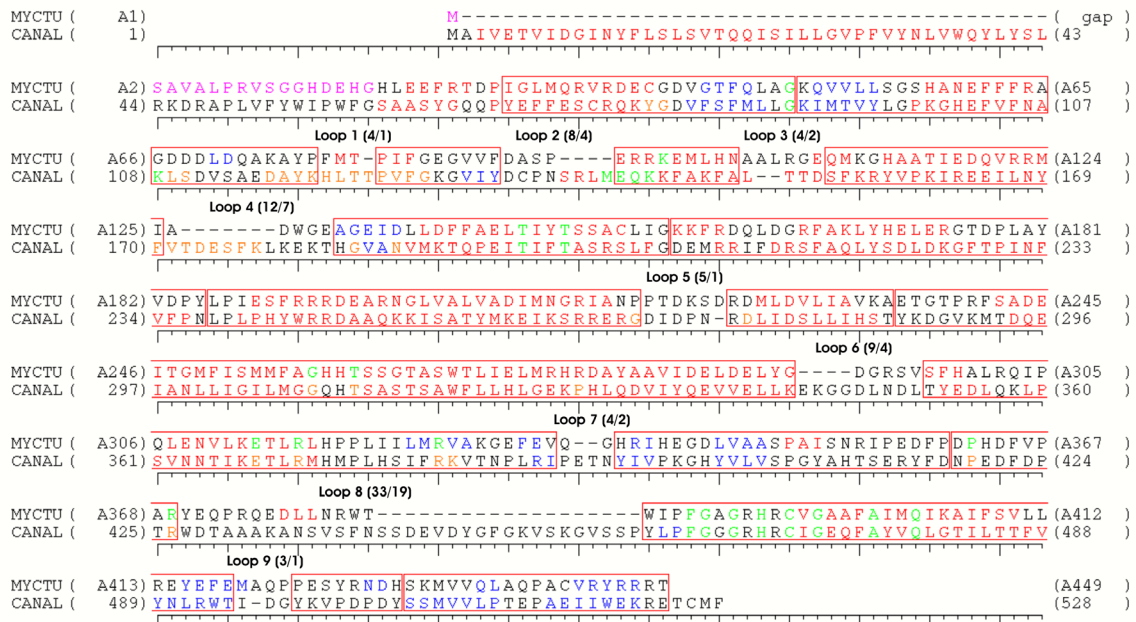
Sequenzabschnitte analog zu *C. albicans* nicht modelliert. Für die folgenden Angaben von Aminosäurepositionen muss beachtet werden, dass die erste Aminosäure des *C. albicans*-Modells in Wirklichkeit die Aminosäureposition 69 darstellt, während beim Modell des humanen Enzyms die erste Aminosäure der Position 82 entspricht. Somit müssen bei jeder Aminosäureposition für das *C. albicans* 68 Zähler hinzuaddiert werden, um auf die reale Position in der Enzymsequenz zu gelangen. Beim humanen Modell sind dieses logischerweise 81 Zähler.



**Abbildung 15.5:** Alignment der Humansequenz (unten) mit der Sequenz des CYP51MTB (oben). Von den rot eingerahmten Bereichen wurden die Koordinaten der Kristallstruktur auf die Humansequenz übertragen. Für die als Loop markierten Bereiche wurden Strukturen mit der Routine „Loop-search“ gesucht. In Klammern sind jeweils die Loop-Länge als erste Ziffer und die Länge der jeweiligen Insertion oder Deletion als zweite Ziffer angegeben.

Für das humane Modell mussten wie in Abbildung 15.5 gezeigt 9 Loops gesucht werden, die nicht aus der Kristallstruktur übernommen werden konnten. Diese Loops waren zwischen 3 und 9 Aminosäuren lang und mussten nur Insertionen oder Deletionen von 1 bis 4 Aminosäuren überbrücken, sodass es nicht schwer war, passende Loop-Strukturen zu finden.

Anders verhielt es sich beim Bau der *C. albicans* Modellstruktur. Hier mussten zwar ebenfalls 9 Loops an sehr ähnlichen Sequenzbereichen gesucht werden, aber die Län-

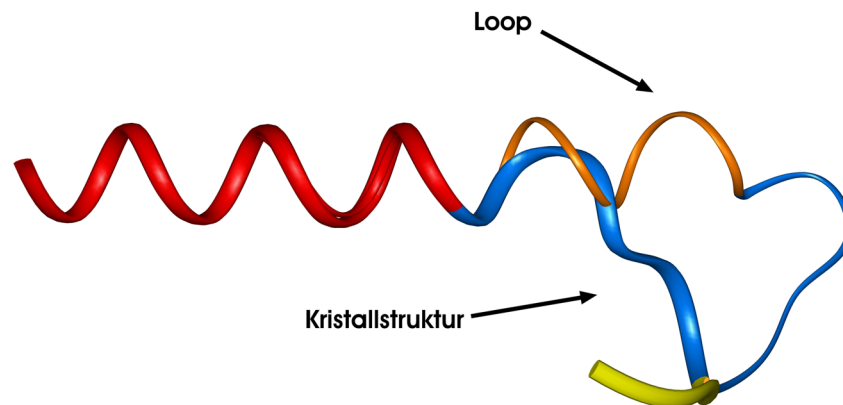


**Abbildung 15.6:** Alignment der *C. albicans* Sequenz mit der Sequenz des CYP51MTB. Diese Abbildung entspricht der Darstellung in Abb. 15.5 mit entsprechenden Erläuterungen.

ge dieser Bereiche variierte von 2 bis 33 Aminosäuren. Problematisch waren hierbei die beiden längsten Loops (s. Abb. 15.6, Loop 4 und Loop 8) mit einer Länge von 12 (Loop 4) bzw. einer Länge von 33 Aminosäuren (Loop 8). Die restlichen sechs Loop-Bereiche hatten nur Insertionen oder Deletionen von 1 bis 4 Aminosäuren zu überbrücken. Auch für diese Loops konnten problemlos passende Strukturen gefunden werden.

Da die beiden längeren Loops (4 und 8) größeren Insertionen in der Sequenz des *C. albicans* entsprechen und sich damit die Struktur stärker von der Kristallstruktur unterscheidet, waren hier mehrere Durchläufe mit der „Loop-Search“-Routine notwendig, bis eine passende Struktur gefunden wurde. Vor allem musste die Länge der Loops, das heißt die Lage der pre und post Flex-Bereiche variiert werden. So konnten unterschiedliche Eingangs- und Ausgangsstruktur-Situationen getestet werden, um die bestmögliche Loopstruktur zu finden. In dieser Arbeit werden nur die endgültig verwendeten Strukturen vorgestellt.

Beim Loop zwischen der D-Helix und dem  $\beta$ 3-1 Faltblatt (Loop 4) waren für die *C. albicans*-Struktur sieben Aminosäuren mehr unterzubringen. Für die Modellierung war



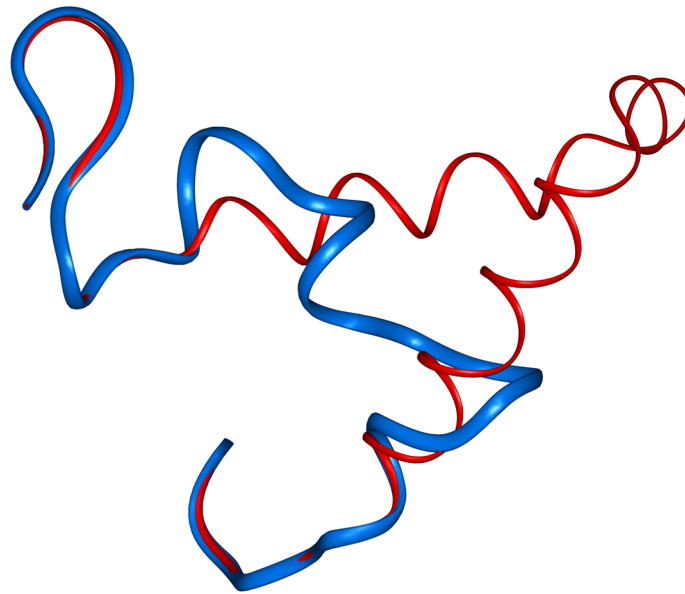
**Abbildung 15.7:** Modellierter Loop zwischen D-Helix und  $\beta$ 3-1 Faltblatt (Loop 4 aus Abb. 15.6). Das dicker dargestellte Proteinerückgrat entspricht der Kristallstruktur, das dünnere der modellierten Loop-Struktur. Der rote Strukturbereich beschreibt die D-Helix; blau sind Strukturbereiche ohne definierte Sekundärstruktur und gelbe Strukturen stellen das  $\beta$ 3-1 Faltblatt dar. Orange ist die Verlängerung der D-Helix im modellierten Loop von *C. albicans*.

es hilfreich, dass die Sekundärstrukturvorhersage in diesem Bereich eine längere D-Helix prognostizierte. Durch geschickte Wahl der Start- und End-Aminosäure für „Loop-Search“ konnte eine Struktur für diesen Sequenzbereich gefunden werden. Dabei wird die D-Helix verlängert und anschließend eine Schleife gebildet, die wieder zum Faltblatt  $\beta$ 3-1 zurück führt. So konnte trotz der Länge von 12 Aminosäuren eine sehr stabile Struktur (s. Abb 15.7) für diesen Bereich gefunden werden.

Schwieriger ließ sich der Loop zwischen Mäander und Cysteintasche (Loop 8) modellieren. In dieser Region hat *C. albicans* [124] einen für Pilze charakteristischen, zusätzlichen Loop. Er ist 19 Aminosäuren lang und konnte erst durch die Modellierung einer 33 Aminosäuren langen Loop-Struktur in das Modell integriert werden. Die Verlängerung des Loops war notwendig, da erst in diesem Abstand pre und post Flex-Bereiche den gut definierten Sekundärstrukturen zugeordnet werden konnten. Leider wurde, wie der Abb. 15.1 (rot eingerahmte Sequenz) zu entnehmen ist, keine Sekundärstruktur für den Sequenzbereich des Loops 8 vorhergesagt.

Aus einer Reihe von Möglichkeiten zeigt Abb. 15.8 diejenige, die sich bei den folgenden Simulationen als stabilste Variante erwiesen hat.

Nachdem allen Atomen der Modellstrukturen Koordinaten zugewiesen waren, wurde



**Abbildung 15.8:** Vergleich des Loop-Bereiches zwischen Mäander und Cystein-Tasche. Das blaue Proteinrückgrat zeigt den Verlauf in der Kristallstruktur, das rote den für das Modell des beim *C. albicans* verwendeten Loops.

die Geometrie der beiden Modelle mit der „splice-Repair“-Routine optimiert. Damit sollen evtl. bei der Modellierung entstandene Artefakte beseitigt werden. Zudem wird die Geometrie der Übergänge von der Kristallstruktur zu den modellierten Strukturen optimiert. Während dieser Berechnungen wurde die Anzahl der Iterationen auf 10 000 erhöht und das Konvergenzkriterium für die „*Conjugate-gradient*“-Methode auf  $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$  erniedrigt.

Im Anschluss an die Energieminimierung wurde in beide Rohmodelle das Häm eingefügt. Dazu wurden die Häm-Koordinaten der Kristallstruktur des CYP51MTB direkt in jedes Modell übernommen.

Abschließend wurden die Strukturen der CYP51-Modelle im PDB Format (**P**rotein-**D**atabase-File) gespeichert.





# Kapitel 16

## Stabilitätsprüfung der CYP51 Homologie-Modelle

Die nach der Homologie-Modellierung erhaltenen Strukturen wurden durch moleküldynamische Simulationen auf ihre Stabilität geprüft. Dabei ist es wichtig, dass die in den Modellen vorkommenden Sekundärstrukturen und vor allem das aktive Zentrum ohne weitere Rückhaltekräfte erhalten bleiben.

### 16.1 Durchführung der Moleküldynamik-Simulationen

Für die Durchführung der Stabilitätsprüfung wurden beide Modellstrukturen einer Moleküldynamik im GROMACS-Kraftfeld unterzogen.

Hierfür wurden die nach der Homologie-Modellierung erhaltenen PDB-Dateien der Modellstrukturen in das GROMACS-Format übersetzt. Danach wurden beide Strukturen im Vakuum in zwei Durchläufen zuerst einer „*steepest-Descent*“ und dann einer „*conjugate-Gradient*“ Geometrieoptimierung unterzogen. Das ist notwendig, um durch die Modellierung evtl. entstandene van der Waals-Kontakte zu entfernen. Einige der folgenden Operationen reagieren sehr empfindlich auf solche „schlechten“ Kontakte.

Nach den Geometrieoptimierungen wurden die Strukturen in das Zentrum einer Simulationsbox positioniert. Sodann wurde die Box weiter vergrößert, bis sich zwischen Proteinoberfläche und Boxgrenze ein Abstand von mindestens 0,45 nm einstellte.

Anschließend wurde die Box mit Wassermolekülen gefüllt. In einem weiteren Schritt wurden solange Wassermoleküle gegen Natriumionen bzw. Chloridionen ersetzt, bis

das umgebende Medium einer isotonischen Kochsalzlösung entsprach. Es wurde auch darauf geachtet, dass durch die Ionen die Gesamtladung der jeweiligen Strukturen ausgeglichen war. Die für die jeweiligen Modelle benötigten Moleküle bzw. Ionen sind in Tabelle 16.1 aufgeführt.

**Tabelle 16.1:** Größe der Simulationsboxen. In der letzten Zeile ist die Box für die Berechnung der Kristallstruktur angegeben.

Strukturen	Box-Dimensionen x;y;z (nm)	N(H <sub>2</sub> O)	N(Na <sup>+</sup> )	N(Cl <sup>-</sup> )
<i>C. albicans</i>	5,7; 8,6; 8,2	10761	44	40
Human	8,0; 7,4; 5,9	9303	37	38
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7,5; 7,7; 6,7	10581	51	33

Nach der Positionierung der Ionen wurde wiederum eine Energieminimierung, diesmal aber nur einmal, mit „conjugate-Gradient“ durchgeführt. Das war notwendig, da es durch das Einfüllen der Wassermoleküle in die Simulationsbox zu van der Waals-Überlappungen kommen kann.

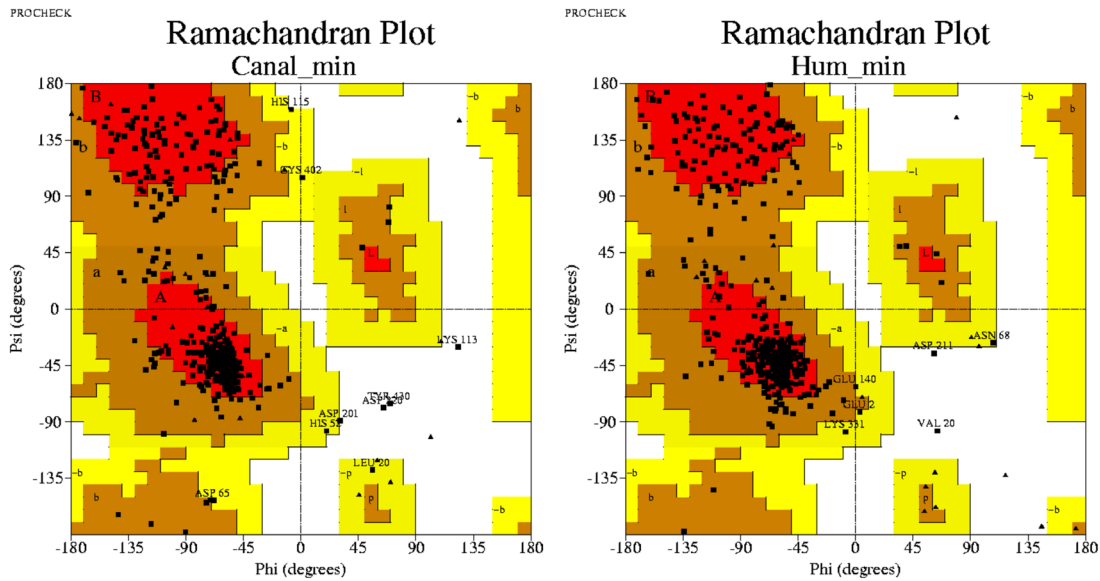
Nach der Energieminimierung schloss sich eine 250 ps lange Wasserboxequilibrierung an. Hiermit sollen evtl. beim Füllen mit Wassermolekülen entstandene, zu eng gepackte Wassercluster aufgelöst werden. Um das Proteinmodell nicht in Mitleidenschaft zu ziehen, wurden ein Großteil des Proteinrückgrats und das Häm mit einer Kraft von  $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$  festgehalten.

Die Seitenketten der Proteine und bestimmte Teile des Proteinrückgrats blieben in jedem Modell frei beweglich. Das Proteinrückgrat aller Aminosäuren, die im Ramachandran-Plot aus Abb. 16.1 in den *noch erlaubten*- bzw. *verbotenen* Regionen des Plots lagen, sowie mehrere Aminosäuren in deren direkter Umgebung konnten sich ebenfalls frei bewegen.

**Tabelle 16.2:** Aminosäureverteilung der Modelle im Ramachandran-Plot nach der Energieminimierung.

Regionen	<i>C.albicans</i>		Human	
	Anzahl	%	Anzahl	%
<i>favorisiert</i>	316	78,0	297	79,6
<i>erlaubt</i>	80	19,8	70	18,8
<i>noch erlaubt</i>	5	1,2	4	1,1
<i>verboten</i>	4	1,0	2	0,5

Die Anzahl der frei beweglichen Aminosäuren richtete sich nach deren Umgebung. So



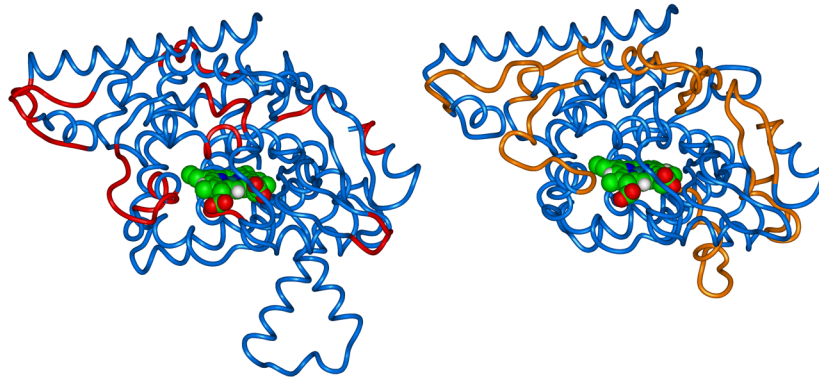
**Abbildung 16.1:** Ramachandran-Plots der Modellstrukturen. Auf der linken Seite ist der Plot für das *C. albicans*-Modell dargestellt, rechts das Modell für das humane Enzym. Rote Bereiche sind *bevorzugte*, braune sind *erlaubte* Regionen. Die gelben Bereiche bezeichnen generell *noch erlaubte* Regionen, während der weiße Bereich *verbotene* Regionen darstellt. Für Aminosäuren in gelben und weißen Bereichen sind die Bezeichnungen angegeben.

konnte es vorkommen, dass in manchen Loop-Strukturen bis zu 3 Aminosäuren links und rechts freigelassen werden mussten. In Abb. 16.2 ist der freie Teil des Proteinrückgrats in beiden Modellstrukturen farbig markiert.

An die Wasserboxequilibrierung schloss sich eine Dynamiksimulation von 1 ns Länge an. In dieser Simulation konnte sich das Protein frei bewegen.

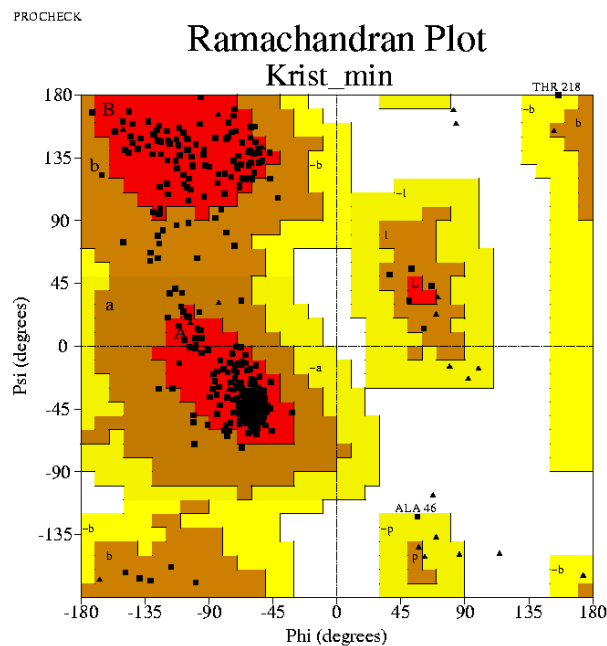
Alle Dynamiksimulationen wurden bei 310 K und 1 bar durchgeführt. Für die Berechnung elektrostatischer Wechselwirkungen wurde die Particle Mesh Ewald (PME)-Methode verwendet.

Als Vergleich zu den Simulationen beider Modellstrukturen wurde eine Simulation der Kristallstruktur des CYP51MTB mit gleicher Umgebung und Länge durchgeführt. Auch bei der Kristallstruktur wurde nach der Geometrieoptimierung ein Ramachandran-Plot erstellt. Dabei wurde festgestellt, dass zwei Aminosäuren (Ala46, Thr218) in der noch erlaubten Zone liegen. Um ein Abrutschen der Aminosäuren in verbotene Regionen zu vermeiden, wurden in der folgenden Equilibrierungs-Simulation die Aminosäuren 44-48 und 215-222 nicht festgehalten. Das restliche Proteinrückgrat wurde mit einer Kraft von



**Abbildung 16.2:** Darstellung der Modellstrukturen. Links das Modell von *C. albicans*, rechts das humane Modell. Das festgehaltene Proteinrückgrat ist bei beiden Modellen blau; das freie Proteinrückgrat ist bei *C. albicans* rot und beim humanen Modell orange eingefärbt.

1000 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> belegt.



**Abbildung 16.3:** Ramachandran-Plot der Kristallstruktur. Die Einfärbung ist analog zu Abb. 16.1.

Die Simulation zur Equilibrierung der Kristallstruktur und der umgebenden Wasserphase dauerte wie bei den Modellstrukturen 250 ps, die anschließende Dynamik ohne

**Tabelle 16.3:** Aminosäureverteilung der Kristallstruktur im Ramachandran-Plot nach der Energieminimierung.

Regionen	CYP51MTB (Kristallstruktur)	
	Aminosäuren	%
<i>favorisiert</i>	347	88,7
<i>erlaubt</i>	42	10,7
<i>noch erlaubt</i>	2	0,5
<i>verboten</i>	0	0,0

Rückhaltekräfte 1 ns.

## 16.2 Ergebnisse der Simulationen

Um die Stabilität der Modelle zu erkennen, wurden bei der Auswertung vor allem Bewegungen der unterschiedlichen Modellstrukturen überprüft und mit dem Verhalten der Kristallstruktur während der Simulation verglichen.

Hierzu wurde die 250 ps lange Equilibrierung mit der Trajektorie der 1 ns langen freien Dynamik verknüpft. Man erhält somit 3 Dynamiken à 1,25 ns; je eine für die Kristallstruktur CYP51MTB, das Modell des humanen Enzyms und das Modell *des C. albicans*-Enzyms. Die drei Simulationen werden in den folgenden Abschnitten miteinander verglichen.

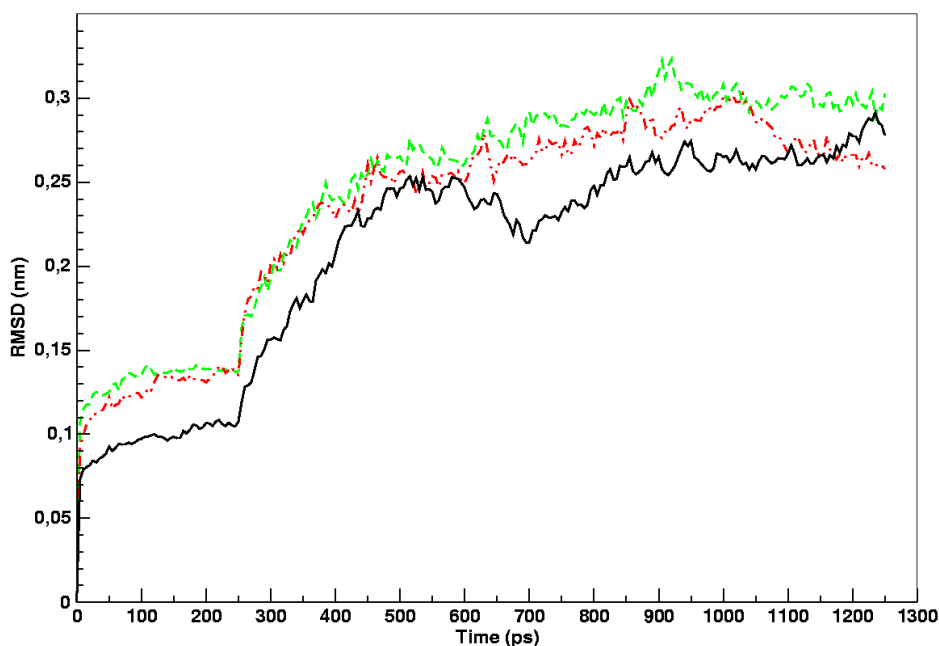
### 16.2.1 Vergleich der RMSD-Werte

Beim Vergleich der Beweglichkeit der Strukturen wurden die Änderungen der Protein-Koordinaten als RMSD-Werte gegen die Zeit aufgetragen.

Wie aus Abbildung 16.4 hervorgeht, verhalten sich die beiden Modellstrukturen sehr ähnlich im Vergleich zur Kristallstruktur.

Die beiden Modellstrukturen haben in der Equilibrierungsphase höhere RMSD-Werte. Grund dafür dürfte die im Vergleich zur Kristallstruktur größere Anzahl frei beweglicher Aminosäuren während der Equilibrierung sein.

Nach 500 ps bewegen sich die Modellstrukturen im Durchschnitt nur wenig über den RMSD-Werten der Kristallstruktur. Die maximale durchschnittliche Strukturänderung liegt bei der Kristallstruktur ungefähr bei 0,25 nm. Bei der Modellstruktur des humanen



**Abbildung 16.4:** RMSD-Werte der beiden CYP51-Modelle im Vergleich zu den RMSD-Werten der Kristallstruktur. Der rote Graph (· — ·) repräsentiert die Strukturänderung des *C. albicans*-Modells, der grüne Graph (— — —) die der humanen Modellstruktur. Der schwarze Graph beschreibt die Änderung der Kristallstruktur des Cyp51MTB.

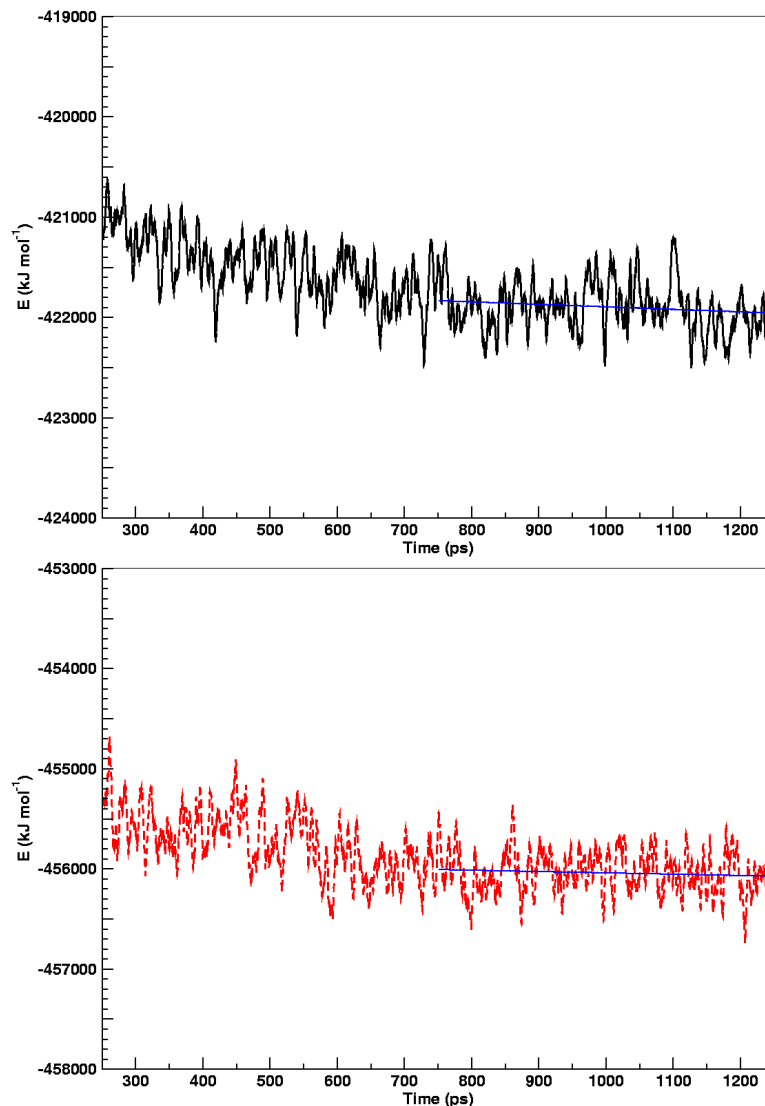
Enzyms betragen diese Werte etwa 0,28 nm, während bei der Modellstruktur des *C. albicans* sogar Abweichungen bis zu 0,31 nm möglich sind.

In der Darstellung der RMSD-Werte (s. Abb. 16.4) erkennt man das Ende der Equilibrierungsphase daran, dass die Steigung deutlich abnimmt. Danach zeigt der Kurvenverlauf ein Schwingverhalten an, bei dem die Struktur um einen gewissen RMSD-Wert pendelt.

### 16.2.2 Verlauf der potentiellen Energie der Modellstrukturen

Zum weiteren Nachweis der Equilibrierung soll in diesem Abschnitt die potentielle Energie des Systems betrachtet werden. Dabei wird allerdings nur die Equilibriumsdynamik dargestellt, da die Wasserboxequilibrierung wegen der vorhandenen Rückhaltekräfte auf einem anderen Energie-Niveau liegt.

Wie die Graphen in Abb. 16.5 zeigen, ändert sich das Energie-Niveau nach 500 ps nur noch wenig. Um sicher zu gehen, dass nur der equilibrierte Bereich der Simulation ausgewertet wird, wurde nach 750 ps eine Regressionsgerade für den Energieverlauf



**Abbildung 16.5:** Verlauf der potentiellen Energie während der Equilibrierungssimulation. Oben ist der Graph für die Simulation des *C. albicans*-Modells dargestellt, unten der für das humane Modell. Die blaue Gerade in beiden Graphen stellt eine Regressionsgerade für den entsprechenden Abschnitt der Simulation dar.

der Simulationen berechnet.

Für die Modelle ergeben sich folgende Geradengleichungen:

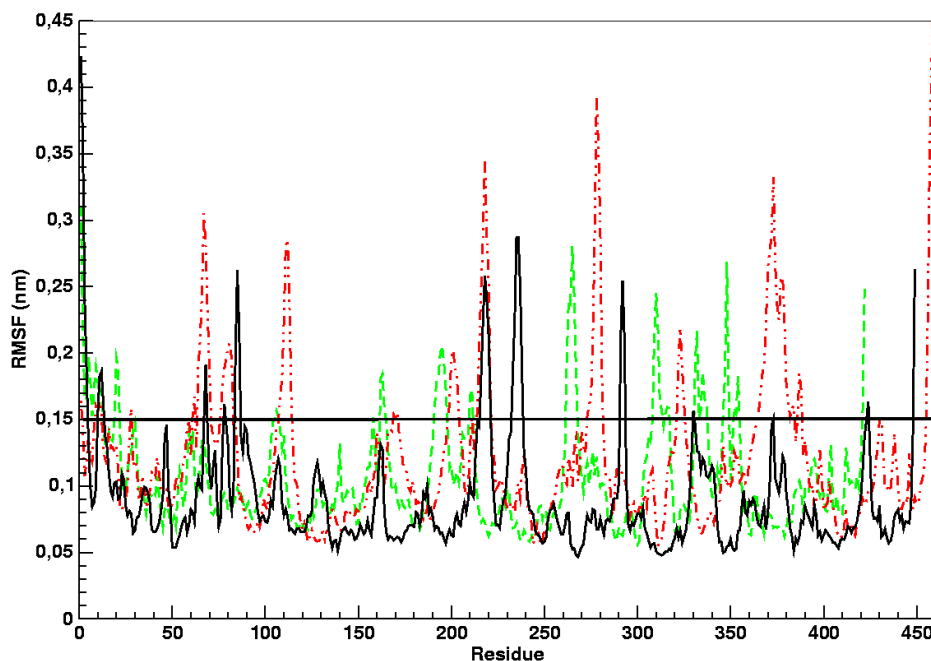
1. Für das *C. albicans*-Modell:  $E = -421.650 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,25 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
2. Für das humane Modell:  $E = -455.910 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,13 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$

Aus den Geradengleichungen erkennt man, dass die zeitliche Änderung der Energie

(Steigung) nur noch sehr gering ist. Daher können die Dynamiksimulationen als equilibriert betrachtet werden.

### 16.2.3 RMS-Fluktuation

Um zu erkennen, welche Strukturbereiche für die großen Schwankungen der RMSD-Werte nach der Equilibrierung verantwortlich sind, wurde für alle Aminosäuren die Fluktuation der RMS-Werte berechnet. Damit kann gezeigt werden, wie weit sich die Aminosäuren von ihrer Startposition weg bewegen. Es werden nur Strukturbereiche betrachtet, die sich mehr als 0,15 nm von ihrer Ausgangsposition entfernen. Der Grenzwert von 0,15 nm wurde aufgrund der Kristallstruktur-Auflösung in diesem Bereich festgelegt.



**Abbildung 16.6:** Fluktuation der RMS-Werte des Proteinrückgrats. Der schwarze Graph stellt die Änderung der Kristallstruktur, der rote Graph (· – ·) die Änderung des *C. albicans*-Modells und der grüne (– – –) die Änderung im Modell der humanen Enzymstruktur dar. Die Strukturbereiche über der schwarzen Linie bei 0,15 nm werden in Abb. 16.7 farblich hervorgehoben.

Wie in den Abbildungen 16.4 und 16.6 zu erkennen ist, bewegen sich die Modellstrukturen wesentlich stärker als die Kristallstruktur. Am stärksten sind die Bewegungen in der Struktur des *C. albicans*. Hier traten Auslenkungen von bis zu 0,4 nm auf. Bei der Modellstruktur des humanen Enzyms und der Kristallstruktur ist die maximale Auslenkung



mit 0,29 nm deutlich geringer.

Betrachtet man die in Abb. 16.7 farblich hervorgehobenen Strukturbereiche mit hoher RMS-Fluktuation, so ist ersichtlich, dass diese ausnahmslos an der Oberfläche liegen und sogenannte Loops ohne definierte Sekundärstruktur darstellen.

### 16.2.4 Überprüfung der Proteingeometrie mit PROCHECK

Mit den G-Faktoren<sup>1</sup> aus dem Programm PROCHECK, die in Abschnitt 4.3 beschrieben wurden, wird die Qualität der Strukturen nach der Dynamik beurteilt. Da diese Parameter hier nur als Qualitätskriterium dienen sollen, wurden stets die Ausgangsstrukturen mit der letzten Struktur der jeweiligen Dynamik verglichen, da zu diesem Zeitpunkt sämtliche Modelle unter gleichen Bedingungen und gleich lange simuliert worden waren.

**Tabelle 16.4:** Auflistung der kovalenten Bindungsparameter. Berechnet werden diese von PROCHECK als G-Faktoren. CYP51MTB=Kristallstruktur

Parameter	CYP51MTB		<i>C. albicans</i> -Modell		Humanmodell	
Simulationsdauer in ns	0,00	1,25	0,00	1,25	0,00	1,25
Bindungslängen	0,41	0,36	0,35	0,24	0,30	0,35
Bindungswinkel	0,08	0,06	-0,46	-0,08	-0,23	0,00
$\omega$ -Winkel	-0,34	-0,74	-0,98	-0,76	-0,87	-0,70
$\phi - \psi$ -Winkel	-0,03	-0,25	-0,67	-0,32	-0,53	-0,41
$\chi_1 - \chi_2$ -Verteilung	0,14	-0,24	-0,80	-0,44	-0,87	-0,32
<b>Gesamtparameter</b>	<b>0,08</b>	<b>-0,11</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,21</b>	<b>-0,33</b>	<b>-0,17</b>

Die Auswertung der Parameter ergibt, dass Kristallstruktur und Modelle durchaus vergleichbare Qualität haben. Dabei werden Bindungslängen und -winkel von GROMACS auch während einer längeren Simulation sehr gut wiedergegeben. Bei den Diederwinkeln,  $\phi$ - $\psi$ -Winkelverteilung und der  $\chi_1 - \chi_2$ -Verteilung nimmt die Qualität leicht ab. Die größte Abweichung von den Idealwerten findet bei der  $\omega$ -Winkel-Verteilung statt. Es ist gut zu erkennen, dass bei allen Simulationen die jeweiligen G-Faktoren auf einen bestimmten Wert zustreben. Z. B. ist bei der  $\omega$ -Winkel Verteilung zu erkennen, dass die G-Faktoren von unterschiedlichen Ausgangswerten (-0,34; -0,98; -0,87) sich in einem Werte-Bereich von -0,70 bis -0,76 einpendeln. Gleiches gilt für alle anderen Faktoren.

<sup>1</sup> Ideal ist jeder Wert über -0,5; Werte zwischen -1,0 und -0,5 können noch toleriert werden. Strukturen mit einem G-Faktor unter -1,0 weichen von den geometrischen Idealwerten so weit ab, dass sie nicht mehr hingenommen werden können.

Grund dafür sind die Parameter des GROMACS-Kraftfeldes, durch deren Definition die Qualität der berechneten Molekülstrukturen bestimmt wird.

### 16.2.5 Ramachandran-Plots der Strukturen

Da die Ramachandran-Plots der drei Strukturen schon in Abschnitt 16.1 gezeigt wurden, werden hier nur noch die Verteilungen der Aminosäuren in den unterschiedlichen Regionen des Ramachandran-Plots dargestellt.

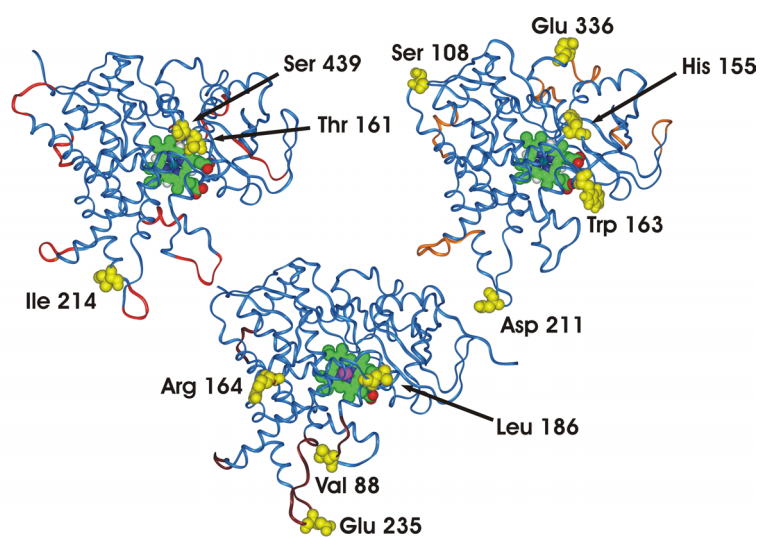
**Tabelle 16.5:** Ramachandran-Plot-Statistik der Strukturen.

AS=Anzahl der Aminosäuren; abs=absolut; CYP51MTB=Kristallstruktur.

Struktur	CYP51MTB				C. albicans-Modell				Humanmodell			
	Start		Ende		Start		Ende		Start		Ende	
Regionen	AS		AS		AS		AS		AS		AS	
	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	%
<i>favorisiert</i>	347	88,7	331	84,7	316	78,0	340	84,0	297	79,6	300	80,4
<i>erlaubt</i>	42	10,7	53	13,5	80	19,8	57	14,2	70	18,8	65	17,4
<i>noch erlaubt</i>	2	0,6	3	0,8	5	1,2	5	1,2	4	1,1	3	0,8
<i>verboten</i>	0	0,0	4	1,0	4	1,0	3	0,6	2	0,5	5	1,4

In Tabelle 16.5 werden die Qualitätveränderungen während der Simulation der Kristallstruktur mit denen der Modell-Simulationen verglichen. Es fällt auf, dass die Qualität der Kristallstruktur und des humanen Modells während der Simulation nachlässt, während die des *C. albicans* Modells besser wird. Die Gründe hierfür werden später genauer diskutiert.

In allen Strukturen tauchen nach der Simulation mehrere Aminosäuren in der *verbotenen* Region des Ramachandran-Plots auf. In Abb. 16.7 ist zu erkennen, dass sich diese Aminosäuren ausnahmslos an der Oberfläche des Enzyms befinden. Damit haben die „schlechten“ Geometrien dieser Aminosäuren keinen Einfluss auf das aktive Zentrum. Des Weiteren fällt auf, dass die Aminosäuren in der *verbotenen* Region polar sind. Ausnahmen bilden ein Valin (Val88) in der Kristallstruktur und ein Isoleucin (Ile214) im Modell des *C. albicans*-Enzyms. Diese lipophilen Aminosäuren liegen zwar ebenfalls an der Oberfläche, gehören aber gleichzeitig zu Loop-Bereichen, die sich stark bewegen. Insgesamt ist die Qualität der Modellstrukturen auch nach einer Simulation von 1,25 ns durchaus mit der simulierten Kristallstruktur vergleichbar. Daraus lässt sich schließen, dass die konstruierten Modelle eine mögliche Struktur der Enzyme darstellen und als Vorlagen für weitere Untersuchungen dienen können.



**Abbildung 16.7:** Vergleich der Modellstrukturen mit der Kristallstruktur. Die Modellstruktur von *C. albicans* ist oben links, die des humanen Enzyms oben rechts und die Kristallstruktur unten mittig dargestellt. Stark bewegliche Teile sind in den jeweiligen Strukturen farblich (orange, rot, dunkelrot) hervorgehoben. Außerdem sind alle Aminosäuren, die in verbotenen Regionen der jeweiligen Ramachandran-Plots auftreten, gelb gefärbt.



# Kapitel 17

## Simulation der Substratkomplexe beider Modelle

Zum besseren Verständnis der durch die CYP51-Enzymfamilie katalysierten Reaktion ist die genaue Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes von entscheidender Bedeutung. Allerdings ist genau darüber sehr wenig bekannt.

Bisher sind neben den in Abschnitt 14.4 beschriebenen wichtigen strukturellen Voraussetzungen der Substrate nur die Aktivitäten des Enzyms für das jeweilige Substrat bekannt. Über die Topologie des aktiven Zentrums existieren nur indirekte Daten.

So ist für die *C. albicans* CYP51 ein  $K_m$ -Wert von  $52 \mu\text{M}$  für die Umsetzung von Lanosterol gemessen worden. Die Aktivität von tierischer CYP51 ist mit  $50 \mu\text{M}$  fast genauso groß wie die des Pilzes [108, 152]. Zur Bestimmung der Aktivität des tierischen Enzyms wurde das der Ratte als Modellobjekt ausgewählt. Für das humane Enzym sind zwar auch Aktivitätswerte bekannt; diese wurden jedoch mit einer anderen Messmethode erstellt und somit können sie nicht für einen Vergleich herangezogen werden [153].

Ein Teil der topologischen Daten des aktiven Zentrums konnte auf indirekte Weise durch das folgende Experiment erhalten werden:

Das Enzym wurde der Chemikalie Phenylhydrazin ( $\text{PhNH-NH}_2$ ) ausgesetzt. Bei Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  spaltet das Phenylhydrazin eine radikalische Phenylgruppe ab, die an das Häm-Eisen bindet. Durch weitere Exposition des Enzyms mit  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  migriert die Phenylgruppe vom Eisen zu einem der vier Porphyrin-Stickstoffatome [154, 155]. Mittels Ausschütteln mit einer starken Säure wird das Porphyrin vom Protein abgetrennt. Über eine entsprechende HPLC-Analyse können nun die unterschiedlichen

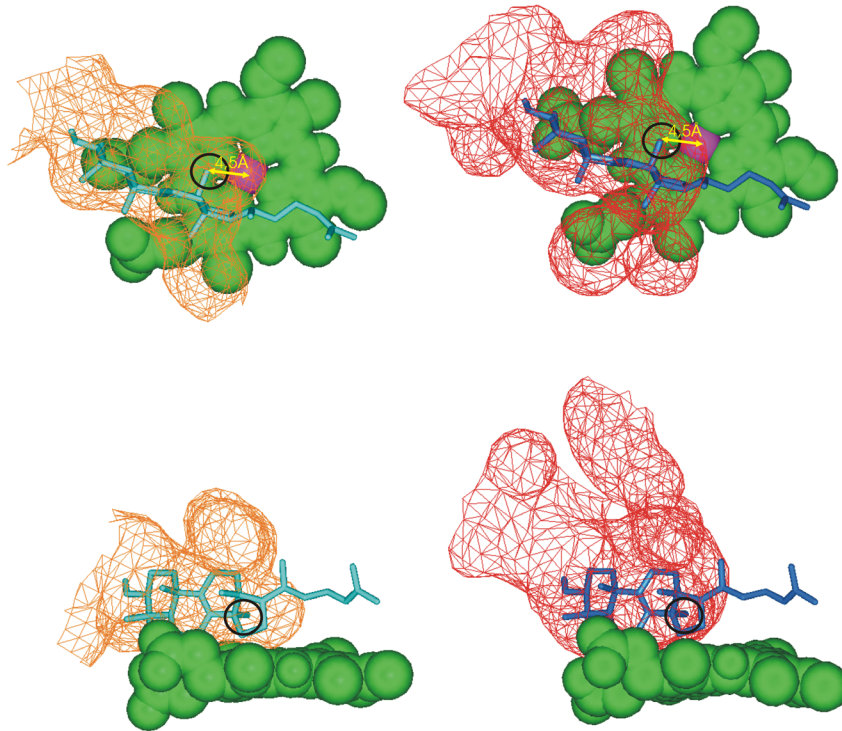
Porphyrin-Isomere getrennt werden. Die Häufigkeit der einzelnen Isomere ermöglicht Rückschlüsse auf den über dem Porphyrin vorhandenen Platz [156–158]. Bei Untersuchungen der CYP51 von *S. cerevisiae* zeigte sich, dass sich fast ausschließlich das Isomer bildet, bei dem die Phenylgruppe an den Stickstoff des C-Pyrrolrings gebunden ist [131].

Weitere Informationen über das aktive Zentrum des Enzyms bekommt man über Kristallstrukturen. Im Fall der CYP51 sind nur Strukturen des Enzyms aus *Mycobacterium tuberculosis* bekannt. In dessen aktivem Zentrum ist einmal Fluconazol und einmal 4-Phenyl-imidazol gebunden. Da diese Inhibitoren wie in Abschnitt 14.5 erwähnt einen anderen Bindungsmodus als das Substrat haben, kann daher nicht direkt auf die Lage des Substrates geschlossen werden.

## 17.1 Positionierung des Substrates

Um die Position des Lanosterols im aktiven Zentrum zu bestimmen, wurden die Modellstrukturen nach der ersten GROMACS-Energieminimierung betrachtet. Mit Hilfe des Programms SURFNET wurde das Volumen des aktiven Zentrums der beiden Modelle ermittelt und darin das Lanosterol positioniert. Es wurde darauf geachtet, dass das C-Atom am C14 in Richtung des Häm-Eisens ausgerichtet war. Als Abstand wurden 4,5 Å gewählt, da zwischen dem Häm-Eisen und der Methylgruppe des Lanosterols noch Platz für ein Sauerstoffmolekül sein muss. Dieser Sauerstoff wurde nicht modelliert, weil er erst nach der Bindung des Substrates am Häm-Eisen angreift und somit nicht an der Substratkomplexbildung beteiligt ist.

Wie in Abb. 17.1 zu sehen ist, konnte zwar das Steroidgrundgerüst in diese Volumina positioniert werden, die Seitenkette hatte jedoch in dieser Position keinen Platz im aktiven Zentrum. Die Position der Seitenkette wurde so gewählt, dass sie nur mit möglichst wenigen Aminosäuren kollidiert. Die gezeigte Position des Lanosterols ergab bei der Simulation eine realistische Position des Substratkomplexes. Darauf wird in der Diskussion noch genauer eingegangen werden.



**Abbildung 17.1:** Positionierung des Lanosterols im aktiven Zentrum der Modelle. Links ist die Position im aktiven Zentrum des *C. albicans* dargestellt, rechts im humanen Modell. Die oberen Bilder zeigen die Aufsichten, während die unteren Darstellungen die Seitenansichten der jeweiligen Modelle wiedergeben. Neben dem Lanosterol (cyan bzw. blau) ist noch die Größe des jeweiligen aktiven Zentrums mit Gitternetzlinien (orange bzw. rot) eingezeichnet. Die Methylgruppe, die durch das Enzym oxidiert wird, ist schwarz eingekreist. Das Häm ist als grünes Kalottenmodell mit dem Eisen in magenta dargestellt.

## 17.2 Simulation der Substratkomplexe

Das Simulationsprotokoll für die Lanosterol-Enzym-Komplexe erfolgt grundsätzlich analog dem Ablauf der Simulationen in Kapitel 16. Der einzige Unterschied besteht darin, dass Lanosterol bei diesen Simulationen das aktive Zentrum füllt.

Vor den Simulationen musste wiederum das umgebende Medium für die Modelle erstellt werden. In der folgenden Tabelle wird die Zusammensetzung des Mediums für die jeweilige Simulation gezeigt.

In der 250 ps langen Wasserboxequilibrierung wurde neben dem in Abschnitt 16.1 beschriebenen Proteinerückgrat auch das Lanosterol mit einer Kraft von  $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$

**Tabelle 17.1:** Größe der Simulationsboxen für die Berechnung der Substratkomplexe.

Strukturen	Box-Dimensionen x;y;z (nm)	N(H <sub>2</sub> O)	N(Na <sup>+</sup> )	N(Cl <sup>-</sup> )
<i>C. albicans</i>	5,9; 8,6; 7,9	10679	46	42
Human	6,1; 8,5; 8,2	11735	47	48

festgehalten.

Danach folgte die 1 ns lange Dynamik, bei der sich das Protein frei bewegen durfte. Das Lanosterol wurde während dieser Simulation durch ein „Distance Restraint“ in einem Abstand von 2,5 bis 4,5 Å mit einer Kraft von  $50 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$  an das Häm-Eisen gebunden. Diese Kraft wirkt jedoch erst dann, wenn die Grenzwerte unter- bzw. überschritten werden. Das war nötig, um dem Lanosterol-Molekül die Möglichkeit zu geben, sich im aktiven Zentrum des Enzyms optimal positionieren zu können.

## 17.3 Ergebnisse der Simulationen

Ziel der vorgestellten Simulationen ist es, die Position des Substrates im aktiven Zentrum der beiden Modelle zu bestimmen. Hierfür werden in den folgenden Abschnitten neben dem Verhalten der beiden Modelle auch die Positionsveränderungen des im aktiven Zentrum liegenden Substrates untersucht.

### 17.3.1 Vergleich der RMSD-Werte

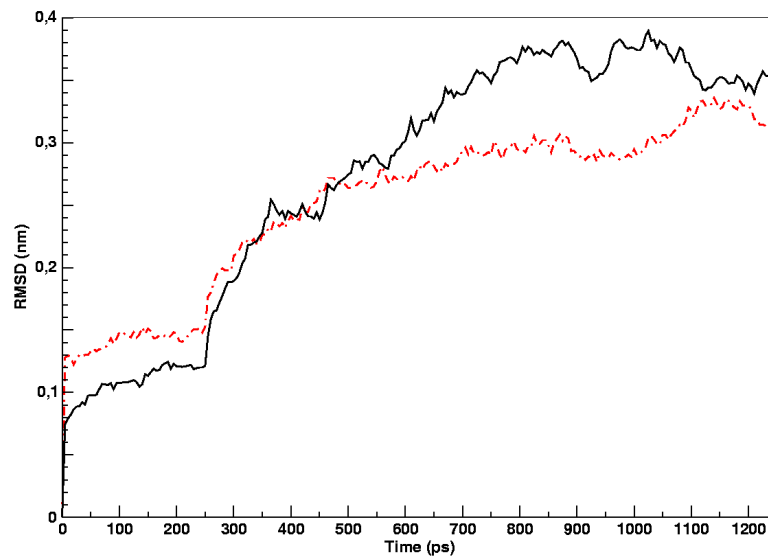
Um den Verlauf der Simulation beurteilen zu können, wurden analog zu Abschnitt 16.2.1 auch in den hier vorgestellten Simulationen die RMSD-Werte untersucht.

Die in Abb. 17.2 gezeigten RMSD-Graphen zeigen auch nach den Equilibrierungsphasen eine ausgeprägte Schwankungsbreite.

Bei der Simulation des *C. albicans*-Modells wird ein erstes Plateau nach ca. 800 ps bei 0,38 nm erreicht, das bei 900 ps kurz auf 0,36 nm abfällt, um dann wieder auf den vorherigen Wert zu steigen. Erst bei etwa 1100 ps nimmt der RMSD-Wert eine Größe zwischen 0,34 und 0,35 nm an, der auch bis zum Schluss der Simulation erhalten bleibt.

Für das humane Modell des Enzym-Lanosterol-Komplexes sieht der Verlauf der RMSD-Werte wesentlich ausgeglichener aus. Hier ist schon nach ca. 500 ps eine erste Equilibrierung erreicht. Zwar steigt danach der RMSD-Wert noch langsam von 0,28 auf 0,30 nm weiter an, stabilisiert sich dann jedoch auf einem Niveau von 0,29 nm. Erst





**Abbildung 17.2:** RMSD-Werte der beiden Modelle im Komplex mit Lanosterol. Der schwarze Graph stellt den Verlauf bei der Simulation des *C. albicans*-Modells dar, der rote Graph (· — ·) den des humanen-Modells.

bei 1050 bis 1200 ps kommt es nochmals zu einer Erhöhung des RMSD-Niveaus auf 0,33 nm, das dann aber bis zum Schluss der Simulation wieder auf 0,30 nm absinkt.

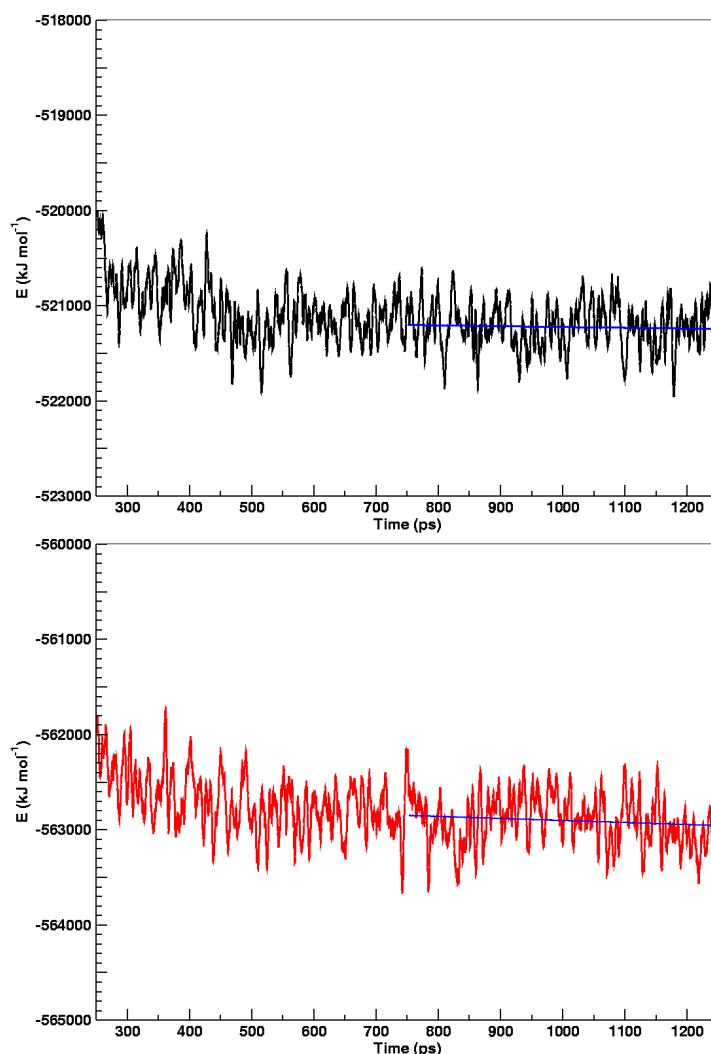
### 17.3.2 Potentielle Energie der Komplexstrukturen

Um zu zeigen, dass der RMSD-Wert auch wirklich eine Equilibrierung zeigt, wird in diesem Abschnitt der Verlauf der potentiellen Energie der beiden Simulationen beschrieben. Dabei wird in den Graphen nur die der Equilibriumsdynamik betrachtet, da die Wasserboxequilibrierung durch die Rückhaltekräfte auf einem anderen Energieniveau stattfindet und damit für den Energieverlauf nicht von Interesse ist.

Wie die Graphen in Abb. 17.3 veranschaulichen, ist das System schon nach 500 ps equilibriert. Um sicher zu gehen, dass die Auswertung auch nur für den equilibrierten Bereich erfolgt, wurden lediglich die letzten 500 ps berücksichtigt. In beiden Graphen wurde für den Zeitraum von 750 bis 1250 ps eine Regressionsgerade berechnet.

Für die Modelle ergeben sich dabei folgende Geradengleichungen:

1. Für das *C. albicans*-Modell:  $E = -521.140 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,084 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
2. Für das humane Modell:  $E = -562.690 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,213 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$



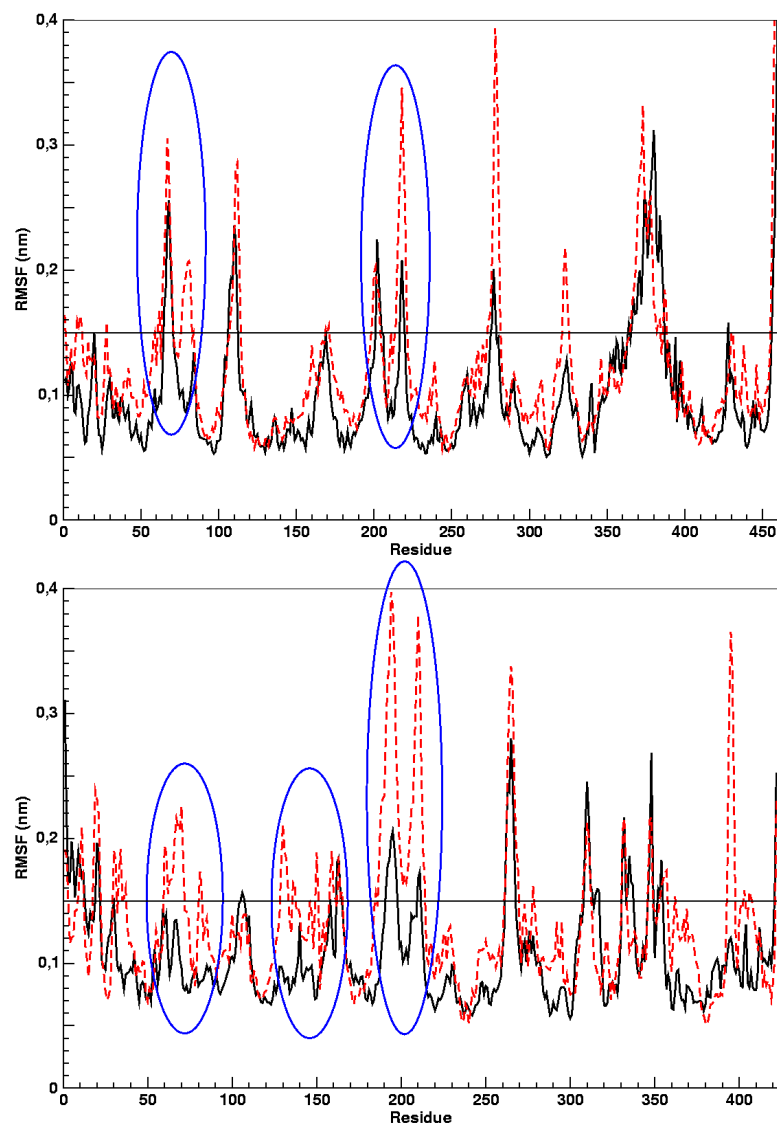
**Abbildung 17.3:** Im oberen Graphen ist der Energieverlauf während der Simulation des *C. albicans*-Modells dargestellt; der Graph darunter zeigt den Verlauf während der Simulation des humanen Modells. Die blaue Gerade in beiden Graphen zeigt eine Regressionsgerade für die equilibrierten Bereiche.

Daraus folgt, dass die Steigungen dieser Geraden nur noch sehr gering sind und die Simulationen somit als equilibriert zu betrachten sind.

### 17.3.3 RMS-Fluktuation

Wie schon in Abschnitt 16.2.3 gezeigt wurde, sind für die Schwankungen des RMSD-Wertes der einzelnen Modelle nur bestimmte Bereiche der Strukturen verantwortlich. In diesem Abschnitt soll außerdem untersucht werden, ob und wenn ja welche Teile der

Modelle durch die Gegenwart des Substrates in ihrer Beweglichkeit verändert werden.

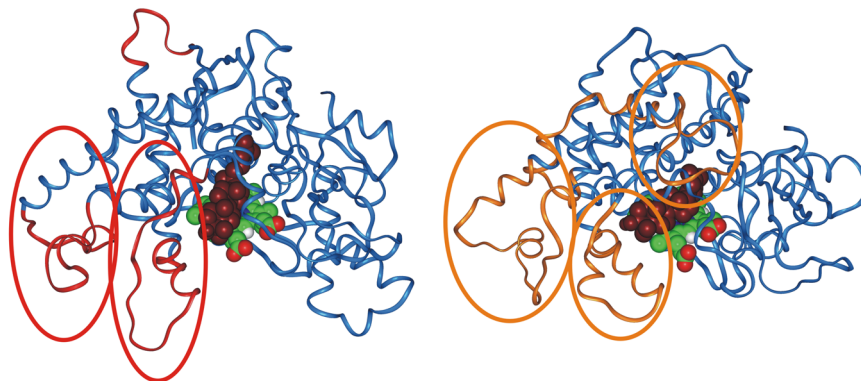


**Abbildung 17.4:** RMSF-Werte der Modelle als Substratkomplex im Vergleich zu den Rechnungen der Simulation mit freier aktiver Tasche. Das obere Diagramm stellt die Berechnungen des *C. albicans*-Modells dar, der untere die des humanen Modells. In jedem Diagramm stellt die schwarze Kurve die Simulation mit freier aktiver Tasche dar, während die rote (— —) die Simulation des Lanosterol-Komplexes zeigt. Die blau markierten Bereiche bedeuten Strukturabschnitte, die durch Anwesenheit von Lanosterol ihre Beweglichkeit ändern.

Wie bei der Simulation des *C. albicans*-Modells mit freiem aktiven Zentrum liegen die beweglichen Strukturelemente der Substrat-Simulation zum großen Teil in Loop-Bereichen an der Oberfläche des Enzyms. Nur zwei Regionen sind hier von Interesse.

Diese liegen im Sequenzbereich von 55-80 und 210-230 des Modells und sind in Abb. 17.4 blau umrandet.

Im humanen Modell werden wie in Abb. 17.4 unten gezeigt drei Bereiche durch die Anwesenheit von Lanosterol verstärkt zu Bewegungen angeregt. Dabei sind die Sequenzbereiche 60-70, 130-170 und 184-214 des Modells von besonderem Interesse, da diese Abschnitte einen Teil des BC-Loops, den FG-Loop, den C-terminalen Bereich der G-Helix und den N-terminalen Bereich der I-Helix beinhalten. Diese Segmente sind Teil der in Abschnitt 14.3 beschriebenen flexiblen Bereiche.



**Abbildung 17.5:** Darstellung der Lanosterol-Komplexstrukturen. Links für das *C. albicans*-Modell, rechts für das humane. Bereiche die durch die Bildung des Lanosterol-Komplexes in ihrer Beweglichkeit verändert wurden, sind rot im *C. albicans* bzw. orange im humanen Modell hervorgehoben. Die in den entsprechenden Farben eingerahmten Strukturbereiche sind dabei von besonderem Interesse. Das Häm ist als Kalottenmodell in den Atomfarben (s. Anhang B) und Lanosterol dunkelrot dargestellt.

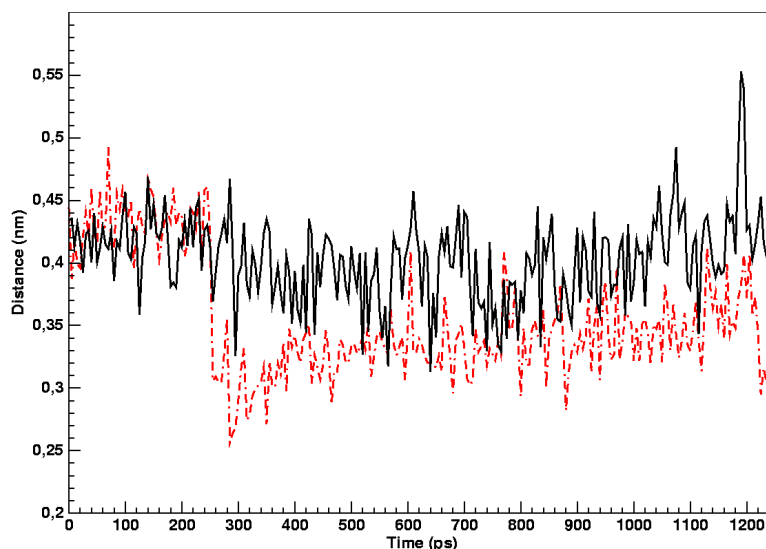
Allerdings wird in Abb. 17.5 auch deutlich, dass die beweglichen Strukturelemente nur sehr wenig am aktiven Zentrum beteiligt sind.

### 17.3.4 Abstand der 14 $\alpha$ -Methylgruppe zum Häm-Eisen

Der Abstand der 14 $\alpha$ -Methylgruppe zum Häm-Eisen ist von entscheidender Bedeutung. Er darf nämlich nicht zu groß werden, da sonst die Oxidationsreaktion nicht mehr stattfinden kann. Auf der anderen Seite darf er auch nicht zu klein sein, weil es dem Enzym dann nicht mehr möglich ist, den Sauerstoff zwischen Eisen und Methylgruppe zu positionieren.

Idealerweise sollte dieser Abstand zwischen 3,5 und 4,5 Å betragen, denn in diesem

Bereich liegen auch die Abstände von Substraten anderer Kristallstrukturen [111, 113, 118, 119, 121].



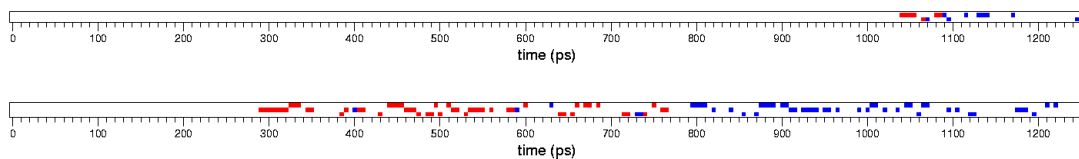
**Abbildung 17.6:** Abstand zwischen Häm-Eisen und der 14 $\alpha$ -Methylgruppe. Schwarz ist der Verlauf des *C. albicans*-Modells und rot (· — ·) der des humanen Modells dargestellt.

Die Abbildung 17.6 verdeutlicht, dass sich das Abstandsverhalten der beiden Simulationen stark unterscheidet. Während der Abstand der Methylgruppe zum Häm-Eisen in der *C. albicans*-Simulation relativ konstant bleibt und immer nur zwischen 3,5 und 4,5 Å schwankt, fällt er bei der Simulation des humanen Modells sofort nach der Wasserboxequilibrierung, d.h. nach Freilassen des Lanosterols stark ab. Erst nach etwa 600 ps hat sich dann der Abstand auf etwa 3,5 Å eingependelt.

Für den gesamten Verlauf gilt, dass der „Distance Restraint“ zwischen der Methylgruppe und dem Häm-Eisen nur sehr selten gebraucht wurde, denn der Abstand blieb in der Regel innerhalb der geforderten Grenzen und pendelte sich dort ein.

### 17.3.5 H-Brücken zwischen Lanosterol und Protein

Das Lanosterol besitzt am Atom C3 eine  $\beta$ -ständige Hydroxyl-Gruppe, die Einfluss auf die Bindung des Substrates hat. Es wird im Folgenden gezeigt, welche Wechselwirkungen die OH-Gruppe mit den Modellen eingehen kann. Um eine Wasserstoffbrücke zu erkennen, muss der Abstand zwischen H-Atom und Akzeptor-Atom  $2,5 \text{ \AA} \pm 0,1$  sowie der Winkel zwischen Donor-Atom, Wasserstoff und Akzeptor-Atom  $60^\circ \pm 1$  betragen.



**Abbildung 17.7:** H-Brücken zwischen Lanosterol und den Proteinen. Das obere Diagramm zeigt die gefundenen H-Brücken für das *C. albicans*-Modell, das untere für das humane Modell. Rote Quadrate zeigen die zum jeweiligen Zeitpunkt gebildete H-Brücke zwischen Lanosterol und dem Modell an. Bei blauen Quadraten ist diese H-Bindung mit einem Wassermolekül verbrückt.

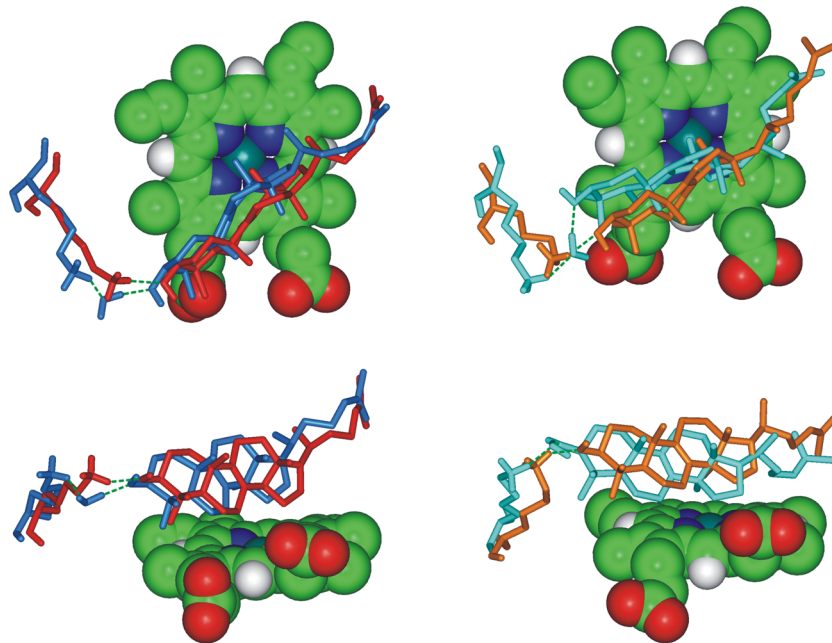
Aus Abb. 17.7 ließe sich ableiten, dass das Lanosterol im *C. albicans*-Modell zwei H-Brücken und im humanen Modell anscheinend sogar drei H-Brücken ausbilden kann. Das ist aber nicht der Fall, denn in beiden Modellen kann die OH-Gruppe nur eine H-Brücke mit der  $\text{NH}_3$ -Gruppe des Lysins 79 ausbilden. Da die H-Atome der  $\text{NH}_3$ -Gruppe gleichwertig sind, können die gefundenen H-Brücken auf eine reduziert werden. Diese H-Brücke wird nicht immer direkt ausgebildet, sondern häufig ist sie auch über ein Wassermolekül verbrückt.

Im Modell des *C. albicans* wird die H-Brücke erst bei 1040 ps gebildet, während im humanen Modell schon nach 290 ps die H-Brücke entstanden ist. Für beide Modelle gilt jedoch, dass zuerst die direkte H-Brücke aufgebaut wird und diese dann in eine mit Wasser verbrückte Konfiguration übergeht.

Wie jedoch Abb. 17.8 zeigt, ändert sich die Lage des Lanosterols im humanen Modell beim Übergang von der direkten in die mit Wasser gebildete H-Brücke stärker als die des *C. albicans*-Modell.

### 17.3.6 Clusteranalyse und repräsentative Strukturen

Wie in Abschnitt 17.3.1 ausgeführt wurde, pendelt der RMSD-Wert der Proteinstruktur längere Zeit um einen nahezu identischen Wert. Demnach ist es auch nicht notwendig, jede Struktur in diesem Zeitintervall separat auszuwerten. Vielmehr wurde für den Zeitraum von 750 ps bis zum Ende der Simulation (1250 ps) mit Hilfe des Programms NMRCLUST eine sogenannte Clusteranalyse durchgeführt. Hierbei werden alle Frames einer Trajektorie miteinander verglichen und alle ähnlichen Strukturen in einem sog. Cluster zusammengefasst. In jedem dieser Cluster ermittelt das Programm dann einen Frame, der als repräsentative Struktur ausgegeben wird. Bei der Durchführung



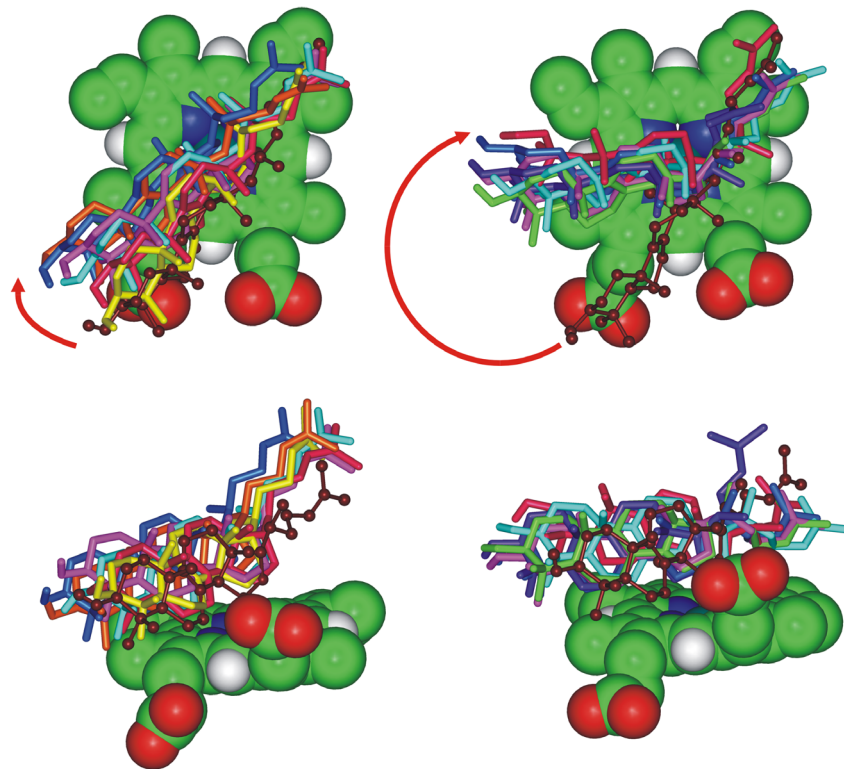
**Abbildung 17.8:** Darstellung unterschiedlicher H-Brücken-Konfigurationen. Links sind die Konfigurationen des *C. albicans*-Modells gezeigt, rechts die des humanen Modells. Beide sind sowohl in Auf- als auch Seitenansicht zu sehen. Für die direkte H-Brücke sind das Lysin 79 und das Lanosterol des *C. albicans*-Modells rot dargestellt, im humanen Modell orange. Für die über ein Wasser verbrückte H-Brücke wurden Lysin 79, Wasser und Lanosterol im *C. albicans*-Modell blau und im humanen Modell cyan eingefärbt.

der Clusteranalyse wurden die NMRCLUST-Standard Einstellungen übernommen.

Mit Hilfe dieser Routine wurden aus den 100 Frames einer Trajektorie 15 Cluster gebildet. Da die meisten Änderungen der Proteinstruktur in Loop-Bereichen stattfinden, ergibt sich für mehrere Cluster eine sehr ähnliche Lage des Lanosterols im aktiven Zentrum. Damit konnte die Anzahl der Strukturen von 15 auf 6 verringert werden.

Wie aus Abb.17.9 hervorgeht, ändert sich die Lage des Substrates im humanen Modell deutlich stärker als in dem des *C. albicans*.

Daneben ist in Abb. 17.9 zu erkennen, dass die Seitenkette des Lanosterols im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells nur eine Konformation einnehmen kann, während im humanen Modell zwei Konformationen dafür möglich sind.



**Abbildung 17.9:** Lageänderung des Lanosterols während der Dynamiksimulation. Links für das *C. albicans*-Modell, rechts für das humane. In dunkelroten Ball&Sticks ist die jeweilige Startstruktur dargestellt und als Kalottenmodell in Atomtypen das Häm. Daneben sind für beide Modelle noch die sechs repräsentativen Strukturen der Clusteranalyse als Sticks in unterschiedlichen Farben angeordnet. Ein roter Pfeil zeigt für jedes Modell die Richtung der Lageänderung an.

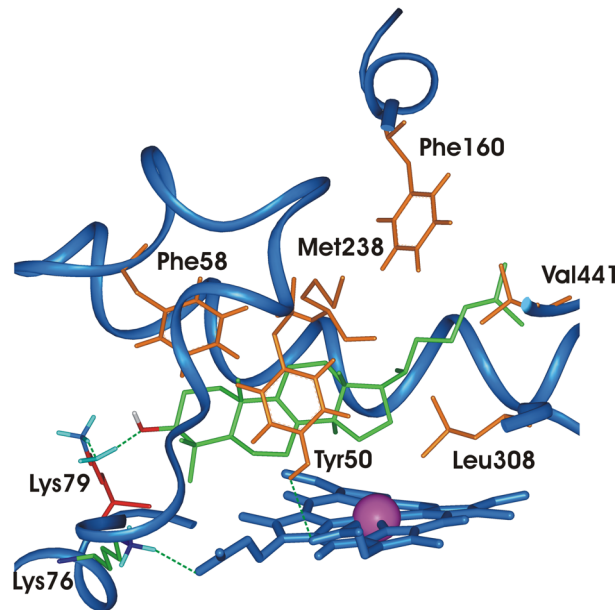
### 17.3.7 Interaktionen des Lanosterols mit dem Protein

In Abschnitt 17.3.5 wurden schon die H-Brücken zwischen Lanosterol und dem Protein beschrieben. Hier sollen nun alle Aminosäuren aufgezeigt werden, die für die Stabilisierung der Lage des Lanosterols in den aktiven Zentren der Proteine verantwortlich sind.

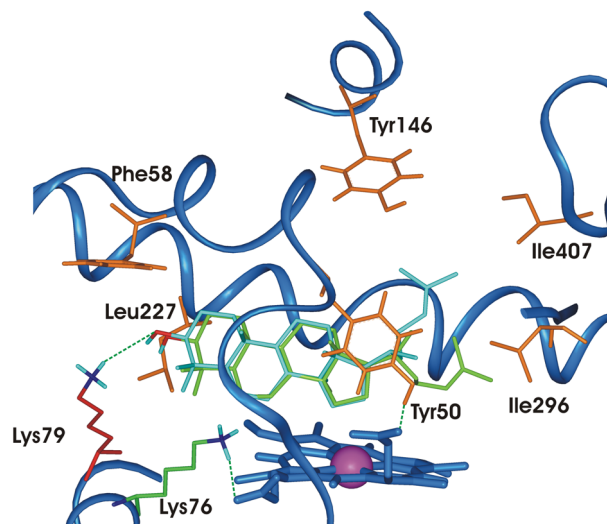
Wie in den Abb. 17.10 und 17.11 zu erkennen ist, unterscheiden sich die aktiven Zentren der beiden Modelle kaum, beide werden durch hydrophobe Aminosäuren dominiert.

Die unterschiedliche Lage des Lanosterols im aktiven Zentrum lässt sich darauf zurückführen, dass im aktiven Zentrum des humanen Modells mehr Platz zur Verfügung steht





**Abbildung 17.10:** Lanosterol im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells. Das Proteinrückgrat ist blau, das Häm-Eisen als magentafarbene Kugel dargestellt. Das Lanosterol ist nach Atomtypen, die interagierenden hydrophoben Aminosäure-Seitenketten orange eingefärbt. Rot ist die Seitenkette des H-Brücken donierenden Lysins 79. Grüne gestrichelte Linien zeigen H-Brücken an.



**Abbildung 17.11:** Lanosterol im aktiven Zentrum des humanen Modells. Das Proteinrückgrat ist blau, das Häm-Eisen magenta, das Lanosterol in Atomtypen und die interagierenden hydrophoben Aminosäure-Seitenketten sind orange eingefärbt. Rot ist die Seitenkette des H-Brücken donierenden Lysins 79. Grüne gestrichelte Linien zeigen H-Brücken an.

als beim Modell von *C. albicans* (s.Abb. 17.1).

Von Interesse ist auch, dass für das Lanosterol im aktiven Zentrum des humanen Enzyms zwei Konformationen der Seitenkette gefunden werden (s. Abb 17.11), während die Seitenkette des Lanosterols im Modell für das *C. albicans*-Enzym im Laufe der gesamten Simulation nur eine Konformation einnehmen kann (s. Abb. 17.10).

# Kapitel 18

## Parametrisierung der Fe-N Bindung

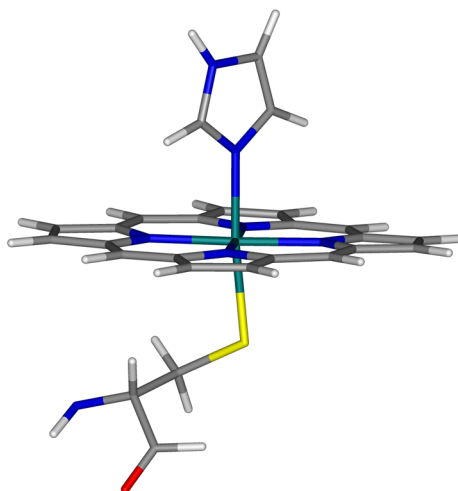
Zur besseren Wiedergabe der Inhibitorenbindung am Eisen des Häms wurde in Kooperation mit dem Institut für Theoretische Chemie der Heinrich-Heine-Universität diese Bindung genau berechnet, um Parameter für das GROMACS Kraftfeld zu bestimmen. Es wurden Parameter für das „bond-stretching“ und das „dihedral potential“ berechnet. Für alle Berechnungen wurde die im Programmpaket TurboMole5.1 integrierte RI-DFT-Methode verwendet [159, 160]. Als Funktional kam BLYP zum Einsatz [17–19]. Für Wasserstoffatome wurde ein SV- und für alle schweren Atome eine TZVP-Basis benutzt [161].

In einer ersten Berechnung wurde die gesamte Modellstruktur energieminiert. Diese in Abb. 18.1 gezeigte Struktur wurde als Ausgangsbasis für alle weiteren Berechnungen verwendet. Die folgende Tabelle vergleicht die berechneten Strukturdaten mit denen aus der Kristallstruktur CYP51MTB. Dabei wurde der Enzymkomplex mit 4-Phenylimidazol als gebundenem Liganden herangezogen, da dieser kaum vom umgebenden Protein beeinflusst wird.

**Tabelle 18.1:** Vergleich der berechneten Strukturdaten mit der Kristallstruktur CYP51MTB.

	Berechnete Daten	Kristallstruktur
Fe-N <sub>FeP</sub>	2,00 Å	2,0 Å ±0,1 Å
Fe-N <sub>Imidazol</sub>	2,1 Å	2,3 Å ±0,1 Å
N <sub>FeP</sub> -C <sub>FeP</sub>	1,38 Å	1,4 Å ±0,1 Å
∠N <sub>FeP</sub> -Fe-N <sub>Imidazol</sub>	90°	86° ±3°

Als Ausgangsstruktur zur Berechnung der Bindungsenergie zwischen dem Porphyrin-Eisen und dem Imidazol-Stickstoff wurde die in Abb. 18.1 gezeigte Struktur verwendet.



**Abbildung 18.1:** Für die RI-DFT verwendetes Modell des Porphyrin-Eisen-Inhibitor-Komplexes.

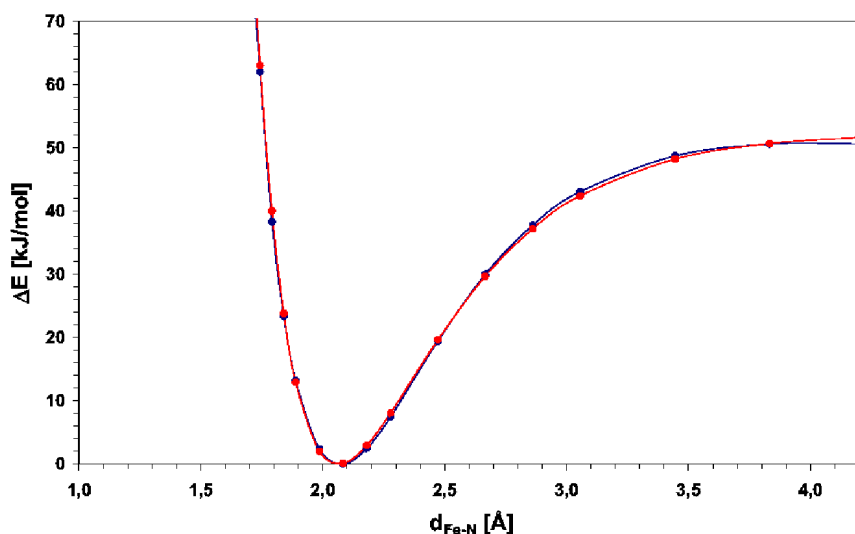
Um die Bindungsenergie berechnen zu können, musste der Imidazolring in Abständen zwischen 1,5 und 4,2 Å zum Häm-Eisen positioniert werden. Für jeden Abstand wurde dann eine DFT-Berechnung durchgeführt, bei der das gesamte Modell bis auf die Eisen-Stickstoff-Bindung energieminiert wurde.

Die Energiedifferenzen aus der energetisch günstigsten zu anderen berechneten Strukturen ergeben dann den in Abb. 18.2 dargestellten Graphen. Wird der Graph an das in Gleichung 18.1 gezeigte Morse-Potential angepasst, so erhält man für  $D_{ij}=52.432$  kJ/mol,  $\beta=2,314$  Å<sup>-1</sup> und für  $b_{ij}=2,063$  Å.

$$V_{Morse}(r_{ij}) = D_{ij}(1 - e^{-\beta_{ij}(r_{ij}-b_{ij})})^2 \quad (18.1)$$

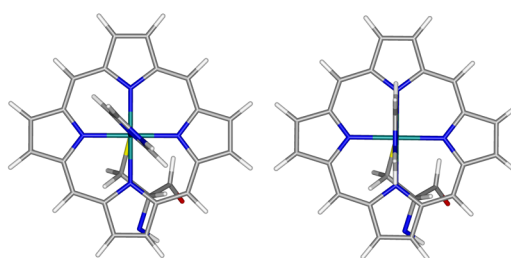
Dabei stellt  $D_{ij}$  die Bindungsenergie und  $b_{ij}$  die Bindungslänge im Gleichgewichtszustand dar. Diese Zahlen wurden dann als Parameter für das GROMACS-Kraftfeld verwendet.

Für das Potential des Diederwinkels wurde in analoger Weise vorgegangen. Hierbei wurde, wie in Abb. 18.5 zu sehen ist, der Imidazolring um die Eisen-Stickstoff-Bindung gedreht. Die so erhaltenen Konformationen wurden energieminiert. Während dieser Zeit wurde der Diederwinkel der Eisen-Stickstoff-Bindung fixiert, so dass er nicht minimiert werden konnte. Die Energiedifferenzen zwischen den energetisch günstigsten Strukturen ( $\varphi=45^\circ$  bzw.  $135^\circ$ ) und den Strukturen der anderen Winkel ergeben dann



**Abbildung 18.2:** Morsepotential der Eisen-Stickstoff-Bindung. Blau ist das Potential aus den DFT-Berechnungen dargestellt, während der rote Graph das gefittete Potential repräsentiert.

den in Abb. 18.4 gezeigten Energieverlauf.

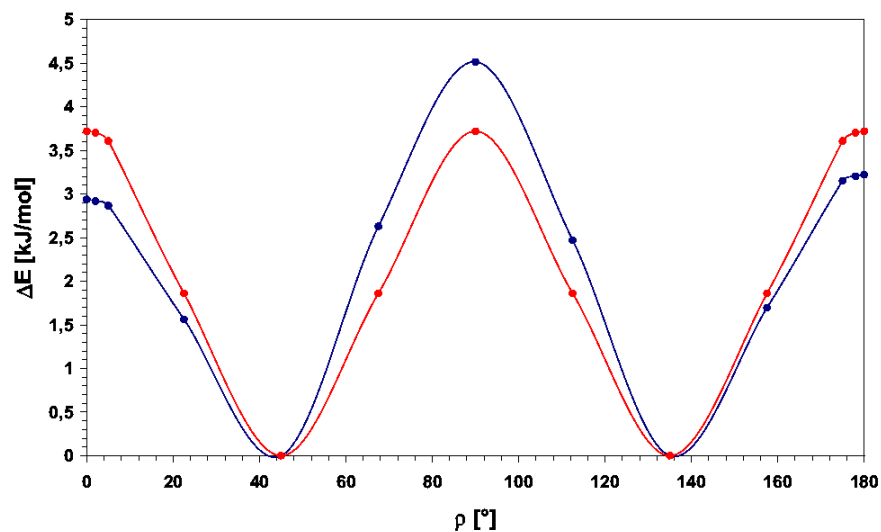


**Abbildung 18.3:** Zwei berechnete Konformerstrukturen. Links die Struktur für das Minimum bei  $\theta = 45^\circ$ , rechts die Struktur des Maximums bei  $\theta = 0^\circ$ .

Das berechnete Torsionspotential zeigt bei den Torsionswinkeln  $0^\circ$ ,  $90^\circ$  und  $180^\circ$  jeweils ein Maximum. Dabei ist das bei  $90^\circ$  mit 4,515 kJ/mol die höchste Energiebarriere und bei  $0^\circ$  mit 2,937 kJ/mol der niedrigste Wert. Da die Differenz beider Barrieren nur sehr gering ist, konnte für das GROMACS-Kraftfeld ein harmonisches Torsionspotential mit der folgenden Gleichung verwendet werden.

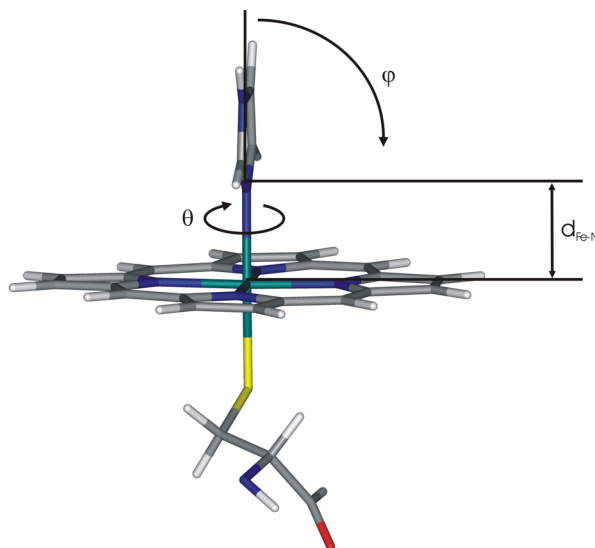
$$V_\alpha(\theta_{ijkl}) = k_{ijkl}(1 + \cos(n_{ijkl}\theta_{ijkl} - \theta_{ijkl,0})) \quad (18.2)$$

Für die Berechnung des harmonischen Torsionspotentials  $V_\alpha(\theta_{ijkl})$  des Winkels  $\theta_{ijkl}$



**Abbildung 18.4:** Potential der Torsion um die Eisen-Stickstoff-Bindung. Der rote Graph stellt den mittels DFT berechneten Energieverlauf dar, während der blaue Graph für das gefittete Potential steht.

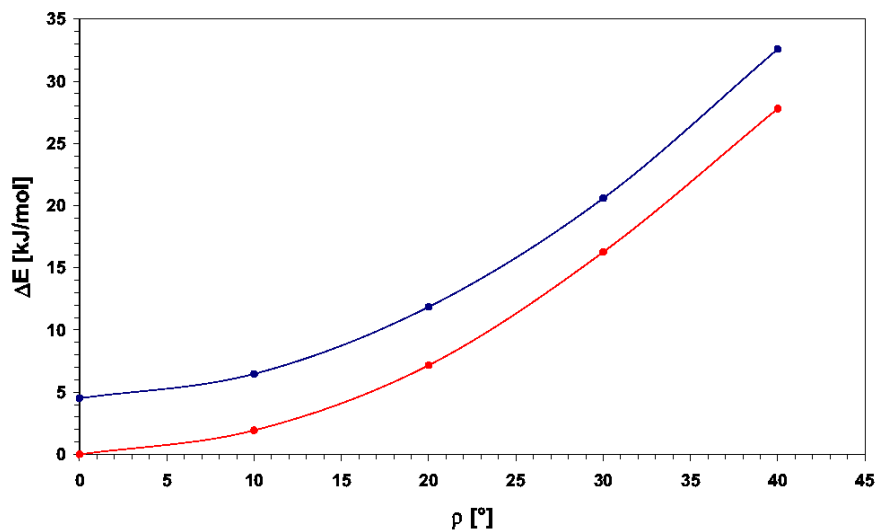
wurden folgende Parameter ermittelt. Für  $k_{ijkl} = 1,86$  kJ/mol für  $n_{ijkl} = 4,00$ . Als Wert für  $\theta_{ijkl,0}$  wurde ein Winkel von  $0^\circ$  eingesetzt.



**Abbildung 18.5:** Notwendige Bewegungen für die Berechnung der Potentiale des Häm-Modells.  $d_{Fe-N}$  für das Bindungspotential,  $\theta$  für das Torsionspotential und  $\varphi$  für das Kippen des Imidazolrings.

Neben den Potentialen für das Kraftfeld wurde noch ein weiteres Potential berechnet.

Bei diesem wurde der Imidazolring des Modells in Richtung des mit  $\varphi$  beschrifteten Pfeils bewegt (s. Abb. 18.5).



**Abbildung 18.6:** Das Potential, das durch Kippen des Imidazolrings entstanden ist. Der blaue Graph beschreibt das Potential, das der Imidazolring bei der in Abb. 18.3 rechts dargestellten Struktur ( $\theta=0^\circ$ ) einnimmt, wenn er gekippt wird. Der rote Graph stellt das Kipp-Potential für das Konformer  $\theta=45^\circ$  dar.

So konnte die Abhängigkeit der Energie der Eisen-Stickstoff-Bindung vom Kippwinkel des Imidazolrings bestimmt werden. Damit war es in den folgenden Simulationen möglich, die Enantioselektivität der simulierten Enzyme mit gedockten Inhibitoren zu beschreiben.





# Kapitel 19

## Simulationen der Inhibitor-Enzym-Komplexe

Um die Bindung von Inhibitoren der CYP51 von *C. albicans* und des humanen Enzyms genauer zu untersuchen, wurden die Inhibitoren Bifonazol und Ketoconazol im aktiven Zentrum der beiden Enzyme positioniert.

In der Therapie werden beide Substanzen als Razemate verwendet. Für Bifonazol sind es das Gemisch der R/S-Enantiomere, bei Ketoconazol kommt das 2R/4S//2S/4R-Razemat zum Einsatz.

Das Problem bei der Suche nach geeigneten experimentellen Daten für die hier vorliegende Arbeit bestand darin, dass in der Regel für Antimykotika sog. Wachstumshemmungen bestimmt werden. Dabei wird eine Pilz-Population unterschiedlichen Konzentrationen eines Inhibitors ausgesetzt und die Reaktion des Pilzes darauf untersucht. Als Kenngröße wird der sog. MIC-Wert<sup>1</sup> (**m**inimal **i**nhibition **c**oncentration) bestimmt. Neben den MIC werden der MIC<sub>50</sub> oder der MIC<sub>90</sub> bestimmt. Dabei stellen die Indices die Konzentration dar, die erforderlich ist, um 50 % bzw. 90 % des Pilzes abzutöten.

In der folgenden Tabelle werden die MIC-Werte der Razemate beider Inhibitoren aus in-vitro Tests für *C. albicans* gezeigt.

Daneben ist aus solchen in-vitro Tests mit Bifonazol bekannt, dass das R-Enantiomer in seiner Wirkung gegen *C. albicans* dem S-Enantiomer gleicht [163].

Bezogen auf das Ziel dieser Arbeit besteht ein Problem darin, dass die MIC-Untersuchungen am kompletten Pilz durchgeführt werden. Damit ist aber nicht sichergestellt, dass der

---

<sup>1</sup>siehe Glossar

**Tabelle 19.1:** MIC-Werte der Inhibitoren gegen *C. albicans* [162].

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
Bifonazol	2,44	2	4
Ketoconazol	9,26	8	32

gemessene Wert wirklich auf die Bindung des Inhibitors in einem speziellen Enzym zurückzuführen ist. Vielmehr stellen MIC-Werte Summenparameter dar, die alle Mechanismen von der Störung des Pilzwachstums bis hin zum Absterben des Pilzes enthalten. Daher sind diese Daten für die Untersuchung spezifischer Inhibitionsmechanismen nur bedingt geeignet.

Geeigneter sind sog. Inhibitionsdaten, da hierbei das zu untersuchende Enzym aus dem Organismus isoliert und an diesen Isolatoren direkt die Inhibition des Enzyms durch die zu prüfende Substanz gemessen wird. Bei diesen Untersuchungen werden üblicher Weise sog. IC<sub>50</sub>-Konzentrationen (inhibition concentration) ermittelt. Diese Daten geben die Konzentration eines Inhibitors an, bei der das Enzym zu 50 % inhibiert wird. Für Vergleiche zwischen *C. albicans* und dem humanen Enzym stehen leider nur die in Tabelle 19.2 gezeigten IC<sub>50</sub>-Werte für Ketoconazol zur Verfügung.

**Tabelle 19.2:** IC<sub>50</sub> von Ketoconazol zur Inhibition von *C. albicans* und humaner CYP51 [164].

IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	
<i>C. albicans</i>	Human
0,06 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,15

Daneben sind aus der Literatur die IC<sub>50</sub>-Werte für sämtliche Stereoisomere des Ketoconazols bekannt. In Tabelle 19.3 werden die Werte für die Inhibition von CYP51 von Ratten gezeigt.

**Tabelle 19.3:** IC<sub>50</sub>-Werte für die Inhibition von CYP51 durch Ketoconazol Stereoisomere [165].

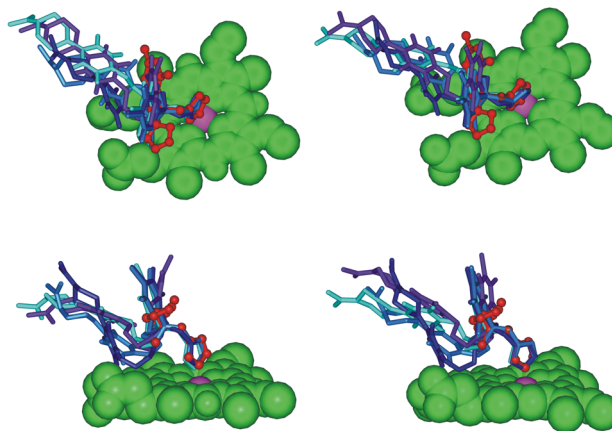
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )			
Stereoisomer			
2S,4S	2R,4R	2S,4R	2R,4S
1,60 $\pm$ 0,08	1,37 $\pm$ 0,19	0,047 $\pm$ 0,003	0,119 $\pm$ 0,007

Da sowohl Bifonazol als auch Ketoconazol Typ II Inhibitoren sind, ist der Mechanismus der Inhibition besser geklärt als die Umsetzung der Substrate. Beide Inhibitoren bil-

den nämlich eine koordinative Bindung an das Häm-Eisen und blockieren dadurch das aktive Zentrum des Enzyms.

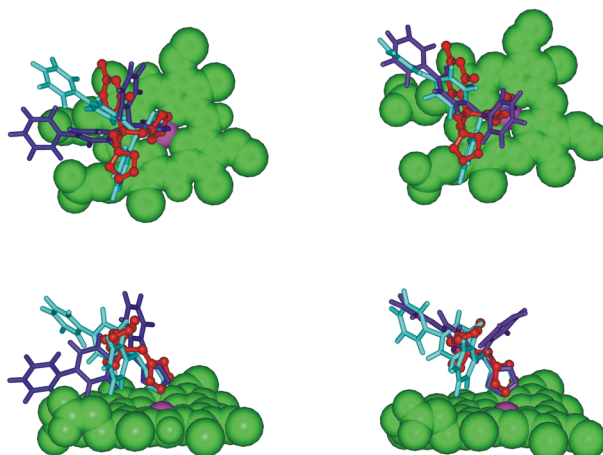
## 19.1 Positionierung der Inhibitoren

Für den Aufbau der Inhibitor-Komplexe wurden die Modellstrukturen nach der ersten GROMACS-Energieminimierung verwendet.

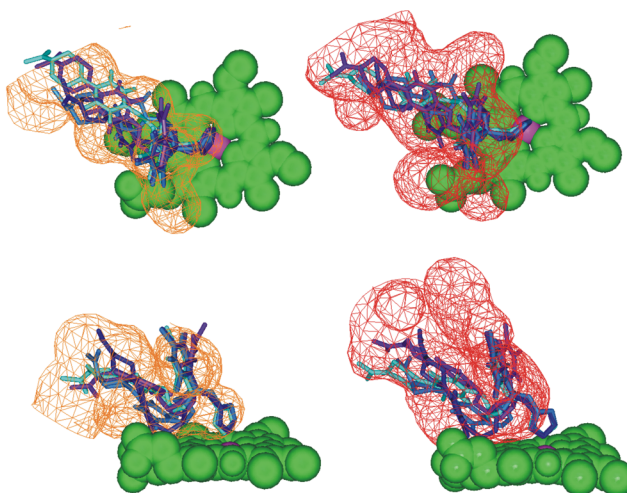


**Abbildung 19.1:** Positionierung der verschiedenen Ketoconazol-Stereoisomere. Oben in der Aufsicht, unten als Seitenansicht. Rechts die Positionierung im humanen Modell, links im Modell für *C. albicans*. Das RR-Stereoisomer ist cyan eingefärbt, das RS- hellblau, das SR- dunkelblau und das SS- violett. Rot ist zusätzlich das Fluconazol der Kristallstruktur dargestellt.

Basierend auf der Lage des Fluconazols in der Kristallstruktur der CYP51MTB wurde die Ausgangsposition der Inhibitoren konstruiert. Dazu wurde das Häm-Molekül der Kristallstruktur mit der der Modelle superpositioniert. Danach konnten die Imidazolringe der Inhibitoren auf die Position des Imidazolrings des kristallisierten Fluconazols gelegt werden. Abschließend wurden dann die Substituenten von Bifonazol und Ketoconazol so positioniert, dass sie möglichst deckungsgleich mit den Substituenten des Fluconazols zu liegen kommen (s. Abb.19.1 und 19.2). Da Ketoconazol über einen wesentlich längeren und flexibleren Rest verfügt, wurde bei dessen Positionierung weiterhin darauf geachtet, dass er möglichst gut die aktiven Zentren der jeweiligen Modelle ausfüllt (s. Abb 19.3).



**Abbildung 19.2:** Positionierung der Bifonazol-Enantiomere. Oben in der Aufsicht, unten als Seitenansicht. Rechts ist die Positionierung im humanen Modell dargestellt, links im Modell des *C. albicans*. Das R-Enantiomer ist cyan eingefärbt, das S-Enantiomer violett. Rot ist das Fluconazol der Kristallstruktur.



**Abbildung 19.3:** Anpassung des Ketoconazol-Substituenten an die aktiven Taschen der Modelle. Rechts für das aktive Zentrum des humanen Modells, links für das Zentrum des *C. albicans*-Modells. Die Stereoisomere des Ketoconazols sind analog zu Abb. 19.1 eingefärbt. Das rote Gitter zeigt den freien Raum des aktiven Zentrums im humanen Enzym-Modell, das orange Gitter den Raum im *C. albicans*-Modell.

Im Gegensatz zum Substrat ist die Positionierung der Inhibitoren deutlich konkreter und durch die Häm-Eisen-Bindung wesentlich genauer definiert.

## 19.2 Durchführung der Simulationen

Für die Simulation der Inhibitor-Enzym-Komplexe wurde das schon beschriebene Protokoll verwendet.

Auch diese Berechnungen wurden in einer isotonischen Kochsalzlösung durchgeführt. Die genauen Zusammensetzungen der umgebenden Medien aller Simulationen werden in den folgenden Tabellen 19.4 und 19.5 angegeben.

**Tabelle 19.4:** Größe der Simulationsboxen für die Berechnung der Ketoconazol-Komplexe

Enzym/ Ketoconazol	Box-Dimensionen x;y;z (nm)	N(H <sub>2</sub> O)	N(Na <sup>+</sup> )	N(Cl <sup>-</sup> )
<i>C. albicans</i> / RR	6,9; 8,5; 7,4	12064	50	46
<i>C. albicans</i> / RS	6,5; 7,9; 7,7	10807	46	42
<i>C. albicans</i> / SR	5,9; 8,0; 8,3	10431	44	40
<i>C. albicans</i> / SS	6,0; 8,4; 7,9	10585	45	41
Human / RR	6,0; 8,1; 7,9	10373	42	43
Human / SR	5,8; 8,5; 8,1	10295	42	43
Human / RS	6,1; 7,6; 8,1	10019	42	43
Human / SS	6,2; 8,1; 7,6	10119	42	43

**Tabelle 19.5:** Größe der Simulationsboxen für die Berechnung der Bifonazol-Komplexe

Enzym/ Bifonazol	Box-Dimensionen x;y;z (nm)	N(H <sub>2</sub> O)	N(Na <sup>+</sup> )	N(Cl <sup>-</sup> )
<i>C. albicans</i> / R	5,9; 8,7; 7,8	10784	44	40
<i>C. albicans</i> / S	5,9; 8,0; 8,3	12739	44	40
Human / R	6,3; 8,1; 7,5	10454	42	43
Human / S	6,0; 8,5; 7,8	10978	42	43

Die Imidazolringe der Inhibitoren wurden mit einer Kraft von  $1000 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}}$  auf ihrer Position gehalten. Die restlichen Strukturelemente der Inhibitoren durften sich schon während der Wasserboxequilibrierung frei bewegen.

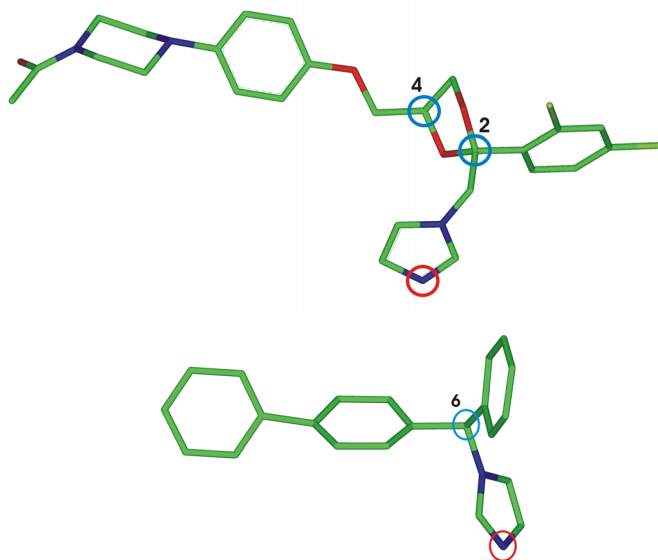
Unmittelbar nach der Wasserboxequilibrierung wurde auch für Bifonazol eine 1 ns und für Ketoconazol eine 1,5 ns lange Dynamiksimulation durchgeführt. Während der Simulation waren die Inhibitoren über das in Abschnitt 18 beschriebene Morsepotential mit dem Häm-Eisen verbunden. So konnten sich die Inhibitoren die optimale Lage im aktiven Zentrum suchen, während die Bindung an das Protein den natürlichen Gegebenheiten so gut wie möglich nachempfunden wurde.

### 19.3 Ergebnisse der Simulationen

Ziel der Simulationen ist es, neben der Enantioselektivität der humanen CYP51 zu Ketoconazol auch die Selektivität des Ketoconazols zur CYP51 des *C. albicans* zu erklären und diese mit den Ergebnissen der Bifonazolrechnungen zu vergleichen.

Zur Klärung der unterschiedlichen Bindungsstärken von Bifonazol und Ketoconazol an beiden Enzymen wird in den folgenden Abschnitten neben dem Verhalten der Proteine auch die Reaktion der unterschiedlichen Enantiomere in beiden Enzymen einbezogen.

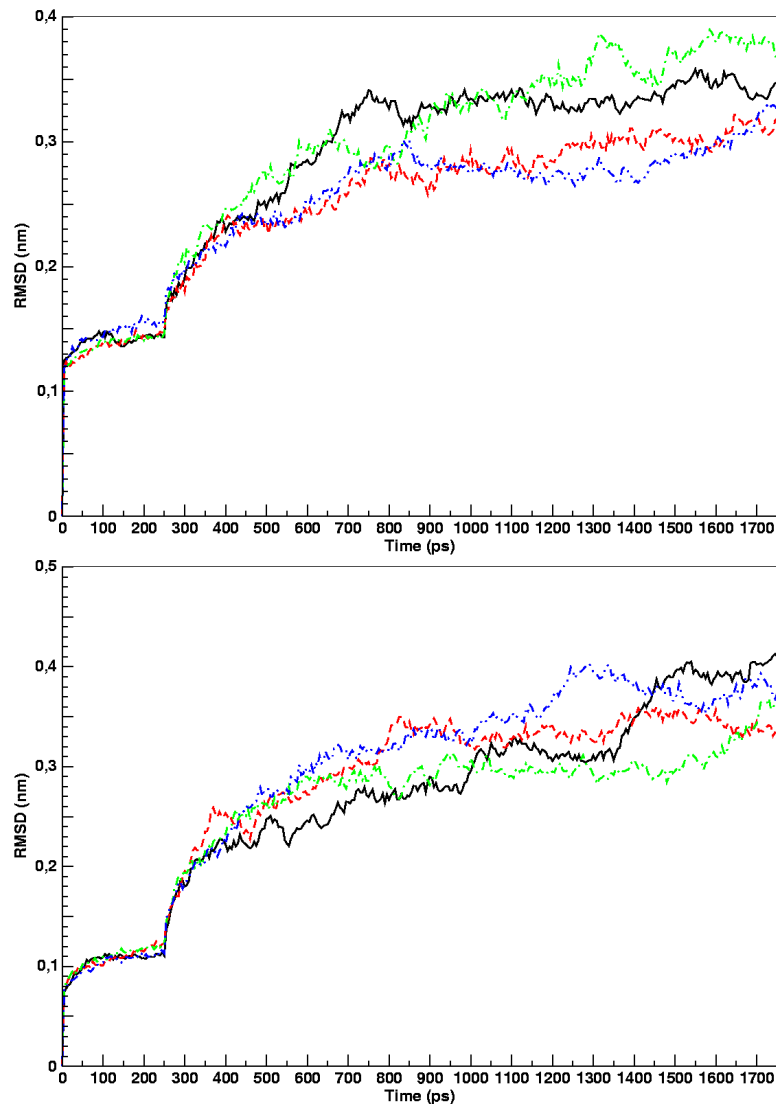
In den folgenden Abschnitten werden die Ziffern der chiralen C-Atome bei Ketoconazol nicht mehr explizit angegeben, sondern nur noch die Konfiguration der einzelnen Atome genannt. So ergeben sich für alle optischen Antipoden folgende Bezeichnungen: RR, RS, SR und SS. Dabei steht der erste Buchstabe für die Konfiguration des 2. C-Atoms und der zweite für die Konfiguration am C-Atom 4 (s. Abb.19.4). Analoges gilt für die Enantiomeren des Bifonazols; auch hier wird nicht die Ziffer des chiralen C-Atoms, sondern nur dessen Konfiguration im folgenden Text angegeben.



**Abbildung 19.4:** Strukturen der Inhibitoren. Oben Ketoconazol unten Bifonazol. Der rote Kreis markiert das Stickstoffatom, das die koordinative Bindung zum Häm-Eisen herstellt. Die blauen Kreise markieren die chiralen C-Atome.

### 19.3.1 Vergleich der RMSD-Werte

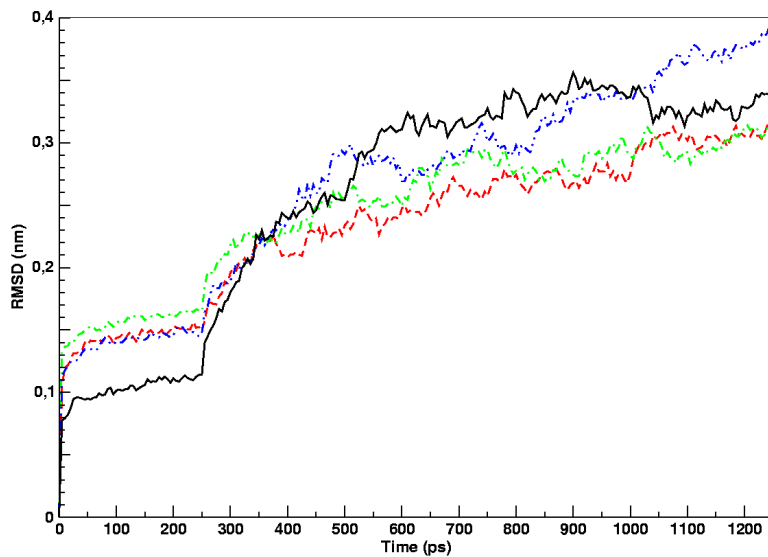
Der Verlauf der Enzym-Inhibitor-Komplex-Simulationen wird analog den vorherigen Untersuchungen durch die RMSD-Werte dokumentiert.



**Abbildung 19.5:** Verlauf der RMSD-Werte der Simulationen des Ketoconazols für das humane (oben) und das *C. albicans*-Modell (unten). In beiden Graphen stellen die schwarzen Kurven das RR-Enantiomer, die roten (---) das RS-Enantiomer, die grünen (-.-) das SR-Enantiomer und die blauen (-.-.-) Kurven das SS-Enantiomer dar.

Bei allen Simulationen pendelt der RMSD-Wert nach einer Equilibrierung von ca. 800 ps um Werte zwischen 0,25 und 0,4 nm.

Bei den Simulationen des Ketoconazols im humanen Enzym-Modell verlaufen die RMSD-



**Abbildung 19.6:** Verlauf der RMSD-Werte für die Simulationen des Bifonazols. Die schwarze Kurve stellt den Verlauf der Simulation für das R-Enantiomer, die rote Kurve (— — —) den Verlauf für das S-Enantiomer im Modell des *C. albicans* dar. Die grüne (· — ·) und die blaue Kurve (· — ·) zeigen den Verlauf der Bifonazol Simulationen im humanen Modell.

Werte der RR-, RS- und SS-Konfigurationen sehr gleichmäßig (s. Abb. 19.5, oberer Graph; schwarze, rote und blaue Kurve). Nach ca. 800 ps ist die Equilibrierung mit RMSD-Werten von 0,32 nm, 0,29 nm bzw. 0,28 nm erreicht und die Schwankungsbreite der RMSD-Werte ist danach mit  $\pm 0,02$  nm nur noch sehr gering.

Abweichend davon verläuft die Simulation der SR-Konfiguration (s. Abb. 19.5, oberer Graph, grüne Kurve). Hier sind auch nach der Equilibrierung größere Auslenkungen zu beobachten und damit steigt der RMSD-Wert an. Bei dieser Simulation pendelt sich der RMSD-Wert erst bei 1000 ps um einen Wert von 0,35 nm ein und schwankt dann immer noch mit  $\pm 0,04$  nm wesentlich stärker als bei den Simulationen der anderen Konfigurationen dieses Enzyms.

Bei den Ketoconazol-Komplex-Simulationen des *C. albicans*-Modells steigen alle RMSD-Werte auf höhere Niveaus als bei den humanen Komplexen.

Relativ gleichmäßig verlaufen nur die Simulationen der RS- und SR-Enantiomere (s. Abb. 19.5, unterer Graph, rote und grüne Kurve). Erst in den letzten Pikosekunden steigt auch hier der RMSD des SR-Komplexes auf einen Wert um die 0,34 nm an.

Die Simulationen der RR- und SS-Enantiomer-Komplexe verlaufen mit größeren Schwankungen des RMSD-Wertes, so dass hier sogar Maximalwerte von über 0,4 nm erreicht



werden. Besonders auffällig ist die Simulation des RR-Ketoconazol-Enzym-Komplexes, da dieser drei Plateaus beschreibt. Das erste von 700-1000 ps bei 0,27 nm, das zweite von 1100-1350 ps bei 0,32 nm und das letzte von 1500-1750 ps bei ca. 0,41 nm. Während dieser Plateau-Zustände ist die Schwankung des RMSD-Wertes mit  $\pm 0,01$  nm sehr gering.

Die Simulationen des Bifonazols im *C.albicans*-Modell verlaufen ähnlich für beide Enantiomere. Zwar beschreiben beide mit 0,32 nm für das R-Enantiomer (s. Abb. 19.6, schwarze Kurve) bzw. 0,25 nm für das S-Enantiomer (s. Abb. 19.6, rote Kurve) ein unterschiedliches RMSD-Niveau, das aber nach 700-1000 ps relativ konstant bleibt. Bei 1000 ps bewegen sich beide Niveaus nochmals aufeinander zu, um dann bei Werten um die 0,3 nm bzw. 0,28 nm für die restliche Simulationsdauer zu verharren.

Simulationen für die Bifonazol-Komplexe des humanen Enzyms verhalten sich dagegen deutlich unterschiedlich. Während sich der RMSD-Verlauf des R-Enantiomers (s. Abb. 19.6, grüne Kurve) nach 500 ps auf einem Niveau von 0,28 nm einpendelt, steigt der RMSD-Wert des S-Enantiomers (s. Abb. 19.6, blaue Kurve) in mehreren Stufen bis zum Ende der Simulation auf einen Wert von 0,4 nm an.

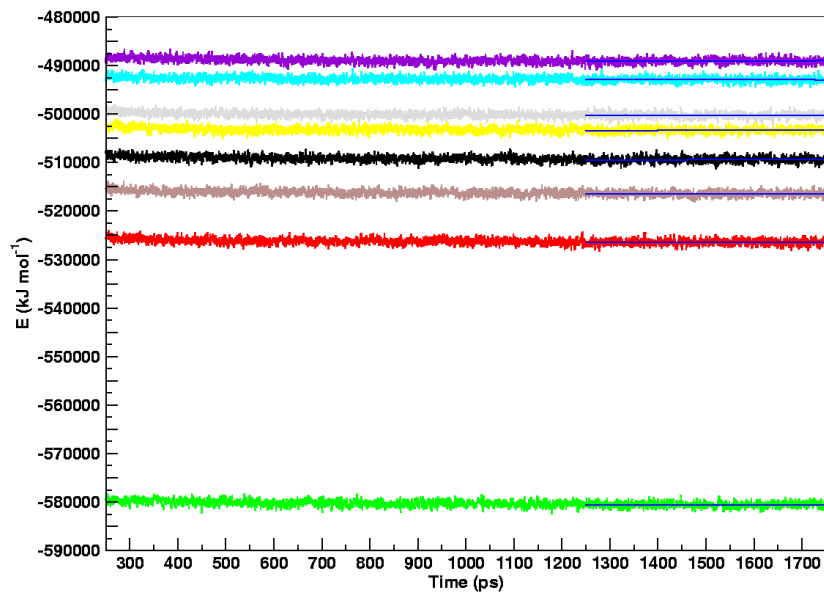
### 19.3.2 Verlauf der potentiellen Energie

Um zu zeigen, dass trotz der großen RMSD-Wert-Schwankungen die Simulations-Ensembles equilibriert sind, werden in den folgenden Abbildungen die Energieverläufe aller Inhibitor-Komplex-Simulationen dargestellt. Jede Kurve repräsentiert hierbei den Verlauf einer Simulation mit den unterschiedlichen Inhibitor-Stereoisomeren im aktiven Zentrum der beiden Modellstrukturen.

Da aus dem Verlauf der Energiekurven nur wenig zu erkennen ist, wurde für die letzten 500 ps jeder Simulation eine Regressionsgerade berechnet, deren Geradengleichungen wie folgt aussehen:

#### 1. Geradengleichungen der Ketoconazol-Simulationen im humanen Modell:

- RR-Konfiguration:  $E = -503.660 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 0,211 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- RS-Konfiguration:  $E = -499.970 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,187 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- SR-Konfiguration:  $E = -489.350 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 0,202 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- SS-Konfiguration:  $E = -492.740 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,113 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$



**Abbildung 19.7:** Verlauf der potentiellen Energie aller Ketoconazol-Komplex-Simulationen. Die Kurven (schwarz, rot, grün und braun) beschreiben den Verlauf der Simulationen mit den RR-, RS-, SR- bzw. SS-Stereoisomeren im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells. Gelb, grau, violett und cyan stehen für den Verlauf der Simulationen der RR-, RS-, SR- bzw. SS-Stereoisomeren im aktiven Zentrum des humanen Modells. Für jeden Energieverlauf ist ab 1250 ps eine blaue Regressionsgerade eingezeichnet.

## 2. Geradengleichungen der Ketoconazol-Simulationen im *C. albicans*-Modell:

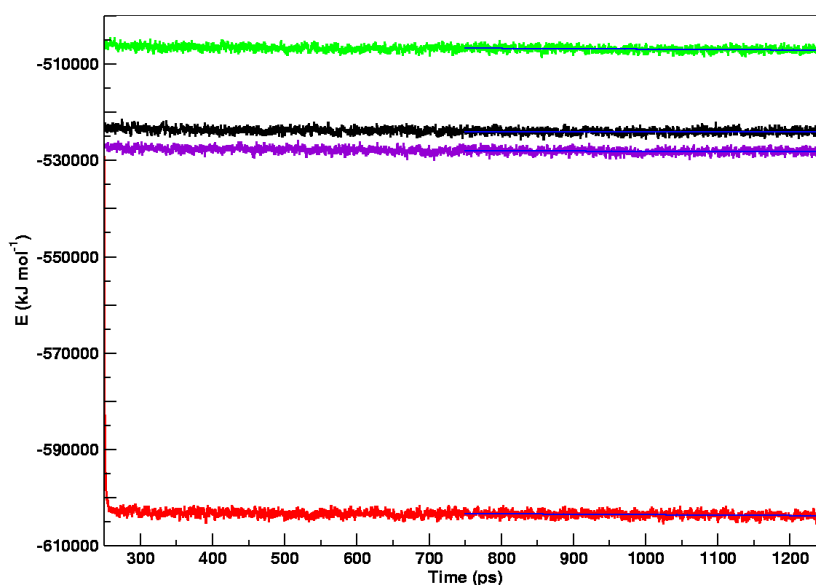
- RR-Konfiguration:  $E = -580.530 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,003 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- RS-Konfiguration:  $E = -586.480 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 0,051 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- SR-Konfiguration:  $E = -509.660 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 0,116 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- SS-Konfiguration:  $E = -516.530 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,073 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$

## 3. Geradengleichungen der Bifonazol-Simulationen im humanen Modell:

- R-Enantiomer:  $E = -523.950 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 0,043 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- S-Enantiomer:  $E = -527.790 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,355 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$

## 4. Geradengleichungen der Bifonazol-Simulationen im *C. albicans*-Modell:

- R-Enantiomer:  $E = -523.290 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,706 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$
- S-Enantiomer:  $E = -602.640 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 0,801 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}} \cdot t$



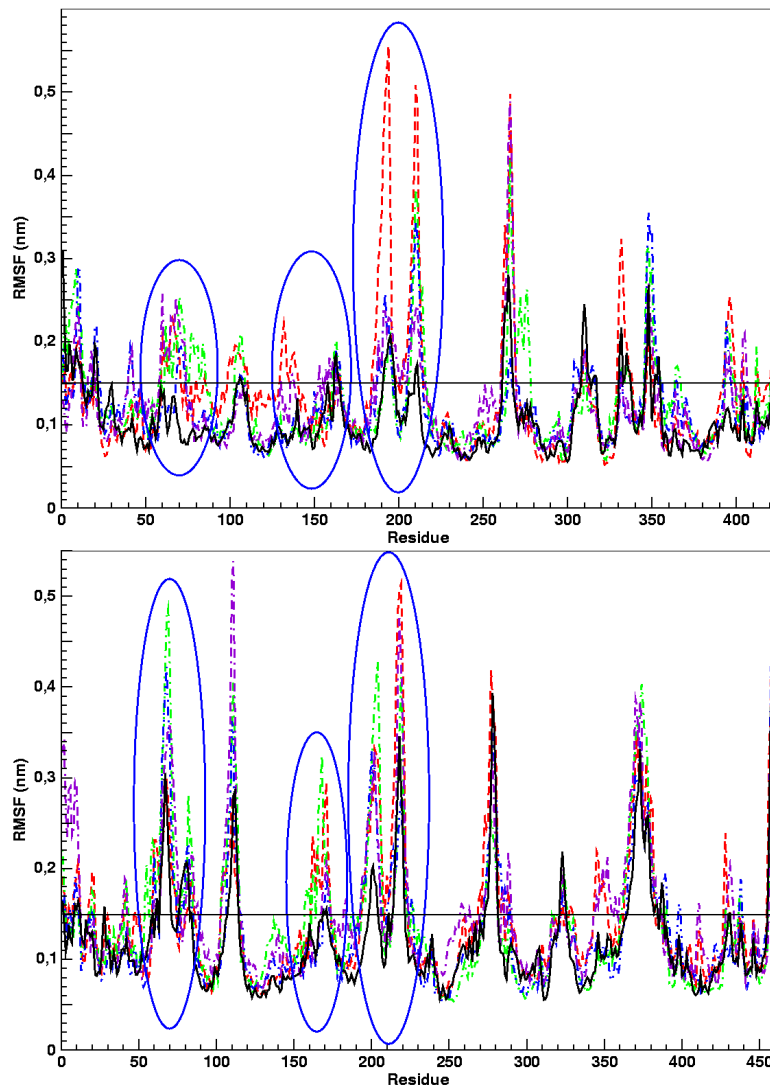
**Abbildung 19.8:** Verlauf der potentiellen Energie aller Bifonazol-Komplex-Simulationen. Die schwarze und die rote Kurve zeigen den Verlauf für das R- bzw S-Enantiomer im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells, die grüne und die violette Kurve zeigen den Energieverlauf im aktiven Zentrum des humanen Enzym-Modells. Für alle vier Simulationen ist ab 750 ps eine Regressionsgerade in blau eingezeichnet.

Bei allen Gleichungen für die Ketoconazol-Simulationen ist die Steigung mit Werten zwischen  $+0,211$  und  $-0,187 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}}$  nur noch sehr gering. Die Steigungen der Simulationen des Bifonazols sind mit bis zu  $-0,805 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}}$  zwar deutlich höher, aber im Vergleich zur gesamten Energie sind sie irrelevant. Somit können sämtliche Simulationen als equilibriert betrachtet werden.

### 19.3.3 RMS-Fluktuation

Die Darstellung der RMS-Fluktuationen (RMSF) dient der Ermittlung derjenigen Strukturelemente, die für Schwankungen des RMSD-Wertes während der Simulationen mit den Inhibitoren verantwortlich sind. Des Weiteren soll anhand der RMS-Fluktuation festgestellt werden, ob durch die Inhibitoren andere Bewegungen des Proteins induziert werden als bei den Modellen mit freiem aktiven Zentrum.

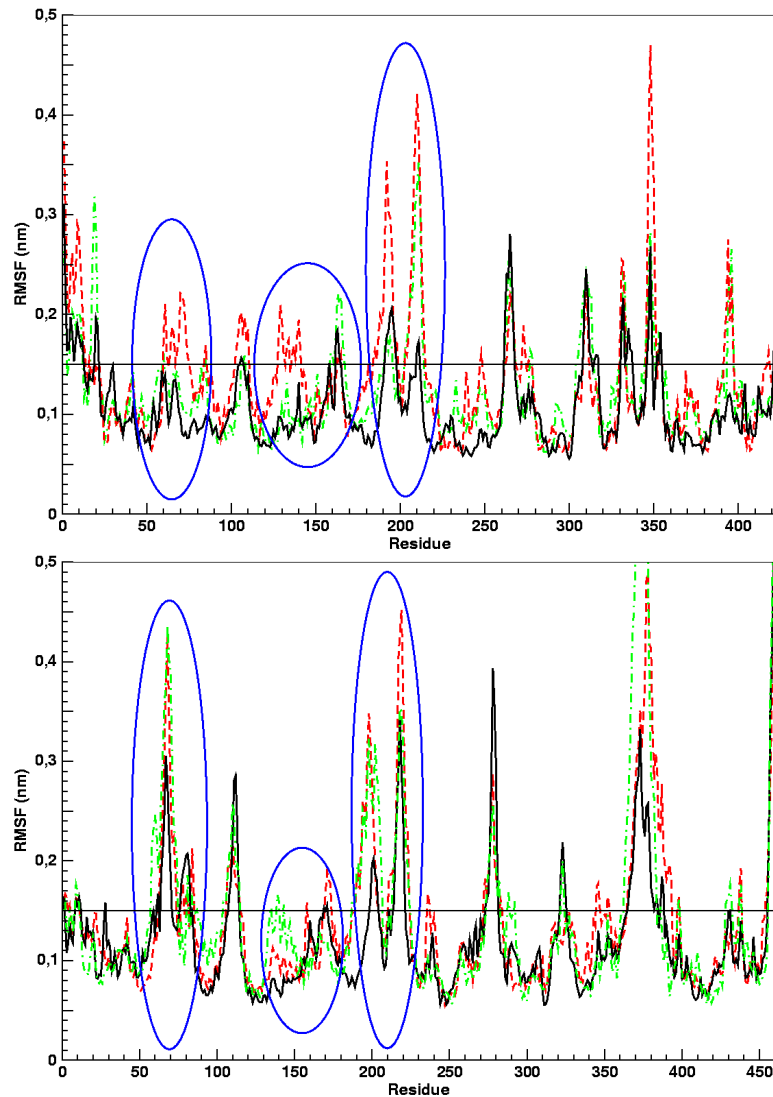
In Abb. 19.9 und 19.10 sind die RMSF-Werte aller Simulationen im Vergleich zu denen mit freiem aktiven Zentrum dargestellt. Weiterhin sind die schon in der Einleitung als flexibel angenommenen Bereiche in beiden Abbildungen durch blaue Ellipsen markiert. Die Ellipse im Sequenzbereich von 60-90 markiert den BC-Loop, die zweite im Se-



**Abbildung 19.9:** RMS-Fluktuation der Ketoconazol-Simulationen. Im oberen Graphen sind die Werte für die Simulationen im humanen Modell, im unteren Graphen die Werte für das *C. albicans*-Modells dargestellt. Die blauen Ellipsen markieren flexibel definierte Sequenz-Bereiche. In beiden Graphen bedeutet die rote Kurve (---) die Werte für die RR-Konfiguration, die grüne (·-·-) für die RS-, die blaue (-·-) für die SR und die violette (·-·) die Werte für die SS-Konfiguration. Die schwarze Kurve repräsentiert als Vergleich die Werte des Enzyms mit freiem aktiven Zentrum.

quenzbereich 130-180 den C-Terminus der F-Helix, den FG-Loop und den N-Terminus der G-Helix. In der dritten Markierung von 190-230 bilden sich meistens zwei charakteristische Peaks aus. Dabei beschreibt der erste die RMS-Fluktuation des C-Terminus der G-Helix und der zweite die RMS-Fluktuation des N-Terminus der I-Helix.

Bei allen vier Graphen ist deutlich zu erkennen, dass sich die Struktursegmente in den

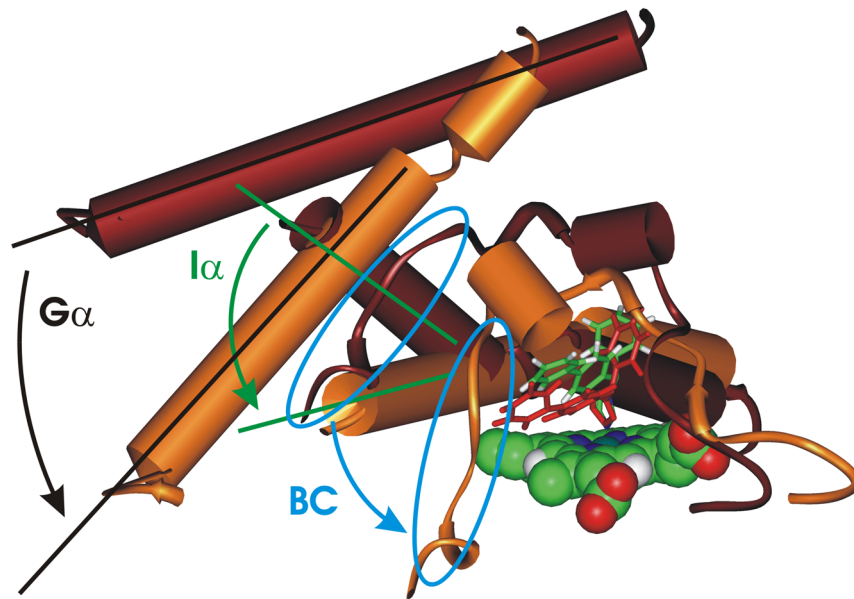


**Abbildung 19.10:** RMS-Fluktuation der Bifonazol Simulationen. Im oberen Graphen sind die Werte beider Bifonazol Enantiomere im humanen Modell, im unteren Graphen die Werte des *C. albicans*-Modells dargestellt. Die blauen Ellipsen markieren flexibel definierte Sequenz-Bereiche. In beiden Graphen zeigt die rote Kurve (---) die Werte für das R-Enantiomer, die grüne (- · -) die für das S-Enantiomer. Die schwarze Kurve repräsentiert als Vergleich die Werte des Enzyms mit freiem aktiven Zentrum.

markierten Bereichen bei den Simulationen mit Inhibitoren deutlich stärker bewegen als bei denen ohne Liganden.

Vor allem die RMSF-Werte des BC-Loops und der I-Helix steigen mit Werten um 0,5 nm besonders stark an.

Abb. 19.11 zeigt die Veränderungen des Proteinrückgrats an, die durch die erhöhten



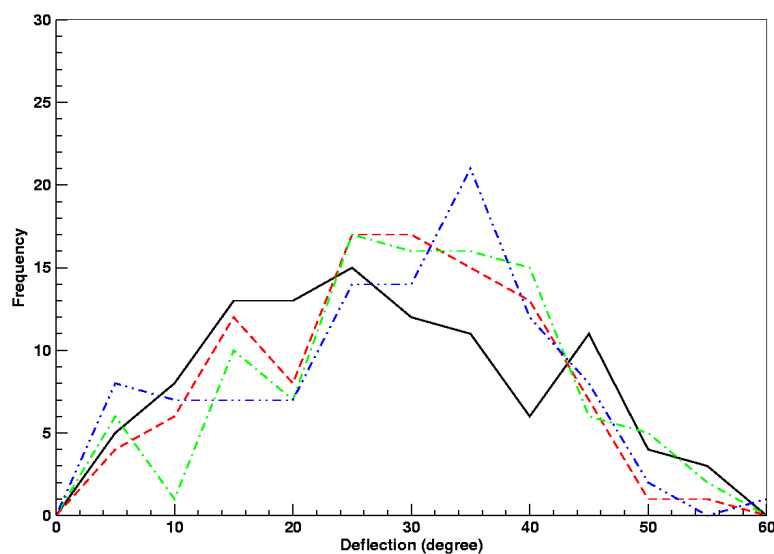
**Abbildung 19.11:** Flexible Bereiche des CYP51. Gezeigt sind die Lage des BC-Loops, der G- und der I-Helix einer Struktur vor (dunkelrot) und nach der Simulation (orange). Daneben ist die Bewegungsrichtung der entsprechenden Sekundärstrukturen eingezeichnet. In schwarz die Richtung der G-Helix ( $G\alpha$ ), in grün die der I-Helix ( $I\alpha$ ) und in blau für den BC-Loop (BC).

RMSF-Werte dokumentiert werden. Es ist gut zu erkennen, wie sich durch das Abkippen der G- und I-Helix der durch den BC-Loop gebildete Kanal schließt, was allerdings nicht immer vollständig erfolgt. Vielmehr können auch je nach Inhibitor partiell geschlossene Protein-Konformationen beobachtet werden. Dabei werden die in Abb. 19.11 gezeigten Bewegungen nur teilweise ausgeführt.

### 19.3.4 Auslenkung des Imidazolrings am Häm-Eisen

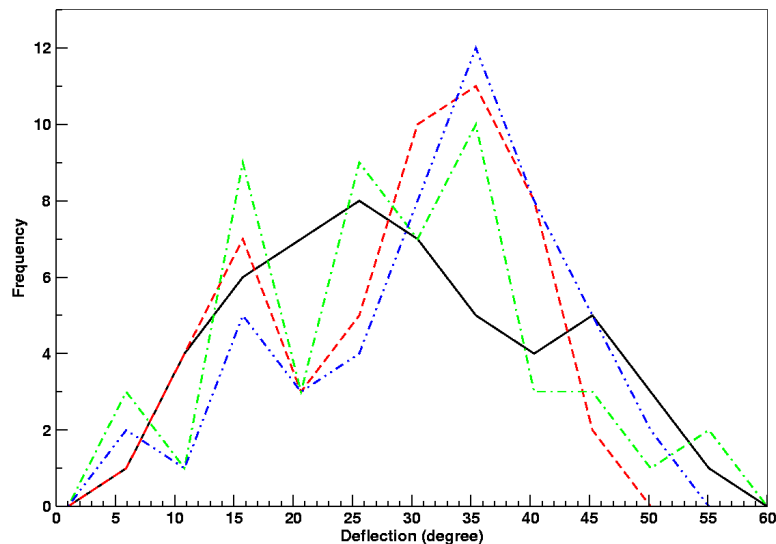
Ein wichtiger Parameter für die Bindung eines Inhibitors ist die Geometrie der Bindung des Häm-Eisens am Stickstoff des Imidazolrings. Da selbst in der Kristallstruktur nicht ganz die optimale Bindungsgeometrie gemessen werden kann (s. Tabelle 18.1), soll die Geometrie der Eisen-Stickstoff-Bindung für alle Simulationen untersucht werden. Der hier gemessene Winkel entspricht dem in Abb. 18.5 gezeigten  $\phi$ -Winkel.

Wie sich aus Abb. 19.12 entnehmen lässt, ist zwischen den Stereoisomeren des Ketoconazols nach 1,25 ns Simulation kein Unterschied erkennbar. Daher wurden alle Dynamiken des Ketoconazols um 500 ps verlängert, dann die Auslenkung des Winkels



**Abbildung 19.12:** Verteilung der Auslenkungen des Imidazolrings der Ketoconazol-Stereoisomere im aktiven Zentrum des humanen Enzyms im Zeitraum von 750-1250 ps. In schwarz ist die Häufigkeit des Winkels für die RR-, in rot (---) für die RS-, in grün (-.-.-) für die SR- und in blau (·-·-·) für die SS-Konfiguration angegeben.

während der letzten 250 ps gemessen und wiederum als Histogramm aufgetragen.

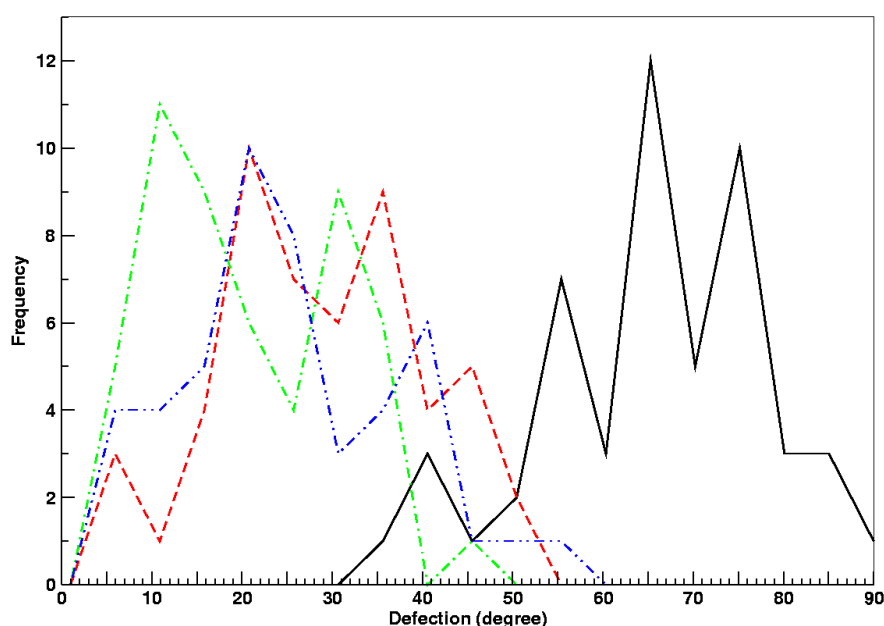


**Abbildung 19.13:** Verteilung der Auslenkungen des Imidazolrings für die Ketoconazol-Stereoisomere im aktiven Zentrum des humanen Enzyms im Zeitraum von 1,5-1,75 ns. In schwarz ist die Häufigkeit des Winkels für die RR-, in rot (---) für die RS-, in grün (-.-.-) für die SR- und in blau (·-·-·) für die SS-Konfiguration angegeben.

In Abb. 19.13 sind dann Unterschiede im Auslenkverhalten des Ketoconazols-Imidazol-

rings zu erkennen. Wichtig sind dabei die Winkel bis etwa  $30^\circ$ . Bei größeren Auslenkungen ist die Bindung nur noch relativ schwach und ungerichtet, da sie dann nur noch auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht.

Werden nach diesen Kriterien die Verteilungen für die vier Konfigurationen des Ketoconazols im humanen CYP51-Modell ausgewertet, wird die SR-Konfiguration (Abb. 19.13, grüne Kurve) im Vergleich zu den anderen Strukturen am häufigsten in den kleinen Auslenkungen gefunden. Auf dem zweiten Rang folgt die RS-Konfiguration (Abb. 19.13, rote Kurve) mit einer nur gering höheren Häufigkeit als die beiden RR- und SS-Strukturen (Abb. 19.13, schwarze bzw. blaue Kurve).

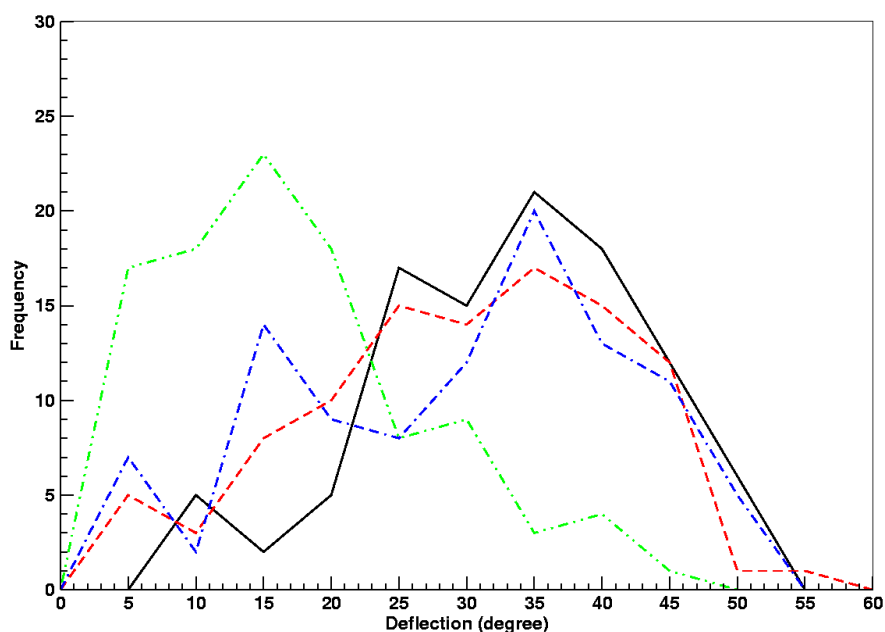


**Abbildung 19.14:** Verteilung der Auslenkungen des Imidazolrings der Ketoconazol-Stereoisomere im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells im Zeitraum von 1,5-1,75 ns. In schwarz ist die Häufigkeit des Winkel für die RR-, in rot (---) für die RS-, in grün (·-·) für die SR- und in blau (·-·) für die SS-Konfiguration angegeben.

Bei den Simulationen des Ketoconazols im aktiven Zentrum des *C. albicans* ist das Verhältnis deutlich zugunsten der SR-Konfiguration verschoben. Größere Auslenkungen werden für die RS- und SS-Konfigurationen gemessen. Mit einem Maximum bei  $20^\circ$  liegen diese aber immer noch in Bereichen, in denen koordinative Bindungsanteile möglich sind. Für die RR-Konfiguration können nur noch Auslenkungen über  $30^\circ$  gemessen werden.

Die Simulationen des Bifonazols im aktiven Zentrum der Modelle wurden nicht verlän-





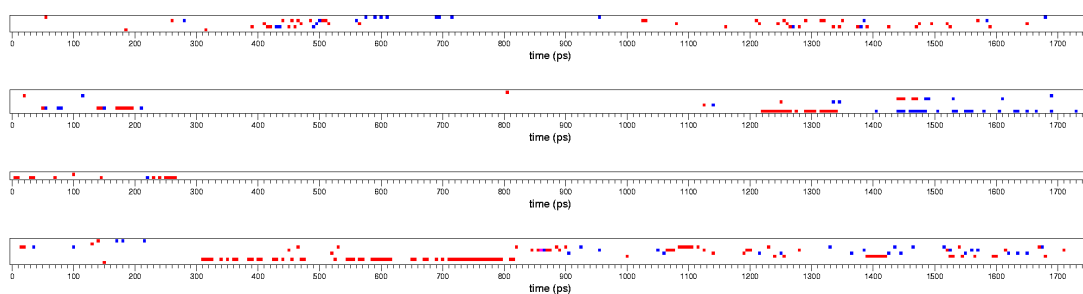
**Abbildung 19.15:** Verteilung der Auslenkungen des Imidazolrings der Bifonazol-Enantiomere sowohl im aktiven Zentrum des humanen als auch des *C. albicans*-Modells im Zeitraum von 750-1250 ps. In schwarz ist die Häufigkeit des Winkels für das R-, in rot (— — —) für das S-Enantiomer im *C. albicans* dargestellt. In grün (· — ·) ist das R- und in blau (· — ·) das S-Enantiomer im aktiven Zentrum des humanen Enzyms angegeben.

gert, da schon nach einer freien Dynamik von 1 ns Unterschiede im Verhalten festgestellt werden konnten. Während sich die Enantiomere im aktiven Zentrum des *C. albicans* wie erwartet sehr ähnlich verhalten, zeigen sie im aktiven Zentrum des humanen Modells deutliche Unterschiede. Überraschend war, dass für das Bifonazol beim *C. albicans* in der Hauptsache nur relativ große Auslenkungen des Imidazolrings von der Bindungsnormalen gemessen werden (s. Abb. 19.15, schwarze bzw. rote Kurve). Im humanen Enzym hingegen werden deutlich häufiger geringe Auslenkungen des Rings gemessen (s. Abb. 19.15, grüne bzw. blaue Kurve).

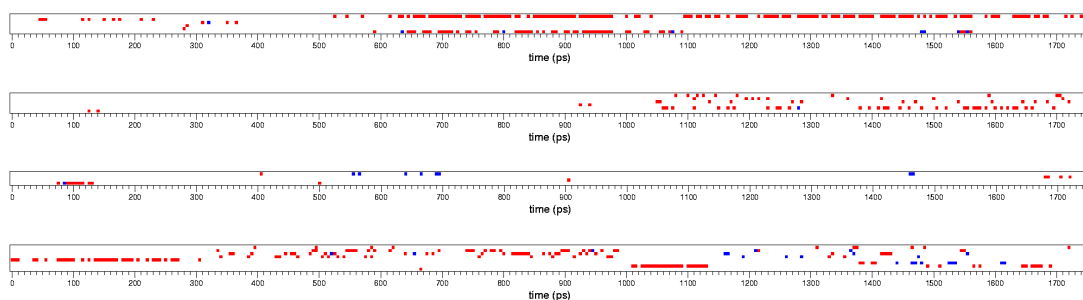
Es fällt auf, dass das R-Enantiomer des Bifonazols beim humanen Modell deutlich häufiger in Konformationen mit nur geringer Auslenkung des Imidazolrings vorkommt als das S-Enantiomer. Das führt zu dem Schluss, dass demzufolge das R-Enantiomer im humanen Enzym als Inhibitor dem S-Enantiomer vorgezogen wird.

### 19.3.5 H-Brücken des Ketoconazols mit den Protein-Modellen

Da Ketoconazol über funktionelle Gruppen mit der Fähigkeit zur Ausbildung von H-Brücken verfügt, werden in diesem Abschnitt alle Stereoisomere des Ketoconazols in beiden Modellen auf potentielle H-Brücken überprüft. Um eine H-Brücke zu erkennen, muss der Abstand zwischen H-Atom und Akzeptor-Atom  $2,5 \text{ \AA} \pm 0,1$  sowie der Winkel zwischen Donor-Atom, Wasserstoff und Akzeptor-Atom  $60^\circ \pm 1$  betragen.



**Abbildung 19.16:** H-Brücken der Ketoconazol-Konfigurationen bei der humanen Modellstruktur. Von oben nach unten wird zuerst das Vorkommen von H-Brücken für die RR-, dann für die RS-, für die SR- und schließlich für die SS-Konfiguration gezeigt.



**Abbildung 19.17:** H-Brücken der Ketoconazol-Konfigurationen bei der Modellstruktur von *C. albicans*. Die H-Brücken werden in der Reihenfolge analog zu Abb. 19.16 aufgeführt.

In keiner der in Abb. 19.16 und 19.17 gezeigten Simulationen bildet ein Ketoconazol-Stereoisomer über einen längeren Zeitraum eine stabile H-Brücke mit dem Protein. Wenn H-Brücken gebildet werden dann werden sie mit dem Carbonyl-Sauerstoff der Amidgruppe des Ketoconazols ausgebildet. Dieser Sauerstoff bildet zwar häufig H-Brücken aus, doch sie bestehen in der Regel nur sehr kurz und werden häufig mit wechselnden Partnern gebildet. Wenn H-Brücken unter Einbeziehung von Wasser entstehen, wird bei diesen häufig auch das Wassermolekül durch ein anderes ersetzt.

Die einzige Ausnahme scheint auf den ersten Blick bei der RR-Konfiguration im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells vorzuliegen, da eine H-Brücke ab etwa 600 ps bis zum Ende der Simulation relativ regelmäßig detektiert wird. Allerdings stellt diese ein Artefakt dar, das durch die starke Auslenkung des Imidazolrings zu Stande kommt. Denn dadurch sind die Bedingungen für eine H-Brücke zwischen dem Imidazol-Stickstoff und dem Threonin 243 der I-Helix erfüllt. Diese H-Brücke wird aber real nie gebildet, denn zum einen bildet das Threonin mit dem Sauerstoffatom des Glycin 239 eine H-Brücke und zum anderen ist auch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Häm-Eisen und dem Imidazol-Stickstoff immer stärker als eine alternative H-Brücke in der Nähe des Eisens. Somit konnte auch bei dieser Konfiguration des Ketoconazols keine stabile H-Brücke gefunden werden.

### 19.3.6 Clusteranalyse und repräsentative Strukturen

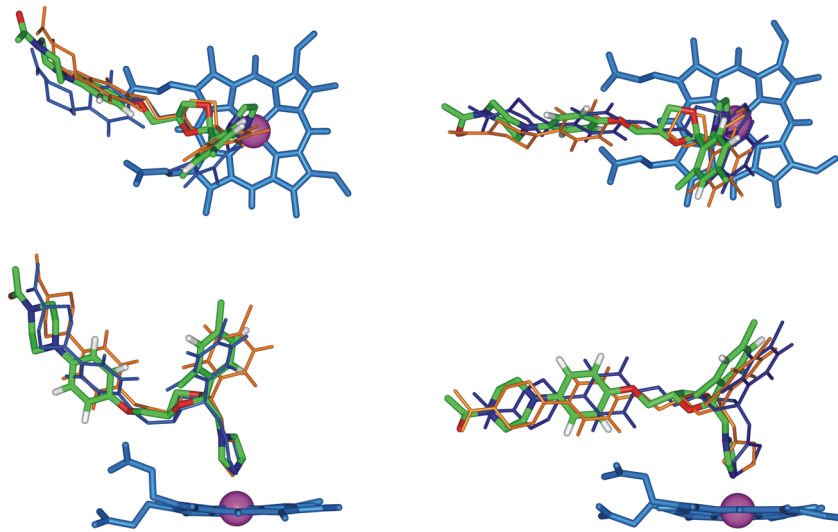
Wie schon bei den Substrat-Simulationen werden auch hier durch eine Clusteranalyse repräsentative Strukturen der Inhibitor-Komplexe ermittelt. Für diese Simulationen werden ebenfalls die letzten 250 ps einer jeden Dynamik der Clusteranalyse unterzogen.

Wie bei den Lanosterol-Simulationen konnten auch hier mit der Routine `NMRCLUST` 10 bis 15 Cluster gefunden werden. Durch die Rigidität der Eisen-Stickstoff-Bindung sind die Inhibitoren allerdings in ihrer Beweglichkeit so sehr eingeschränkt, dass nach Vergleich der Lage der Inhibitoren von den ursprünglichen Clustern in der Regel nur noch 3 bis 5 Strukturen verbleiben.

Wie in Abb. 19.18 exemplarisch für die SR-Konfiguration gezeigt wird, ändert sich die Lage der Inhibitoren am Ende der Simulation nur noch geringfügig. Hauptsächlich kommt es durch das Abkippen des Imidazolrings zu Verschiebungen der Substituenten. Dabei wird der lange Substituent des Ketoconazols durch dessen Hebelwirkung am stärksten beeinflusst.

Wesentlich interessanter ist die Lage der einzelnen Stereoisomere zueinander. So ist in Abb. 19.19 zu erkennen, dass die drei schwächer wirkenden Konfigurationen RS-, RR- und SS- sowohl im aktiven Zentrum des *C. albicans* als auch im humanen Zentrum eine andere Position einnehmen als die SR-Konfiguration. Daneben ist deutlich die unterschiedliche Lage der SR-Konfiguration des Ketoconazols im aktiven Zentrum des *C. albicans* im Vergleich zum humanen Enzym zu erkennen.

Die Enantiomere des Bifonazols unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Lage im



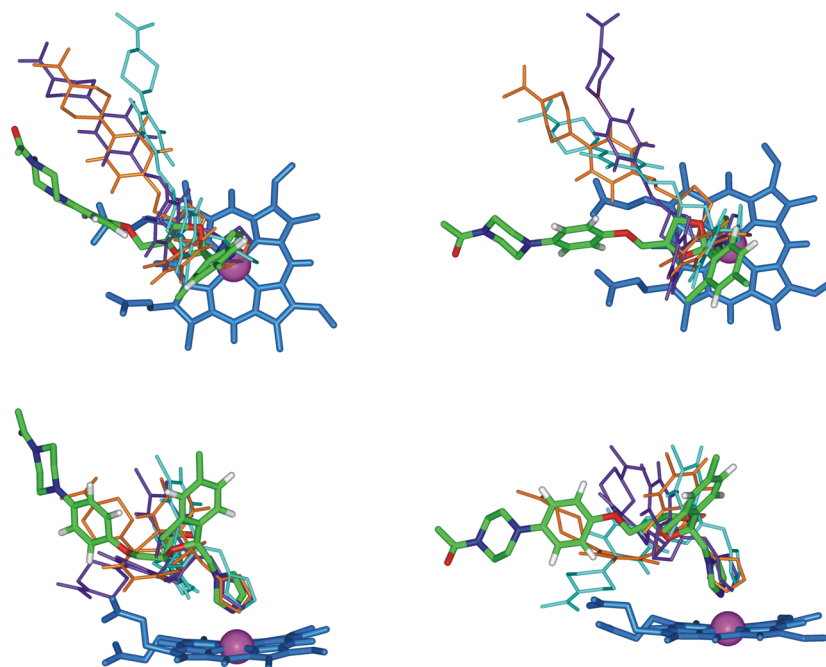
**Abbildung 19.18:** Beweglichkeit des SR-Stereoisomers des Ketoconazols links im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells, rechts im humanen Modell während der letzten 250 ps. Dargestellt sind je drei Strukturen des Ketoconazols (orange, blau, Atomtypen) relativ zur Lage des Häms (blau, Eisen magenta).

aktiven Zentrum beider Enzyme (s. Abb. 19.20). So ist auch zu erklären, weshalb es keine Unterschiede in der Wirksamkeit beider Enantiomere gibt. Größere Unterschiede sind zwischen den beiden unterschiedlichen Spezies zu erkennen, wie dies schon bei den Simulationen des Lanosterols der Fall war.

### 19.3.7 Interaktionen der Inhibitoren mit den Enzymen

Um Unterschiede zwischen den Spezies erkennen zu können, werden in diesem Abschnitt all diejenigen Aminosäuren vorgestellt, die mit den einzelnen Inhibitoren interagieren. Hierfür werden neben dem direkt angrenzenden Proteinrückgrat auch alle Aminosäuren im Umkreis von 4 Å zu den Inhibitoren dargestellt.

Bei den Ketoconazol-Stereoisomeren werden im Folgenden nur die aktiven Zentren des SR-Isomers berücksichtigt, da diese die am stärksten bindende Struktur darstellt und so für den Vergleich zwischen den beiden Spezies besonders interessant ist. Bei den anderen Formen ergeben sich relativ zum Häm zwar andere Lagen, aber die Proteinumgebung bleibt sehr ähnlich. Das ist durch die in Abschnitt 19.3.3 beschriebene hohe Beweglichkeit bestimmter Teile des aktiven Zentrums zu erklären, die sich damit



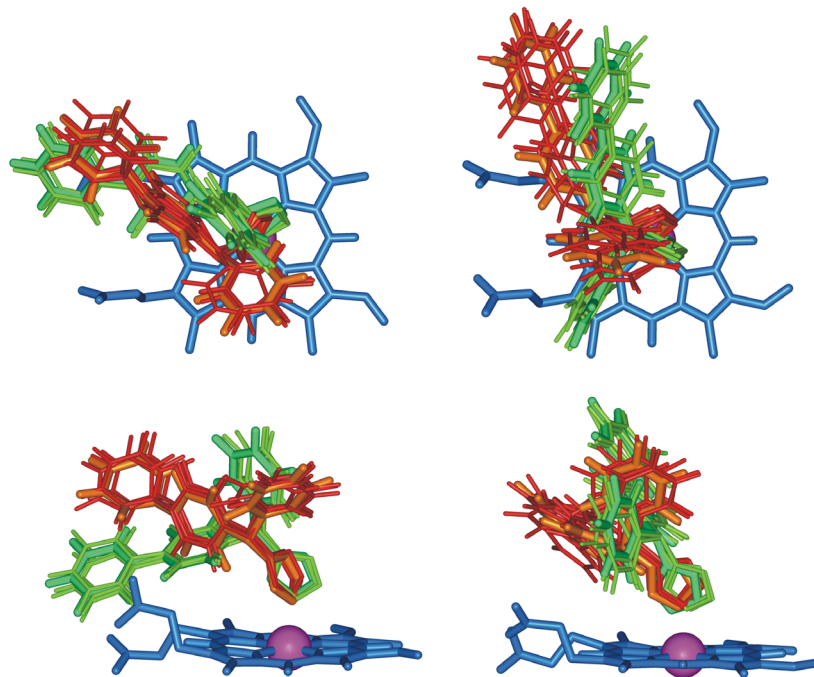
**Abbildung 19.19:** Lage der Ketoconazol-Stereoisomere in den letzten 250 ps einer Dynamik. Links im aktiven Zentrum von *C. albicans*, rechts im humanen Enzym. Atomfarben ist die SR-, in cyan die RS-, in violett die RR- und in orange die SS- Konfiguration dargestellt. Neben den Überlagerungen wird auch die Stellung des Häms (blau) mit dessen Eisen-Zentralatom (magenta) gezeigt.

an die jeweilige Konfiguration eines Inhibitors anpassen können.

Da Ketoconazol erheblich größer ist als das Substrat, können auch deutlich mehr Aminosäureseitenketten mit dem Molekül interagieren als dies bei Lanosterol der Fall ist. In den Abbildungen 19.21 und 19.22 sind die aktiven Zentren beider Spezies mit der SR-Konfiguration des Ketoconazols dargestellt. Im Vergleich der beiden Zentren sind nur geringe Unterschiede zwischen den Spezies zu erkennen.

Von Interesse sind die durch das Ketoconazol zusätzlich adressierten Aminosäuren Thr54 und Thr55 im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells. Da beide Threonine mit geeigneten Partnern H-Brücken ausbilden können, sollte eine weitere Erhöhung der Wirksamkeit erreichbar sein. Leider werden diese beiden Aminosäuren auch im humanen Modell gefunden, so dass ein Adressieren keinen Beitrag zur Spezifität eines Inhibitors ergeben würde. In Abb. 19.22 ist nur Threonin 54 dargestellt, da in dieser Struktur das Threonin an Position 55 außerhalb des definierten Abstandes liegt.

Zur Beschreibung der aktiven Zentren während der Simulation des Bifonazol-Komplexes

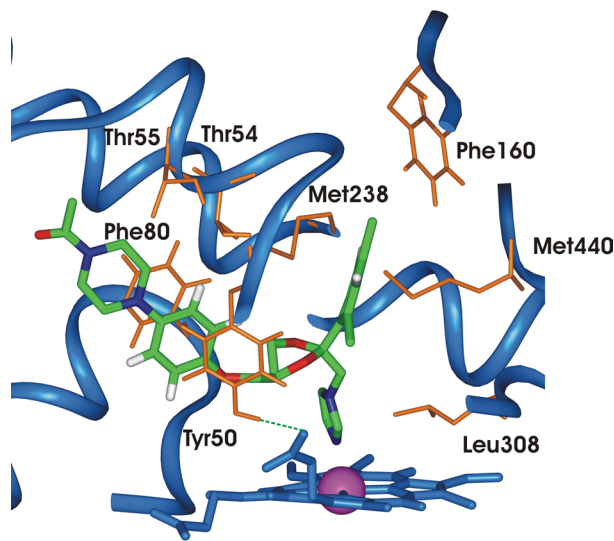


**Abbildung 19.20:** Lage der Bifonazol-Enantiomeren in den letzten 250 ps der Dynamik. Links im aktiven Zentrum von *C. albicans*, rechts im humanen Enzym dargestellt. Grün sind mehrere Strukturen des R-Enantiomers und rot des S-Enantiomers im jeweiligen Enzym gezeigt. Beide Überlagerungen sind relativ zum Häm (blau) mit dem komplexierten Eisen (magenta) angegeben.

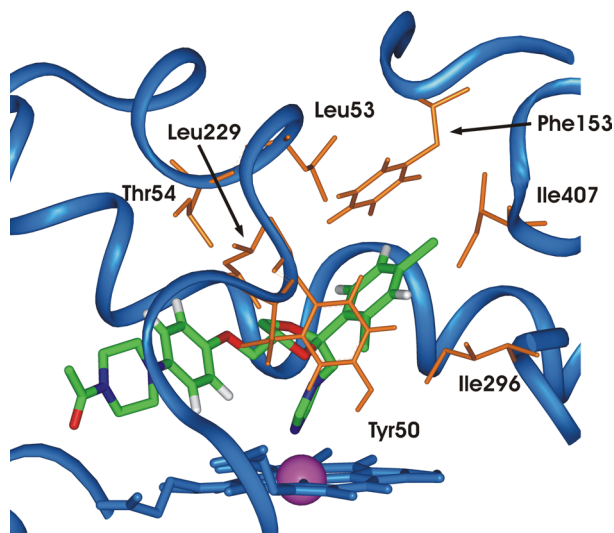
wurde in entsprechender Weise vorgegangen. Da sich die Enantiomere des Bifonazols jedoch sehr ähnlich verhielten, konnten hier beide Enantiomere in ihrer Komplexstruktur als Überlagerung dargestellt werden.

Die Lage der beträchtlich kleineren Bifonazol-Enantiomere stimmt mehr mit der des Lanosterols überein, als das beim Ketoconazol der Fall ist. Durch das Fehlen einer größeren Seitenkette werden allerdings tiefere Regionen der aktiven Taschen nicht adressiert. Daneben kann man beim Vergleich der Enantiomere erkennen, dass sich die Lage der Enantiomere im Modell des *C. albicans* stärker ähnelt als im humanen Modell.

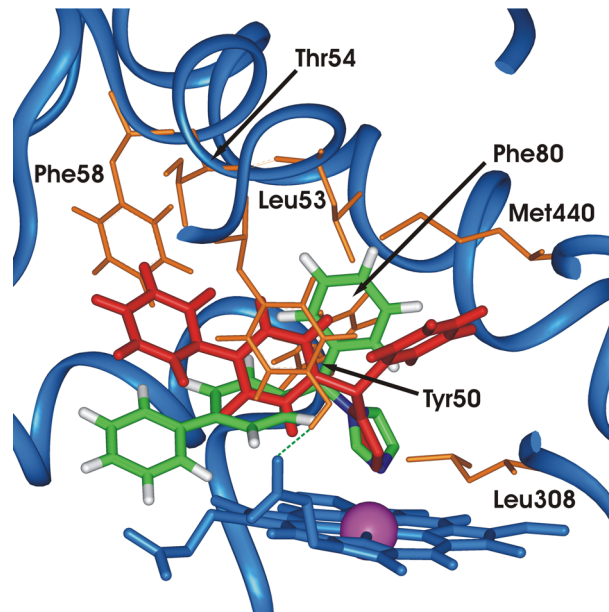
Auch in Bezug auf den Bindungsmodus der Bifonazol-Enantiomere sind beim Vergleich der beiden Spezies kaum Unterschiede zu erkennen.



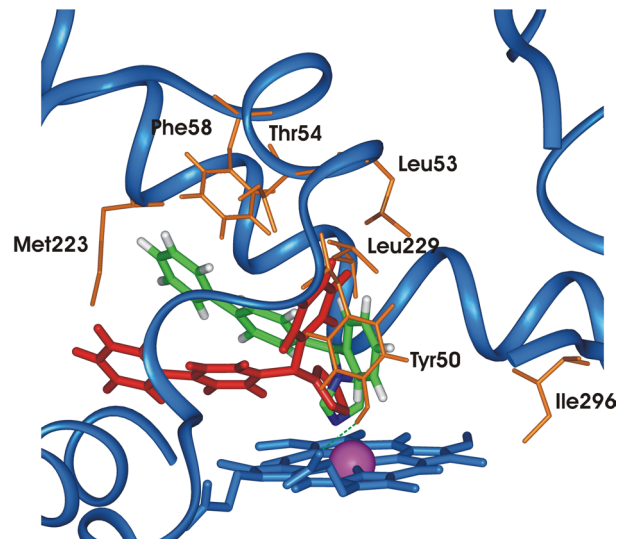
**Abbildung 19.21:** Aktives Zentrum des *C. albicans*-Modells mit dem SR-Isomer des Ketoconazols (Atomtypen) als Inhibitor. Blau sind das Proteinrückgrat und das Häm eingefärbt. Das Häm-Eisen ist als magentafarbene Kugel und die mit dem Ketoconazol interagierenden Aminosäureseitenketten sind orange dargestellt.



**Abbildung 19.22:** Aktives Zentrum des humanen Enzyms mit dem SR-Isomer des Ketoconazols (Atomtypen). Blau sind das Proteinrückgrat und das Häm eingefärbt. Das Häm-Eisen ist als magentafarbene Kugel und alle mit dem Ketoconazol interagierenden Aminosäureseitenketten sind orange dargestellt.



**Abbildung 19.23:** Enantiomere des Bifonazols im aktiven Zentrum des *C. albicans*-Modells. Das R-Enantiomer ist in Atomtypen, das S-Enantiomer ist in rot eingefärbt. Blau ist neben dem Proteinrückgrat auch das Häm-Porphyrinsystem dargestellt. Orange sind Seitenketten von Aminosäuren in der direkten Umgebung der Bifonazol-Enantiomere markiert.



**Abbildung 19.24:** Enantiomere des Bifonazols im aktiven Zentrum des humanen Modells. Die Darstellung ist analog zur Abbildung 19.23 gekennzeichnet.



# Kapitel 20

## Diskussion

Seit 1994 bis heute wurde eine Reihe von Modellen für Cyp51 des *C.albicans* auf der Basis unterschiedlicher Kristallstrukturen wie P-450<sub>Cam</sub>, P-450<sub>eryF</sub>, P-450<sub>BM3</sub> usw. [166–169] und nach 2001 auch auf Basis der CYP51MTB-Kristallstruktur [170, 171] veröffentlicht. Allerdings basieren alle diese Modelle ausschließlich auf sog. QSAR-Ansätzen (**Q**uantitative **S**tructure **A**ctivity **R**elationships).

Ziel dieser Verfahren ist es, die Bindung von Liganden im Zielprotein durch bestimmte Parameter auf möglichst einfachem Weg zu beschreiben, um dann die Bindungsaktivität neuer Strukturen vorhersagen zu können. Da hierbei möglichst viele Strukturen berechnet werden sollen, müssen die Modelle stark vereinfacht werden. Das hat zur Folge, dass bei den meisten QSAR-Verfahren das Protein nur modelliert und anschließend einer Energieminimierung unterzogen wird, um danach sofort statische Berechnungen für die Bindungsdaten der Liganden vornehmen zu können. Durch dieses Vorgehen können Strukturänderungen, die durch die Bindung eines Liganden induziert werden, nicht oder nur in geringem Maße (Änderung der Seitenkettenkonformation in einigen Verfahren möglich) berücksichtigt werden.

Wahrscheinlich ist das der Grund dafür, dass die erwähnten Modelle meist nur bedingt gute Ergebnisse liefern. Aktuelle moleküldynamische Studien an der CYP51MTB-Kristallstruktur mit dem Substrat in der aktiven Tasche legen allerdings die Vermutung nahe, dass die Struktur des CYP51 in bestimmten Bereichen sehr flexibel ist [124].

Deshalb wurde für diese Arbeit ein anderer Weg eingeschlagen, der es ermöglicht, durch Moleküldynamik-Simulationen das Verhalten und die Beweglichkeit der Modellstrukturen zu untersuchen.

## 20.1 Bau der CYP51-Modelle

Durch die Veröffentlichung der Kristallstruktur des CYP51MTB und die Sekundärstruktur-Vorhersagen von PSIPred war es gut möglich, ein Alignment für die Sequenzen von *C. albicans* und für die humane CYP51 zu erstellen.

Problematischer war der Bau der einzelnen Proteinmodelle, da sich einige Bereiche der Modellsequenzen doch erheblich von der Kristallstruktur unterscheiden.

Hierbei sind nicht nur die beiden schon in Abschnitt 15.3 erwähnten Loops hervorzuheben, die wegen ihrer Länge ein Problem darstellten. Vielmehr müssen für die weiteren Untersuchungen auch die Loops 1 und 2 beider Modelle diskutiert werden. Von Seiten der Homologie-Modellierung stellten die Strukturen zwar kein Problem dar, aber Loop 1 bildet die Verbindung zwischen B- und B'-Helix und Loop 2 die Verbindung zwischen B'- und C-Helix. Genau diese Strukturen bilden einen wichtigen Teil des Substratkanals und damit des aktiven Zentrums (s. 14.3.2).

Interessanterweise sind diese Loops in beiden Modellsequenzen im Vergleich zur Kristallstruktur um die gleiche Anzahl von Aminosäuren verlängert. Loop 1 hat sowohl in *C. albicans* als auch in der humanen Sequenz ein Insert von einer Aminosäure, Loop 2 hat in beiden Sequenzen sogar ein 4 Aminosäuren umfassendes Insert. Es könnte also sein, dass diese Sequenzverlängerungen für die Funktion membrangebundener Enzyme erforderlich sind. Das bedeutet, dass genau diese essentiellen Bereiche für die Funktion des Enzyms nicht von der Vorlage CYP51MTB entnommen werden können, sondern modelliert werden müssen und so strukturell weniger abgesichert sind.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Modellstruktur des humanen Enzyms durch ihre größere Ähnlichkeit zur Kristallstruktur einfacher zu generieren war. Bei der Modellstruktur des *C. albicans* traten Probleme in der Generierung einiger Loop-Strukturen auf, da diese für die Sequenzen der Hefen und Pilze spezifisch sind und in anderen Spezies nicht vorkommen.

## 20.2 Stabilitätsprüfung der CYP51-Homologie-Modelle

Die Dynamiksimulationen, mit deren Hilfe die Stabilität der Modelle getestet wurde, ergaben ein sehr ähnliches Verhalten zur Kristallstruktur.

Natürlich zeigten sich bei den generierten Modellstrukturen stärkere Auslenkungen als

bei der Kristallstruktur. Diese liegen allerdings ausschließlich in Bereichen, die nicht direkt von der Vorlage des CYP51MTB übernommen werden konnten. Vor allem an den Übergängen zwischen den von der Kristallstruktur übernommenen und den modellierten Bereichen, den sog. splice Punkten, kommt es während der Simulation zu starken Bewegungen. An den splice Punkten treten auch die meisten Aminosäuren in *verbotenen* Regionen des Ramachandran-Plots auf.

Die Qualität während der Simulationen entwickelt sich bei den drei Modellen unterschiedlich. Für die Verschlechterung des Ramachandran-Plots der Kristallstruktur während der Simulation sind bewegliche Stukturbereiche verantwortlich, die nicht so präzise im Kristall beschrieben sind, wie dies für starre Bereiche der Fall ist. Genau diese flexiblen Bereiche sind es auch, aus denen während der Simulationen Aminosäuren in schlechtere Ramachandran-Plot-Regionen abrutschen.

Das Verhalten der Modelle hängt neben der Präzision der Kristallstruktur auch von den konstruierten Loopstrukturen ab. Da die Qualität dieser Strukturen nicht bekannt ist, kann das unterschiedliche Verhalten der beiden Modellstrukturen darauf zurückgeführt werden. Denn die Aminosäuren in den *verbotenen* Regionen liegen entweder in Gebieten, die auch in der Kristallstruktur zu Aminosäuren in *verbotenen* Regionen oder in Loop-Bereichen führen. Dabei wurden für das Modell von *C. albicans* Loop-Strukturen gefunden, die sich während der Simulation entspannen. Das ist beim humanen Modell nicht gelungen; dort rutschen einige Aminosäuren aus Loop-Strukturen in *verbotenen* Regionen ab.

Bei der Stabilitätsprüfung konnte jedoch ermittelt werden, dass sich das gesamte Ensemble auf einem stabilen Energieniveau befindet und sich die erhöhte Beweglichkeit auf einige an der Moleküloberfläche liegende Loop-Regionen beschränkt. Bewegungen von Molekülabschnitten, die zur Bildung der aktiven Tasche beitragen [114], konnten weder in der Kristallstruktur noch in den beiden Modellstrukturen beobachtet werden. Für das Fehlen der Bewegungen sind zwei unterschiedliche Gründe in Betracht zu ziehen.

Einer der Gründe könnte sein, dass die Kristallstruktur als Komplex mit einem Inhibitor kristallisiert wurde und anscheinend in einer „geöffneten“ Form vorliegt. Da die Simulationen zur Überprüfung der Proteinstabilität jeweils ohne Liganden, also mit freier aktiver Tasche erfolgten, sollte auch hier die geöffnete Konformation des Enzyms bevorzugt werden. Wie sich während der Simulationen zeigte, kommt es in den Stukturbereichen der aktiven Tasche nur zu geringfügigen Bewegungen. Daher kann sowohl bei der Kris-

tallstruktur und auch bei den davon abgeleiteten Modellen von der „geöffneten Form“ des Proteins ausgegangen werden.

Die zweite Möglichkeit wäre, dass der Zeitraum zu kurz gewählt wurde, um größere Bewegungen der Struktur mittels GROMACS beschreiben zu können, es sich somit um ein Artefakt des Kraftfeldes handelt. Das ist jedoch eher unwahrscheinlich, da Strukturänderungen laut Literatur [114] schon während einer 300 ps-Dynamik auftraten. Diese Simulationen sind zwar mit Hilfe des CHARMM-Kraftfeldes berechnet worden; beide Kraftfeldtypen sollten jedoch vergleichbare Ergebnisse liefern, da beide für die Berechnung von Proteinen konzipiert sind. Außerdem treten die erwarteten Bewegungen bei den Simulationen der Modelle mit Inhibitoren auf.

Für das GROMACS-Kraftfeld ist der Vergleich der G-Faktoren aus Abschnitt 16.2.4 von Interesse, da hier die vergleichbaren Simulationen mit der Kristallstruktur CYP51MTB und mit den beiden abgeleiteten Modellen durchgeführt wurden. Bei den Startstrukturen (Simulationsdauer=0 ns) hat die Kristallstruktur natürlich die eindeutig besseren Werte gegenüber den Modellstrukturen. Vergleicht man aber die Werte der Endstrukturen (Simulationsdauer= 1,25 ns), erkennt man, dass alle G-Faktoren einem bestimmten Wert zustreben. Und dabei fällt auf, dass Bindungslängen und -winkel im Mittel mit Werten zwischen 0,4 und -0,1 sehr gut vom Kraftfeld für alle Strukturen eingehalten werden, während die Diederwinkel wesentlich schlechter wiedergegeben werden. Das liegt vor allem daran, dass die Diederwinkel sich nur eingeschränkt bewegen dürfen. Wollte man die Diederwinkel genauer beschreiben, so wäre das mit einer deutlich aufwendigeren Parametrisierung und gleichzeitig höherem rechnerischen Aufwand verbunden. Besonders auffällig sind die Schwächen bei der  $\omega$ -Winkel Verteilung. Dieser nimmt als einziger einen Wert zwischen -0,7 und -0,8 an, was eher einer mittleren bis ausreichenden Beschreibung des Winkels gleich kommt. Die restlichen Diederwinkel-Verteilungsparameter nehmen Werte zwischen -0,2 und -0,5 an und werden somit immer noch relativ gut vom Kraftfeld wiedergegeben.

Allerdings muss ebenso bedacht werden, dass durch die Parametrisierung der Diederwinkel die Flexibilität der Moleküle während einer Simulation definiert wird. Würden die Kraftkonstanten dieser Parameter zu hoch gesetzt, resultierten Strukturen, die ihren natürlichen Konformationsraum nicht einnehmen können. Es handelt sich um Unzulänglichkeiten der Kraftfeld-Definition, die wohl niemals mit einer derartigen Methodik vollständig beseitigt werden können.

Deshalb wurde bei den simulierten Strukturen eine erhöhte Zahl von Aminosäuren in

den *verbotenen* Regionen des Ramachandran-Plots in Kauf genommen. Voraussetzung war allerdings, dass diese nicht im aktiven Zentrum liegen.

Bei den Aminosäuren aller Strukturen, die sich in den *verbotenen* Regionen des Ramachandran-Plots aufhalten, fällt auf, dass es sich bei diesen zumeist um polare Aminosäuren handelt. Offensichtlich hat auch GROMACS Schwierigkeiten bei der Berechnung des Verhaltens polarer Aminosäuren an der Oberfläche von Proteinen in gewissen strukturellen Kontexten (meist polare Aminosäuren am Beginn oder Ende einer Helix oder in sog. Turnstrukturen). Durch die Verwendung der PME-Methode (s. Abschnitt 3.1.2.1) und der Berechnung in einer physiologischen Kochsalzlösung konnten diese Nachteile zwar verbessert werden, aber ganz lässt sich die Problematik mit polaren Aminosäuren nicht vermeiden. Außerdem ist das Verhalten der betreffenden Aminosäuren kein spezielles Problem von GROMACS, da Gleiches bei allen derzeit zur Proteinsimulation verwendeten Kraftfeldern beobachtet wird.

## 20.3 Simulation der Substratkomplexe

Da über die Bindung der Substrate des CYP51 nur sehr wenig bekannt ist, sind die Simulationen von Lanosterol im aktiven Zentrum der beiden Modelle von besonderem Interesse.

Allerdings ist schon die Positionierung des Lanosterols problematisch, da nur bekannt ist, dass die Methylgruppe in einem ausreichend großen Abstand zum Häm-Eisen liegen muss. Direkte Wechselwirkungen des Substrats mit dem Protein sind nicht bekannt. Deswegen konnte das Lanosterol nur in den freien Raum des aktiven Zentrums positioniert werden. Die Seitenkette war aber nicht in diesem Raum unterzubringen. Sie konnte sich jedoch schon während der Wasserboxequilibrierung frei bewegen und dadurch hinderliche Seitenketten verschieben oder selbst eine geeignetere Konformation einnehmen. So stellt die in Abb.17.1 vorgestellte Konformation die einzige Ausgangsstruktur dar, die zu einer stabilen Komplexgeometrie führt.

Bei der Überprüfung der Simulationsverläufe fällt auf (Abb. 17.2), dass die RMSD-Werte des *C. albicans*-Modells wesentlich schneller equilibrieren als bei dem humanen Modell. Das ist nicht weiter verwunderlich, da sich bei der Simulation des humanen Modells die Lage des Lanosterols deutlich mehr verändert als bei der des *C. albicans*-Modells. Die schnellere Equilibrierung bei der Simulation des *C. albicans*-Modells er-

kennt man auch an der geringeren Steigung der Regressionsgerade für die letzten 500 ps beider Dynamiken.

Wie aus den Graphen für die RMS-Fluktuation zu erkennen ist, wird der erhöhte RMSD-Wert nur durch die stärkere Bewegung weniger Strukturelemente verursacht. Dabei sind nur die in Abb. 17.4 eingerahmten Strukturelemente von Bedeutung. Nicht eingerahmte Bereiche, die sich stärker bewegen, tragen zwar auch zur Erhöhung des RMSD-Wertes bei, stehen jedoch in keinem direkten Zusammenhang mit dem Substrat im aktiven Zentrum. Bei den eingerahmten Strukturelementen ist vor allem die Struktur um die Aminosäuren 190-220 von Interesse, da dieser Bereich dem aktiven Zentrum am nächsten kommt.

Bei den Simulationen der Substratkomplexe werden die schon eingangs als flexibel angenommenen Strukturelemente stärker zu Bewegungen angeregt. Das reicht allerdings noch nicht aus, um wie bei den Simulationen der Inhibitor-Komplexe ein komplettes Schließen des Substrat-Kanals zu bewirken.

Somit stellt sich die Frage, ob die geringe Veränderung der flexiblen Bereiche nur auf eine zu kurze Simulationszeit zurückzuführen ist. Auch hier kann wiederum die Literatur [114] herangezogen werden. Denn dort ist es nicht gelungen, den Kanal der Struktur komplett zu schließen, sondern es werden nur partielle Schließbewegungen beschrieben.

In den Substrat-Komplex-Simulationen konnte zum ersten Mal eine H-Brücke zwischen dem Lanosterol und dem Protein beobachtet werden. Sie wird zwischen der  $\text{NH}_3$ -Gruppe des Lysins (Lys79 beider Modelle) aus der Helix C und dem Sauerstoff am C-3 des Lanosterols gebildet. Sie tritt sowohl direkt als auch über ein Wassermolekül verbrückt auf. Ob diese wirklich existiert, kann nicht mit Daten belegt werden. Allerdings wird durch diese H-Brücke das Lanosterol sehr gut über dem Häm-Eisen positioniert. Außerdem erklärt diese H-Brücke auch, dass die OH-Gruppe des Substrats unbedingt  $\beta$ -ständig sein muss. Denn konstruiert man die in Abb. 17.8 gezeigten Strukturen mit einer  $\alpha$ -ständigen OH-Gruppe, würde die Methylgruppe zu weit vom Häm-Eisen entfernt liegen, um noch einen reaktiven Komplex bilden zu können.

Die aktiven Zentren der beiden Proteinmodelle unterscheiden sich kaum, so dass auch die beinahe identische Aktivität für die Umsetzung von Lanosterol verständlich ist. Wie in Abb. 17.11 zu sehen ist, werden zwei unterschiedliche Konformationen für die Seitenkette im aktiven Zentrum des humanen Enzyms gefunden, während für das *C. albicans*-Enzym nur die in Abb. 17.10 gezeigte Konformation der Seitenkette erscheint.

Diese Unterschiede in der Lage des Lanosterols, insbesondere dessen Seitenkette, würden dann auch erklären, dass das humane Enzym vorwiegend 24,25-Dihydrolanosterol umsetzt, während das *C. albicans*-Enzym das 24-Methylen-Lanosterol bevorzugt. Die flexiblere, längere Seitenkette des 24,25-Dihydrolanosterols könnte im humanen Enzym mit der in Richtung Tyrosin 146 abgeknickten Seitenkette immer noch den optimalen Abstand zum Häm-Eisen erreichen.

Dagegen ist die kürzere, ein wenig voluminösere Seitenkette des 24-Methylen-Lanosterols besser für das aktive Zentrum des *C. albicans*-Enzyms geeignet. Da hier das zusätzliche Volumen der Methylengruppe optimal zwischen die Seitenketten des Methionin 238 und des Phenylalanin 160 passt und damit die Lage des Substrats durch weitere Kontakte sogar noch besser stabilisiert wird.

## 20.4 Parametrisierung der Fe-N-Bindung

In den hier vorgestellten Rechnungen wurde gezeigt, dass die DFT-Methode die kristallografischen Daten sehr gut bestätigen kann. Somit konnten trotz der beträchtlichen Größe des Modells die Berechnungen mit einer sehr hohen Präzision durchgeführt werden. Dieses war erforderlich, da die durch eine Eisen-Stickstoff-Bindung vermittelte Wechselwirkung mit Abstand die energetisch stärkste Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym darstellt. Deshalb war die genaueste Beschreibung dieser Bindung von besonderem Interesse, weil durch deren Parametrisierung auch ein äußerst wichtiger Bestandteil der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung während der Simulation in einem Kraftfeld beschrieben werden kann.

Ausgehend von der Berechnung zur Geometrieoptimierung wurde die Eisen-Stickstoff-Bindung genauer untersucht. Dabei konnten neben dem Bindungspotential der Eisen-Stickstoff-Bindung noch deren Torsions-Barrieren und die „Abkipf“-Barriere des Imidazol-Liganden berechnet werden.

Für die Bindungsenergie  $D_{ij}$  wurde ein Potential von 52,432 kJ/mol und eine Bindungslänge von 2,063 Å ermittelt. Der Vergleich mit der Bindungslänge aus der Kristallstruktur des CYP51MTB (2,0 Å) zeigt, dass sie durch die DFT sehr gut wiedergegeben wird. Wie das Potential von über 50 kJ/mol zeigt, liegt diese Bindung in ihrer Stärke zwischen einer kovalenten Bindung und einer H-Brücke.

Bei der Berechnung der Torsionseigenschaften um die Eisen-Stickstoff-Bindung konnte

mit einer maximalen Torsionsbarriere von 4,5 kJ/mol nur eine sehr geringe Energie berechnet werden. Diese Barriere wird schon durch die Umgebungsbedingungen bei Körpertemperatur überwunden. Darum kann die Eisen-Stickstoff-Bindung als frei drehbare Bindung angesehen werden. Der durch die Harmonisierung des Potentials verursachte Fehler wurde in Kauf genommen, da dadurch das Potential-Verhalten kaum beeinflusst wird.

Interessanter war das Verhalten der Bindung beim Kippen des Imidazolrings aus seiner optimalen Lage, da die Koordination an das Eisenatom entscheidend von der Geometrie zwischen Imidazolring und Eisen abhängt. Es konnte gezeigt werden, dass durch ein Abkippen des Rings um etwa  $35^\circ$  etwa 50 % der Bindungsenergie verloren geht. Bei einem Winkel von  $40^\circ$  konnten Energieverluste von etwa 28 kJ/mol in der gauche bzw. 32 kJ/mol in der eclipsed Konformation ermittelt werden. Mit dieser Kenntnis des Energieverlustes der Bindung bei Änderung der Bindungsgeometrie der Liganden am Porphyrin-Eisen kann nun auf deren Bindungsstärke geschlossen werden.

Das ist vor allem deshalb interessant, weil im aktiven Zentrum des untersuchten CYP51 nur wenig Platz ist und ein Ligand in Abhängigkeit von seiner Größe nicht immer eine ideale Position zum aktiven Eisen einnehmen kann. Genauer wird dieser Aspekt in den folgenden Abschnitten zur Komplexbildung des Enzyms mit den Inhibitoren diskutiert. Dabei stehen vor allem Untersuchungen von Liganden in Form unterschiedlicher Enantiomere bzw. Diastereomere in Vordergrund, da hier alle Wechselwirkungsmöglichkeiten bis auf deren sterische Anordnung identisch sind.

## 20.5 Simulation der Protein-Inhibitor-Komplexe

Für die Simulation der Inhibitorkomplexe ist es vorteilhaft, wenn wegen der direkten Wechselwirkung des Imidazolrings mit dem Häm-Eisen die Lage der Strukturen im aktiven Zentrum definiert ist. Denn durch die Bindung des Imidazolrings am Eisen bleiben nur noch wenige Möglichkeiten die Reste der Inhibitoren im aktiven Zentrum zu platzieren. Dadurch wurde die Positionierung der Inhibitoren im aktiven Zentrum der Proteinmodelle vereinfacht.

Während der Protein-Inhibitor-Simulationen verhalten sich die RMSD-Kurven des Proteinanteils deutlich unregelmäßiger als die Simulationsverläufe mit dem freien Protein. Ähnliches war schon bei den Simulationen der Protein-Lanosterol-Komplexe zu beob-



achten. Die RMSD-Werte bleiben aber mit 0,3 bis 0,4 nm im gleichen Bereich wie bei den Lanosterol-Rechnungen.

Dasselbe gilt für den Verlauf der potentiellen Energie. Mit Steigungen der Regressionsgeraden zwischen 0,2 und  $-0,8 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}\cdot\text{ps}}$  werden immer noch Werte erreicht, bei denen die Simulationen als equilibriert betrachtet werden können

Erst die RMSF-Werte offenbaren deutliche Unterschiede zu den Lanosterol-Rechnungen. Denn bei den Protein-Inhibitor-Simulationen werden deutlich stärkere Fluktuationen in den drei flexiblen Bereichen festgestellt. Durch die stärkeren Bewegungen werden erstmals auch solche Sekundärstrukturen dauerhaft in der Anordnung zueinander verändert, die zum aktiven Zentrum der Proteine gehören. Dabei beschreiben die Sekundärstrukturänderungen ein Verschließen des durch den BC-Loop gebildeten Substratkanals.

Um ein Verschließen des Kanals zu erreichen, fällt die G-Helix nach vorne, wobei die I-Helix von einer gewinkelten in die gestreckte Form übergeht (Abb. 19.11  $G\alpha$  und  $I\alpha$ ). Durch diese Helixverschiebungen wird dann der BC-Loop in seine geschlossene Konformation gedrängt. Auffällig ist hier die Ähnlichkeit zwischen den Kristallstrukturen (Abb. 14.13) und den in Abb. 19.11 gezeigten Änderungen. Geht man davon aus, dass die beiden Kristallstrukturen wirklich den geöffneten bzw. geschlossenen Zustand eines Cytochroms zeigen, ist es mit diesen Simulationen zum erstenmal gelungen, den kompletten Schließvorgang eines Cytochroms zu beschreiben. Ein vollständiger Verschluss des Kanals ist nur bei denjenigen Simulationen zu beobachten, die in den markierten flexiblen Bereichen die größten RMSF-Werte ergeben.

Durch die Bindung eines Inhibitors am Protein wird ein Verschließen des Kanals induziert. Die hier gezeigten Daten weisen daraufhin, dass dabei die Stärke des Inhibitors Einfluss auf die Geschwindigkeit oder auf den Grad des Verschlusses haben könnte. Diese Annahme könnte aber erst durch weitere Untersuchungen oder evtl. durch kristallografische Daten eindeutig bestätigt werden.

Neben den Parametern zur Beurteilung der Proteinstruktur wurde mit Hilfe der Auslenkung des Imidazolrings der Inhibitoren auch ein direkter Bindungsparameter untersucht. Als optimal für den Imidazolring wurde eine senkrechte Stellung des Rings und damit ein Winkel der Bindung zum Imidazolring von  $180^\circ$  definiert. Hier konnte gezeigt werden, dass stärkere Inhibitoren in der Regel auch für die Eisen-Imidazol-Koordination günstigere Winkel einnehmen und damit die biologischen Daten wiedergegeben werden können. Leider waren jedoch die Unterschiede nicht so ausgeprägt wie erwartet.

Dafür gibt es mehrere Gründe:

Bei den Ketoconazol-Rechnungen wurde z. B. festgestellt, dass sich die Verhältnisse mit Verlängerung der Dynamik noch weiter in Richtung einer besseren Wiedergabe der biologischen Daten entwickeln. Das wird durch zwei Faktoren entscheidend beeinflusst. Ein wichtiger Faktor ist die Ausgangsstruktur des Liganden, die bei nicht idealer Startkonformation eine längere Zeit bis zur Einstellung eines Gleichgewichts erfordert. Weiterhin ist es auch denkbar, dass unterschiedlich starke Liganden verschiedene Konformationen des Proteins stabilisieren. Beispielsweise könnten starke Liganden einen nahezu kompletten Verschluss des Substrat-Kanals induzieren, was wiederum den schwächeren Liganden nur partiell möglich ist. Das hätte dann auch zur Folge, dass für jede neue Inhibitor-Leitstruktur ein neues Modell mit entsprechender Proteinstruktur erstellt werden müsste.

Ein weiterer Grund ergibt sich daraus, dass es im GROMACS-Kraftfeld nicht möglich ist, spezifische *out of plane* Winkel zu definieren, so dass die für das Abkippen benötigten Energien in den Simulationen nicht berücksichtigt werden. Wahrscheinlich werden daher die Winkel tendenziell eher als zu groß beschrieben. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass im Vergleich zu dem Druck, den das Protein auf den Inhibitor ausübt, der Fehler durch das nicht vorhandene Potential eher gering ist.

Die Simulationen der Inhibitor-Protein-Komplexe des humanen Proteinmodells ermöglichen eine Unterscheidung der einzelnen Ketoconazol-Isomere. Dabei konnten starke Inhibitoren über das Maß der Auslenkung des Imidazolwinkels erkannt werden. Denn die am stärksten bindende SR-Konfiguration des Ketoconazols tritt deutlich häufiger mit nur kleinen Auslenkungen auf, als die übrigen deutlich schlechter bindenden Konfigurationen. Ein Unterschied zwischen der RS- und der RR- sowie der SS-Konfiguration ist zwar vorhanden, aber kaum noch zu erkennen. Demnach kann über die Größe der Auslenkung des Imidazolwinkels der Faktor 100 in der Bindungsstärke noch gut unterschieden werden, wohingegen schwächere Bindungen nicht mehr eindeutig zu unterscheiden sind.

Betrachtet man das Verhalten der Ketoconazol-Stereoisomere im *C. albicans*-Modell, so fällt auf, dass bei diesem Protein die SR- und RS-Formen des Ketoconazols deutlich weniger vom optimalen Bindungswinkel ausgelenkt werden. Das bedeutet, dass diese beiden Stereoisomeren deutlich besser ins aktive Zentrum des *C. albicans*-Enzyms passen als ins Zentrum des humanen Enzyms, wodurch die biologischen Daten sehr gut wiedergegeben werden.

Interessant ist weiterhin, dass die RR- und SS-Konfiguration im aktiven Zentrum von *C. albicans* mit deutlich unterschiedlichen Auslenkungen reagieren. Während die SS-Form sich ähnlich wie die RS-Struktur verhält, gelingt es der RR-Struktur praktisch nicht, einen für eine Koordination am Häm-Eisen möglichen Winkel einzunehmen. Somit wäre es überlegenswert, statt des SR/RS-Razemates das reine SS-Isomer als Therapeutikum einzusetzen. Nach den hier durchgeführten Simulationen hätte die SS-Form eine deutlich stärkere Affinität zum fungalen Enzym und gleichzeitig eine sehr geringe Affinität zum humanen Enzym. Die Spezifität müsste nach den erhaltenen Ergebnissen deutlich höher sein als ein Faktor 10.

Für das Bifonazol stimmen die Simulationen insofern mit den biologischen Daten überein, als für die Enantiomere im aktiven Zentrum des *C. albicans* kein Unterschied bei der Auslenkung beobachtet wird. Beide Enantiomere werden im Durchschnitt mit Werten zwischen 15 und 55° ausgelenkt. Das würde bedeuten, dass Bifonazol im Vergleich zu Ketoconazol kein besonders guter Inhibitor für das Cyp51 des *C. albicans* wäre, was jedoch im Widerspruch zu den biologischen Erfahrungen steht.

Die biologischen Daten beruhen jedoch auf sog. MIC-Werten, bei denen die Konzentration zur Wachstumshemmung des Pilzes bestimmt wird. In den Pilzkulturen wird natürlich nicht nur CYP51 als Target angesprochen, sondern auch alle anderen potentiellen Ziele für antimykotische Strukturen. Es ist also nicht sicher, ob Bifonazol wirklich seine antimykotische Wirkung nur durch Inhibition der Cyp51 ausbildet.

Interessant sind aber die Simulationen des Bifonazols im aktiven Zentrum des humanen Enzyms. Der Imidazolring des R-Enantiomers wird relativ wenig ausgelenkt, während der Ring des S-Enantiomers eine genauso starke Auslenkung erfährt wie bei den *C. albicans*-Simulationen. Treffen diese Vorhersagen zu, würde der Einsatz des reinen Bifonazol-S-Enantiomers durchaus Vorteile bringen. Denn durch dessen Einsatz sollten sich die Nebenwirkungen deutlich verringern lassen, die durch Inhibition des humanen Cyp51 hervorgerufen werden.

Neben der Eisen-Stickstoff-Koordination wurde untersucht, ob Ketoconazol auch H-Brücken ausbilden kann. Hierbei konnten zwar vereinzelt Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Aminosäuren festgestellt werden, allerdings waren diese meist nur von kurzer Dauer. Das ist aber nicht weiter verwunderlich, da diese H-Brücken sehr weit im Inneren des Kanals liegen und somit die interagierenden Aminosäuren meistens Teil der schon eingangs erwähnten flexiblen Bereiche sind. Neben diesen direkten H-Brücken konnte auch eine Reihe von mit Wasser gebildeten H-Brücken gefunden wer-

den.

Diese Strukturen werden jedoch nicht über ein konserviertes Wassermolekül etabliert, sondern die beteiligten Moleküle werden in sehr schneller Folge ausgetauscht. Das erklärt sich aber dadurch, dass derartige H-Brücken sehr nahe am Ausgang des Substratkanals liegen und somit leichten Zugang zum umgebenden Wasser haben. Darum sind diese Wechselwirkungen nicht als H-Brücken, sondern eher als Solvatationseffekte zu betrachten.

Die Clusteranalyse der Ketoconazol-Simulationen liefert eine einfache Antwort auf die geringe Stabilität der direkten H-Brücken. Betrachtet man die in der Clusteranalyse ermittelten Ketoconazol-Konformationen, so unterscheiden sich diese nur in geringem Maße. Aber schon durch kleine Veränderungen der Bindungsgeometrie des Imidazolrings zum Häm-Eisen werden diese Bewegungen über den langen Hebel der Ketoconazol-Seitenkette übertragen und führen so zu beträchtlichen Verschiebungen am Ende des Moleküls. Diese Beweglichkeit erklärt sehr gut, weshalb H-Brücken immer nur sehr kurz detektiert werden können.

Durch eine Überlagerung repräsentativer Konformere der Clusteranalysen wird auch deutlich, dass das SR-Isomer gegen Ende der Simulation eine andere Ausrichtung im aktiven Zentrum aufweist als die drei anderen Ketoconazol-Stereoisomere. Und das, obwohl die Ausgangstrukturen für alle Konfigurationen relativ ähnlich sind. Die unterschiedliche Ausrichtung beschreibt aber keine weitere Bindungstasche; vielmehr zeigt sie ein anderes Verschlussverhalten des Proteins an. Denn bei allen Ketoconazol-Stereoisomeren werden immer nahezu die gleichen Aminosäuren adressiert, allerdings mit einer anderen räumlichen Anordnung.

Bei den Bifonazol-Simulationen konnten solche Reaktionen nicht beobachtet werden, was wahrscheinlich durch die Rigidität und die geringere Größe des Inhibitors bedingt ist.

Der zum Abschluss durchgeführte Vergleich der Proteine zeigt auch bei den Simulationen mit beiden Inhibitoren, dass sich die aktiven Zentren nur sehr wenig unterscheiden. Für alle Wechselwirkungen des Inhibitors im aktiven Zentrum des einen Enzyms gibt es in der Regel auch eine entsprechende Wechselwirkung im anderen.

## 20.6 Allgemeine Diskussion

Nachfolgend werden die Fehlermöglichkeiten für die Simulationen der Cytochrom P-450-Modelle der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase aus *C. albicans* und dem humanen Enzym erörtert und diskutiert.

Auch bei diesen Berechnungen sind schon die Ausgangsstrukturen mit Fehlern behaftet. Hier wahrscheinlich sogar noch mehr als bei der Betrachtung der Insulin-Dimere. Denn bei den Demethylasesimulationen sind die Ausgangsstrukturen von einer Kristallstruktur abgeleitete Modelle. Da die modellierten Proteine zu anderen Spezies gehören als die verwendete Röntgenstruktur, enthalten sie spezifische Strukturelemente, die in der Kristallstruktur nicht vorkommen. Die nicht durch die Kristallstruktur beschriebenen Elemente mussten daher konstruiert und in die Modelle eingefügt werden. Bei den Konstruktionen handelt es sich zwar um aus anderen Proteinen bekannte Molekülstrukturen, jedoch stellen sie für die zu untersuchenden Enzyme nur eine mögliche hypothetische Struktur dar. Diese sind der wahren Struktur im besten Fall nur ähnlich. Somit sind solche Strukturelemente als die größte Fehlerquelle für die Ausgangsstrukturen anzusehen.

Wie in den dokumentierten Rechnungen offenbaren auch die Simulationen der CYP51-Modelle einige Schwächen der Kraftfelder bei der Berechnung von Proteinen. Das wird u. a. durch die schlechte Strukturgeometrie einiger polarer Aminosäuren an der Oberfläche der Proteine deutlich. Dieses Problem ist allerdings bei allen Kraftfeldern bekannt und es wird versucht, diesen Mangel durch immer aufwendigere Berechnungen der elektrostatischen Wechselwirkungen zu kompensieren. Das alles ist mit einem drastischen Anstieg des Rechenaufwandes verbunden und somit durch die heute zur Verfügung stehende Hardware limitiert. Dieser Fehler kann daher nur bedingt ausgeglichen werden.

Das größte Problem bei den Simulationen der CYP-Strukturen ist aber das geringe Wissen über deren Struktur und die fehlende Einsicht in das Verhalten der Proteinstruktur während der enzymatischen Umsetzung des Substrats.

Bisher ging man von einer mehr oder weniger starren Struktur des Proteins während des enzymatischen Zyklus für alle CYP's aus. Durch neue Kristallstrukturen und neue Simulationsverfahren gerät diese Ansicht aber immer mehr ins Wanken. Auch in den hier vorgestellten Simulationen kam es zu ausgeprägten Änderungen in den Modellstrukturen. Hauptsächlich bewegten sich solche Teile der CYP-Modelle, die schon als

flexible Teile der literaturmäßig bekannten Kristallstrukturen und Simulationen angeführt werden. Dazu gehören neben einigen Loopstrukturen an der Oberfläche der Proteine jedoch auch Sekundärstrukturen wie die I-Helix, die essentieller Bestandteil des aktiven Zentrums ist.

Problematisch für die Proteinbewegungen ist das Fehlen experimenteller Vergleichsdaten, mit denen man die Simulationen überprüfen könnte. Generell ist über die Beweglichkeit von Proteinen nur wenig bekannt, was die Interpretation der gewonnenen Daten zusätzlich erschwert.

Sollten die beschriebenen Bewegungen jedoch wirklich ein essentieller Teil des enzymatischen Cyclus der CYP-Enzyme sein, würden QSAR-Studien für potentielle Inhibitoren deutlich erschwert werden, wenn nicht sogar unmöglich sein. Denn die Flexibilisierung des aktiven Zentrums steht im Widerspruch zu allen bisher bekannten QSAR-Methoden, bei denen das aktive Zentrum als starr angesehen werden muss.

Aus diesen Grund sind für die Proteinklasse der Cytochrom-P-450 Enzyme weitere und präzisere Simulationen notwendig, die die Konformationsänderungen dieser Enzyme im Verlauf der Komplexbildung mit Substraten oder Inhibitoren genauer beschreiben. Denn nur durch die genaue Kenntnis der Zielproteine und deren Verhalten können neue potente Inhibitoren entwickelt werden.

## **Teil IV**

# **Zusammenfassung**





# Kapitel 21

## Zusammenfassung der Ergebnisse

Für zwei unterschiedliche Proteinsysteme wurden in dieser Arbeit molekulardynamische Simulationen entwickelt.

Dabei wird für die Dissoziation von Insulin-Dimeren ein molekularer Mechanismus vorgestellt. Entgegen der allgemein gültigen Meinung konnten auch bei den schnell dissoziierenden Insulin-Analoga Lyspro und Aspart die in der Struktur des Wildtyps beschriebenen Wechselwirkungen gefunden werden. Die unterschiedliche Dissoziationsgeschwindigkeit der Analoga resultiert vor allem aus einer Änderung der Beweglichkeit der an der Bindung der beiden Monomere beteiligten Aminosäuren. Die Salzbrücke zwischen den B-Ketten der beiden Monomere eines Dimers ist dabei von entscheidender Bedeutung. Bei den Analoga wird die Beweglichkeit des an der Salzbrücke beteiligten Lysins eingeschränkt. Dadurch ist es den Dimeren der Insulin-Analoga nicht mehr möglich, auf Krafterwirkungen von außen flexibel zu reagieren. Daraus resultiert eine schnellere Dissoziation.

Bei den Simulationen des *C. albicans* und des humanen CYP51-Modells spielt das Verhalten der Proteine ebenfalls eine entscheidende Rolle. Für das Modell des humanen Enzyms konnte die Enantioselektivität des Ketoconazols bestätigt werden. Auch für das Modell des *C. albicans*-Enzyms entsprachen die Ergebnisse den biologischen Daten für die Bindung des Ketoconazols. Allerdings zeigte sich auch, dass es für den Einsatz als Antimykotikum von Vorteil sein könnte nur das SS-Isomer als Therapeutikum einzusetzen.

Auch bei den Berechnungen des Bifonazols im aktiven Zentrum des CYP51-Modells aus *C. albicans* konnten die Daten aus den biologischen Studien nachempfunden wer-

den. Überraschend waren die Ergebnisse aus den Berechnungen des Bifonazols im humanen Enzym, da hierbei das R-Enantiomer als starker Human-CYP51-Inhibitor vorhergesagt wurde. So könnten durch Einsatz des reinen S-Enantiomers als Therapeutikum Nebenwirkungen deutlich verringert werden.

Für die Beschreibung der Protein-Inhibitor-Wechselwirkungen war die Parametrisierung der Eisen-Stickstoff-Bindung von zentraler Bedeutung, denn erst durch die exakte Aufklärung dieser Bindung war es möglich, das Verhalten der im Enzym komplexierten Inhibitoren angemessen zu beobachten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CYP51-Modelle während der Komplexierung durch die Inhibitoren Konformationsänderungen erleiden und der Substratkanal verschlossen wird.

# Kapitel 22

## Abschließende Bemerkung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass beide Proteinsysteme entscheidend durch ihr dynamisches Verhalten bestimmt werden.

Beide Systeme werden durch Modifizierung der Flexibilität bestimmter Strukturelemente in ihren Funktionen geprägt. Während sich das CYP51 an die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen in den verschiedenen Spezies anpassen musste und somit auf natürlichem Wege unterschiedliche dynamische Eigenschaften entwickelte, wird bei den Insulin-Analoga ähnliches auf künstlichem Wege versucht.



# Literaturverzeichnis

- [1] SCHAPPACH, A.: *Molecular Modelling Untersuchungen an Steroidhydroxylasen mit therapeutischer Bedeutung*. Düsseldorf, Germany, Institut für Pharmazeutische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Ph.D. diss., 2000
- [2] STAHL, G.: *Entwicklung von Homologie-Modellen der Cytochrome P450 2A5 und 2A6*. Düsseldorf, Germany, Institut für Pharmazeutische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Ph.D. diss., 2002
- [3] VAN GUNSTEREN, W.F. ; BILLETER, S.R. ; EISING, A.A. ; HÜNENBERGER, P.H. ; KRÜGER, P. ; MARK, A.E. ; SCOTT, W.R.P. ; TIRONI, I.G.: *Biomolecular simulation: The GROMOS96 manual and user guide*. Zürich, Switzerland, 1996. – ISBN 3–7281–2422–2
- [4] BERENDSEN, H.J.C. ; VAN DER SPOEL, D. ; VAN DRUNEN, R.: GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. In: *Comp. Phys. Comm.* 91 (1995), S. 43–56
- [5] TORDA, A.E. ; SCHEEK, R.M. ; VAN GUNSTEREN, W.F.: Time-dependent distance restraints in molecular dynamics simulations. In: *Chem. Phys. Lett.* 157 (1989), S. 289–294
- [6] HESS, B. ; BEKKER, H. ; BERENDSEN, H.J.C. ; FRAAIJE, J.G.E.M.: LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. In: *J. Comp. Chem.* 18 (1997), S. 1463–1472
- [7] MIYAMOTO, S. ; KOLLMAN, P. A.: SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models. In: *J. Comp. Chem.* 13 (1992), S. 952–962
- [8] BERENDSEN, H.J.C. ; POSTMA, J.P.M. ; DINOLA, A. ; HAAK, J.R.: Molecular dynamics with coupling to an external bath. In: *J. Chem. Phys.* 81 (1984), S. 3684–3690
- [9] VAN DER SPOEL, D. ; VAN BUUREN, A.R. ; APOL, E. ; MEULENHOF, P.J. ; TIELEMAN, D.P. ; SIJBERS, A.L. ; HESS, B. ; FEENSTRA, K.A. ; BERENDSEN, H.J.: *Gromacs User Manual version 3.0*, 2001
- [10] TOUKMAJI, A. Y. ; BOARD, J. A.: Ewald Summation Techniques in Perspective: A Survey. In: *J. Chem. Phys.* 95 (1996), Nr. 2–3, S. 73–92
- [11] DARDEN, T. ; YORK, D. ; PEDERSEN, L.: Particle Mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. In: *J. Chem. Phys.* 98 (1993), S. 10089–10092
- [12] ESSMANN, U. ; PERERA, L. ; BERKOWITZ, M.L. ; DARDEN, T. ; LEE, H. ; PEDERSEN, L.G.: A smooth particle mesh Ewald potential. In: *J. Chem. Phys.* 103 (1995), S. 8577–8592

- [13] HÜNENBERGER, P.H. ; MCCAMMON, J.A.: Effect of artificial periodicity in simulations of biomolecules under Ewald boundary conditions: a continuum electrostatics study. In: *Biophys. Chem.* 78 (1999), S. 69–88
- [14] KOCH, W. ; HOLTHAUSEN, M. C.: *A Chemist's Guide to Density Functional.* second. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000. – ISBN 3–527–29918–1
- [15] HOHENBERG, P. ; KOHN, W.: Inhomogenous Electron Gas. In: *Phys. Rev.* 136 (1964), Nr. 3B, S. B864–B871
- [16] KOHN, W. ; SHAM, L. J.: Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. In: *Phys. Rev.* 140 (1965), Nr. 4A, S. A1133–A1136
- [17] LEE, C. ; YANG, W. ; PARR, R. G.: Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. In: *Phys. Rev. B* 37 (1988), Nr. 2, S. 785–789
- [18] MIEHLICH, B. ; SAVIN, A. ; STOLL, H. ; PREUSS, H.: Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr. In: *Chem. Phys. Lett.* 157 (1989), Nr. 3, S. 200–206
- [19] BECKE, A. D.: Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. In: *Phys. Rev. A* 38 (1988), Nr. 6, S. 3098–3100
- [20] BECKE, A. D.: A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. In: *J. Chem. Phys.* 98 (1993), Nr. 2, S. 1372–1377
- [21] STEGER, G.: *Bioinformatik; Methoden zur Vorhersage von RNA- und Proteinstrukturen.* 1. Birkhäuser Verlag, 2003. – ISBN 3–7643–6951–5
- [22] THOMPSON, J.D. ; HIGGINS, D.G. ; GIBSON, T.J.: Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. In: *J. Mol. Biol.* 292 (1999), S. 195–202
- [23] BERMAN, H.M. ; WESTBROOK, J. ; FENG, Z. ; GILLILAND, G. ; BHAT, T.N. ; WEISSIG, H. ; SHINDYALOV, I.N. ; BOURNE, P.E.: The Protein Data Bank. In: *Nucleic Acids Res.* 28 (2000), S. 235–242
- [24] LASKOWSKI, R. A.: PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. In: *J. Appl. Cryst.* 26 (1993), S. 283–291
- [25] MORRIS, A. L. ; MACARTHUR, M. W. ; HUTCHISON, E. G. ; THORNTON, J. M.: Stereochemical Quality of Protein Structure Coordinates. In: *PROTEIN: Struct. Func. Gen.* 12 (1992), S. 345–364
- [26] MOSIMANN, S. ; MELESHKO, R. ; JAMES, M. N. G.: A Critical Assessment of Comparative Molecular Modeling of Tertiary Structures of Proteins. In: *Proteins: Struct. Funk. Gen.* 23 (1995), S. 301–317
- [27] MATTHEW, J. B.: Electrostatic Effects in Proteins. In: *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14 (1985), S. 387–417
- [28] LESK, A. M.: *Introduktion in Protein Architecture.* 1. Oxford University Press, 2001. – ISBN 0–19–850474–8
- [29] ENGH, R. A. ; HUBER, R.: Accurate Bond and Angle Parameter for X-ray Protein Structure Refinement. In: *Acta Cryst.* A47 (1991), S. 392–400

- [30] RAMACHANDRAN, G.N. ; SASISEKHARAN, V.: Conformation of polypeptides and proteins. In: *Adv. Prot. Chem.* 28 (1968), S. 283–437
- [31] KABSCH, W. ; SANDER, C.: Dictionary of Protein Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. In: *Biopolymers* 22 (1983), S. 2577–2637
- [32] KARPLUS, P.A.: Experimentally observed conformation-dependent geometry and hidden strain in proteins. In: *Protein Science* 5 (1996), S. 1406–1420
- [33] PONDER, J.W. ; RICHARDS, F.M.: Tertiary Templates for Proteins. Use of Packing Criteria in the Enumeration of Allowed Sequences for Different Structural Classes. In: *J. Mol. Biol.* 193 (1987), Nr. 4, S. 775–791
- [34] VAN DER SPOEL, D. ; BERENDSEN, H. J. C.: Molecular Dynamics Simulations of Leu-Enkephalin in Water and DMSO. In: *Biophys. J.* 72 (1997), S. 2032–2041
- [35] LIPARI, G. ; SZABO, A.: Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity. In: *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982)
- [36] BRANGE, J.: The new era of biotech insulin analogues. In: *Diabetologia* 40 (1997), S. S48–S53
- [37] BRANDENBURG, D.: Insulin- structure, function, design. In: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107 Suppl.2 (1999), S. S6–S12
- [38] BERGER, M. ; JÖRGENS, V.: *Praxis der Insulintherapie*. 5. Aufl. Springer Verlag, 1993. – ISBN 3–540–57468–9
- [39] BERGER, M.: *Diabetes mellitus*. 1. Aufl. Urban & Schwarzenberger, 1995. – ISBN 3–541–15951–0
- [40] MUTSCHLER, E.: *Arzneimittelwirkungen*. 6. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1991. – ISBN 3–8047–1118–9
- [41] BUDDECKE, E.: *Grundriss der Biochemie*. 9. Aufl. Walter de Gruyter, 1994. – ISBN 3–11–014407–7
- [42] HUDSON, P. ; HALEY, J. ; JOHN, M. ; CRONK, M. ; CRAWFORD, R. ; J. HARALAMBIDIS ; TREGGAR, G. ; SHINE, J. ; NIALL, H.: Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. In: *Nature* 301 (1983), S. 628–631
- [43] DSCHIETZIG, T. ; RICHTER, C. ; BARTSCH, C. ; LAULE, M. ; BAUMANN, F. P. Armbruster G. ; STANGL, K.: The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. In: *FASEB J.* 15 (2001), S. 2187–2195
- [44] LÖFFLER, G. ; PETRIDES, P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Aufl. Springer Verlag, 1998. – ISBN 3–540–64350–8
- [45] ZÜNDORF, I. ; DINGERMANN, T.: Vom Rinder -, Schweine-, Pferde-Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung. In: *Pharm. unserer Zeit* 30 (2001), Nr. 1, S. 27–31
- [46] WLODAWER, A. ; SAVAGE, H. ; DODSON, G.: Structure of insulin: results of joint neutron and X-ray refinement. In: *Acta Crystallogr B* 45 (1989), S. 99–107

- [47] OLSEN, H.B. ; LUDVIGSEN, S. ; KAARSHOLM, N.C.: Solution Structure of an Engineered Insulin Monomer at Neutral pH. In: *Biochemistry* 35 (1996), S. 8836–8845
- [48] LILL, N.: Herstellung schnell-wirkender Insuline und Verzögerungsinsuline - wie lässt sich diese Herausforderung technisch lösen? Insulinformulierungen. In: *Pharm. unserer Zeit* 30 (2001), Nr. 1, S. 56–61
- [49] BERCHTOLD, H. ; HILGENFELD, R.: Binding of Phenol to R6 Insulin Hexamers. In: *Biopolymers (Peptide Science)* 51 (1999), S. 165–172
- [50] ADAMS, M.J. ; BLUNDELL, T.L. ; DODSON, E.J. ; DODSON, G.G. ; VIJAYAN, M. ; BAKER, E.N. ; HARDING, M.M. ; HODKIN, D.C. ; RIMMER, B. ; SHEAT, S.: Structure of Rhombohedral 2 Zn Insulin Crystals. In: *Nature* 224 (1969), S. 469–495
- [51] SMITH, G.D. ; CISZAK, E. ; PANGBORN, W.: A novel complex of a phenolic derivative with insulin: Structural features related to the T-R transition. In: *Prot. Sci.* 5 (1996), S. 1502–1511
- [52] CISZAK, E. ; BEALS, J.M. ; FRANK, B.H. ; BAKER, J.C. ; CARTER, N.D. ; SMITH, G.D.: Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin. In: *Structure* 3 (1995), S. 615–622
- [53] BENTLEY, G. ; E.DODSON ; DODSON, G. ; HODGKIN, D. ; MERCOLA, D.: Structure of insulin in 4-zinc insulin. In: *Nature* 261 (1976), S. 166–168
- [54] S.RAHUEL-CERMONT ; FRENCH, C.A. ; KAARSHOLM, N.C. ; LEE, R.W.-K. ; DUNN, M.F.: Mechanisms of Stabilization of the Insulin Hexamer through Allosteric Ligand Interactions. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 5837–5845
- [55] DEREWENDA, U. ; DEREWENDA, Z. ; DODSON, E.J. ; DODSON, G.G. ; REYNOLDA, C.D. ; SMITH, G.D. ; SPARKS, C. ; SWENSON: Phenol stabilises more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. In: *Nature* 338 (1989), S. 594–596
- [56] CHOI, W.E. ; BRADER, M.L. ; AGULAR, V. ; KAARSHOLM, N.C. ; DUNN, M.F.: The Allosteric Transition of the Insulin Hexamer Is Modulated by Homotropic and Heterotropic Interaction. In: *Biochemistry* 32 (1993), S. 11638–11645
- [57] BRADER, M.L. ; KAARSHOLM, N.C. ; LEE, R.W.-K. ; DUNN, M.F.: Characterization of the R-State Insulin Hexamer and Its Derivatives. The Hexamer Is Stabilized by Heterotropic Ligand Binding Interactions. In: *Biochemistry* 30 (1991), S. 6636–6645
- [58] HASSIEPEN, U. ; FEDERWISCH, M. ; MÜLDERS, T ; WOLLMER, A.: The Lifetime of Insulin Hexamers. In: *Biophys. J.* 77 (1999), S. 1638–1654
- [59] SMITH, G.D. ; DODSON, G.G.: The Structure of a Rhombohedral R-6 Insulin Hexamer That Binds Phenol. In: *Biopolymers* 32 (1992), S. 441–445
- [60] SMITH, G.D. ; CISZAK, E.: The structure of a complex of hexameric insulin and 4'-hydroxyacetanilide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), S. 8851–8855
- [61] BRADER, M.L. ; DUNN, M.F.: Insulin Hexamers: new conformation and application. In: *TiBS* 16 (1991), S. 341–345
- [62] KAARSHOLM, N.C. ; KO, H.-C. ; DUNN, M.F.: Comparison of Solution Structural Flexibility and Zn Binding Domains for Insulin, Proinsulin and Miniproinsulin. In: *Biochemistry* 28 (1989), S. 4427–4435



- [63] BREMS, D.N. ; BROWN, P.I. ; BRYANT, C. ; CHANCE, R.E. ; GREEN, I.K. ; LONG, H.B. ; MILLER, A.A. ; MILLICAN, R. ; SHIELDS, J.E. ; FRANK, B.H.: Improved insulin stability through amino acid substitution. In: *Protein Engineering* 5 (1992), S. 519–525
- [64] YE, J. ; CHANG, W. ; LIANG, D.: Crystal structure of destriptide (B28-B30) insulin: implication for insulin dissociation. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1547 (2001), S. 18–25
- [65] DIMARCHI, R.D. ; CHANCE, R.E. ; LONG, H.B. ; SHIELDS, J.E. ; SLIEKER, L.J.: Preparation of an Insulin with Improved Pharmacokinetics Relative to Human Insulin through Consideration of Structural Homology with Insulin-Like Growth Factor I. In: *Horm. Res.* 41 (suppl. 2) (1994), S. 93–96
- [66] BAKAYSA, D.L. ; RADZIUK, J. ; HAVEL, H.A. ; BRADER, M.L. ; LI, S. ; DODD, S.W. ; BEALS, J.M. ; PEKAR, A.H. ; BREMS, D.N.: Physicochemical basis for the rapid time-action of LysB28ProB29-insulin: Dissociation of a protein-ligand complex. In: *Prot. Sci.* 5 (1996), S. 2521–2531
- [67] DONOGHUE, S.I.O. ; CHANG, X. ; ABSEHER, R. ; NILGES, M. ; J.J.LED: Unraveling the symmetry ambiguity in a hexamer: Calculation of the R6 human insulin structure. In: *J. Biomol. NMR* 16 (2000), S. 93–100
- [68] VON DREELE, R. B. ; STEPHENS, P. W. ; SMITH, G. D. ; BLESSING, R. H.: The first protein crystal structure determined from high-resolution X-ray powder diffraction data: a variant of T3R3 human insulin-zinc complex produced by grinding. In: *Acta Cryst. D* 147 (2000), S. 1549–1553
- [69] WHITTINGHAM, J.L. ; D.J.EDWARDS ; ANTONSON, A.A. ; CLARKSON, J.M. ; DODDSON, G.G.: Interaction of Phenol and m-Cresol in the Insulin Hexamer, and their effect on the association of B28 Pro/Asp insulin analogues. In: *Biochemistry* 37 (1998), S. 11516–11523
- [70] BIRNBAUM, D. T. ; KILCOMONS, M. A. ; DEFELIPPIS, M. R. ; BEALS, J.M.: Assembly and Dissociation of Human Insulin and Lys(B28)Pro(B29)-Insulin Hexamers: A Comparison Study. In: *Pharmaceutical Research* 14 (1997), Nr. 1, S. 25–36
- [71] PODUST, L. ; POULOS, T. ; WATERMAN, M.: Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. In: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98 (2001), S. 3068–3073
- [72] RUHNKE, M.: Systemmykosen; Risiko Immunsuppression. In: *Pharm. unserer Zeit* 32 (2003), Nr. 2, S. 104–108
- [73] HOF, H.: Pathogene Pilze. In: *Pharm. unserer Zeit* 32 (2003), Nr. 2, S. 96–103
- [74] ROST, J.: *Die Candida-Mykose- eine Pilzerkrankung mit vielen Gesichtern.* 1. Aufl. Georg Thieme Verlag, 1994. – ISBN 3–89373–253–5
- [75] VON ZEPPELIN, M. B. ; MONDO, M.: Was passiert bei Pilzinfektionen auf molekularer Ebene? Fungale Pathogene. In: *Pharm. unserer Zeit* 32 (2003), Nr. 2, S. 110–116
- [76] BRACHER, F.: Angriffspunkt Ergosterolbiosynthese Wirkstoffe und Wirkprinzipien. In: *Pharm. unserer Zeit* 32 (2003), Nr. 2, S. 118–123
- [77] OMUSRA, T. ; ISHIMURA, Y. ; FUJII-KURIYAMA, Y.: *Cytochrome P-450.* Second Edition. VCH Verlagsgesellschaft, 1993. – ISBN 3–527–30016–3

- [78] KLINGENBERGER, M.: Pigments of Rat Liver Microsomes. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 75 (1958), S. 376–386
- [79] GARFINKEL, D.: Studies on Pig Liver Microsomes. I. Enzymic and Pigment Composition of Different Microsomal Fraction. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 77 (1958), S. 493–509
- [80] OMURA, T. ; SATO, R.: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. Evidence for its Hemoprotein Nature. In: *J. Biol. Chem.* 239 (1964), Nr. 7, S. 2370–2378
- [81] OMURA, T. ; SATO, R.: The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, Purification, and Properties. In: *J. Biol. Chem.* 239 (1964), Nr. 7, S. 2379–2385
- [82] OMURA, T. ; SATO, R.: A new Cytochrome in Liver Microsomes. In: *J. Biol. Chem.* 237 (1962), Nr. 4, S. 1375–1376
- [83] LINDMAYER, A. ; SMITH, L.: Cytochromes and other Pigments of Beaker's Yeast Grown Aerobically and Anaerobically. In: *Biochim. Biophys. Acta* 93 (1964), S. 445–461
- [84] YOSHIDA, Y. ; AOYAMA, Y. ; KUMAOKA, H. ; KUBOTA, S.: A Highly Purified Preparation of Cytochrome P-450 from Microsomes of Anaerobically Grown Yeast. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78 (1977), Nr. 3, S. 1005–1010
- [85] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y.: The 14a-Demethylation of Lanosterol by a Reconstituted Cytochrome P-450 System from Yeast Microsomes. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85 (1978), Nr. 1, S. 28–34
- [86] NEBERT, D. W. ; ADESNIK, M. ; COON, M. J. ; ESTABROOK, R. W. ; GONZALEZ, F. J. ; GUENGERICH, F. P. ; GUNSALUS, I. C. ; JOHNSON, E. F. ; KEMPER, B. ; LEVIN, W. ; PHILLIPS, I. R. ; SATO, R. ; WATERMAN, M. R.: The P450 Superfamily: Recommended Nomenclature. In: *DNA* 6 (1987), Nr. 7, S. 1–11
- [87] LEWIS, D.F.V.: *Cytochromes P450 - Structure, Function and Mechanism*. 1. Aufl. Taylor & Francis Ltd., 1996. – ISBN 0–7484–0443–0
- [88] YOSHIDA, Y. ; NOSHIRO, M. ; AOYAMA, Y. ; KAWAMOTO, T. ; HORIUCHIAND, T. ; GITOH, O.: Structural and Evolutionary Studies on Sterol 14-Demethylase P450 (CYP51), the most Conserved P450 Monooxygenase: II. Evolutionary Analysis of Protein and Gene Structures.
- [89] YOSHIDA, Y. ; AOYAMA, Y. ; NOSHIRO, M. ; GOTOH, O.: Breakthroughs and Views: Sterols 14-Demethylase P450 (Cyp51) Provides a Breakthrough for the Discussion on the Evolution of Cytochrome P450 Gene Superfamily. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (2000), S. 799–804
- [90] TATON, M. ; RAHIER, A.: Properties and structural requirements for substrate specificity of cytochrome P-450-dependent obtusifoliol 14alpha-demethylase from maize (*Zea mays*) seedling. In: *Biochem. J.* 277 (1991), S. 483–492
- [91] DEBELJAK, N. ; HORVAT, S. ; VOUK, K. ; LEE, M. ; ROZMANN, D.: Characterization of the Mouse Lanosterol 14alpha-Demethylase (CYP51), a new Member of the Evolutionarily most Conserved Cytochrome P450 Family. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 379 (2000), Nr. 1, S. 37–45

- [92] AOYAMA, Y. ; FUNAE, Y. ; NOSHIRO, M. ; HORIUCHI, T. ; YOSHIDA, Y.: Occurrence of a P450 Showing High Homology to Yeast Lanosterol 14-Demethylase (P45014Dm) in the Rat Liver. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1994), Nr. 3, S. 1320–1326
- [93] NELSON, D. R.: Cytochrome P450 and the Individuality of Species. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 369 (1999), Nr. 1, S. 1–10
- [94] KELLY, S. L. ; LAMB, D. C. ; CANNIEUX, M. ; GREETHAM, D. ; JACKSON, C. J. ; MARCZYLO, T. ; UGOCHUKWU, C. ; KELLY, D. E.: An old activity in the cytochrome P450 superfamily (CYP51) and a new story of drugs and resistance. In: *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001), Nr. 2, S. 122–128
- [95] AOYAMA, Y. ; HORIUCHI, T. ; GOTHO, O. ; NOSHIRO, M. ; YOSHIDA, Y.: CYP51-Like Gene of Mycobacterium tuberculosis Actually Encodes a P450 Similar to Eukaryotic CYP51. In: *J. Biochem.* 124 (1998), S. 694–696
- [96] BELLAMINE, A. ; MANGLA, A. T. ; NES, W. D. ; WATERMAN, M. L.: Characterization and catalytic properties of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase from Mycobacterium tuberculosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), S. 8937–8942
- [97] ROZMAN, D.: Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) - a Cholesterol biosynthetic enzyme involved in production of meiosis activating sterol in oocytes and testis - a minireview. In: *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 439 Suppl. (2000), S. R56–R57
- [98] DEBELJAK, N. ; FINK, M. ; ROZMAN, D.: Many facets of mammalian lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 409 (2003), S. 159–171
- [99] AOYAMA, Y. ; NOSHIRO, M. ; GOTOH, O. ; IMAOKA, S. ; FUNAE, Y. ; KUROSAWA, N. ; HORIUCHI, T. ; YOSHIDA, Y.: Sterol 14-Demethylase P450 (P45014DM) Is One of the Most Ancient and Conserved P450 Species. In: *J. Biochem.* 119 (1996), S. 926–933
- [100] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; KUBOTA, S. ; KUMAOKA, H. ; FURUMICHI, A.: NADPH-Cytochrome P-450 Reductase of Yeast Microsomes. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 185 (1978), Nr. 2, S. 362–369
- [101] HUBBARD, P. A. ; SHEN, A. L. ; PASCHKE, R. ; KASPER, C. B. ; KIM, J.-J. P.: NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 31, S. 29163–29170
- [102] GIBBONS, G. F. ; PULLINGER, C. R. ; MITROPOULOS, K. A.: Studies on the Mechanism of Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylation. In: *Biochem. J.* 183 (1979), S. 309–315
- [103] TRZASKOS, J. M. ; BOWEN, W. D. ; SHAFIEE, A. ; FISCHER, R. T. ; GAYLOR, J. L.: Cytochrome P-450-dependent Oxidation of Lanosterol in Cholesterol Biosynthesis. In: *J. Biol. Chem.* 259 (1984), Nr. 21, S. 13402–13412
- [104] AKHTAR, M. ; ALEXANDER, K. ; BOAR, R. B. ; MCGHIE, J. F. ; BARTON, D. H. R.: Chemical and Enzymic Studies on the Characterization of Intermediates during the Removal of the 14 $\alpha$ -Methyl Group in Cholesterol Biosynthesis. In: *Biochem. J.* 169 (1978), S. 449–463

- [105] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: Metabolism of 32-Hydroxy-24,25-dihydrolanosterol by Purified Cytochrome P-450(14DM) from Yeast. In: *J. Biol. Chem.* 262 (1987), Nr. 3, S. 1239–1243
- [106] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: Deformylation of 32-Oxo-24,25-dihydrolanosterol by the Purified Cytochrome P-450(14DM) (Lanosterol 14alpha-Demethylase from Yeast Evidence Confirming the Intermediate of Lanosterol 14alpha-Demethylation. In: *J. Biol. Chem.* 264 (1989), Nr. 31, S. 18502–18505
- [107] SHAFIEE, A. ; TRZASKOS, J. M. ; PAIK, Y.-K. ; GAYLOR, J. L.: Oxidative demethylation of lanosterol in cholesterol biosynthesis: accumulation of sterol intermediates. In: *J. Lipid Res.* 27 (1986), S. 1–10
- [108] MITROPOULOS, K. A. ; GIBBONS, G. F. ; REEVES, B. E. A.: Lanosterol 14alpha-Demethylase. Similarity of the Enzyme System from Yeast and Rat Liver. In: *Steroids* 27 (1976), S. 28–34
- [109] AKHTAR, M. ; FREEMAN, C. W. ; WILTON, D. C. ; BOAR, R. B. ; COPSEY, D. C.: The Pathway for the Removal of the 14alpha-Methyl Group of Lanosterol. In: *Bioorg. Chem.* (1977), S. 473–481
- [110] ALEXANDER, K. ; AKHTAR, M. ; B. BOAR, R. ; MCGHIE, J. F. ; BRATON, D. H. R.: The Removal of the 32-Carbon Atom as Formic Acid in Cholesterol Biosynthesis. In: *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 147 (1972), S. 383–385
- [111] RAVICHANDRAN, K. ; BODDUPALLI, S. ; HASEMANN, C. ; PETERSON, J. ; DEISENHOFER, J.: Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. In: *Science* 261 (2000), S. 731–736
- [112] HASEMANN, C. ; RAVICHANDRAN, K. ; PETERSON, J. ; DEISENHOFER, J.: Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Ang resolution. In: *J. Mol. Biol.* 236 (1994), S. 1169–1185
- [113] POULOS, T. ; FINZEL, B. ; HOWARD, A.: High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. In: *J. Mol. Biol.* 195 (1987), S. 687–700
- [114] PODUST, L. M. ; STOJAN, J. ; POULOS, T. L. ; WATERMAN, M. R.: Substrate recognition sites in 14alpha-sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of Mycobacterium tuberculosis CYP51. In: *J. Bioinorg. Chem.* 87 (2001), S. 227–235
- [115] HASEMANN, C. A. ; KURUMBAIL, R. G. ; BODDUPALLI, S. S. ; PETERSON, J. A. ; DREISENHOFER, J.: Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystall structures. In: *Structure* 2 (1995), S. 41–62
- [116] GRAHAM, S. E. ; PETERSON, J. A.: How Similar Are P450s and What Can Their Differences Teach us? In: *Arch. Biochem. Biophys.* 369 (1999), Nr. 1, S. 24–29
- [117] CUPP-VICKERY, J. R. ; POULOS, T. L.: Structure of cytochrome P450eryF: Substrate, inhibitors, and model compounds bound in the active site. In: *steroids* 62 (1997), S. 112–116
- [118] CUPP-VICKERY, J. ; POULOS, T.: Structure of cytochrome P450eryF involved in erythromycin biosynthesis. In: *Nature Struct Biol* 2 (1995), S. 144–153

- [119] LI, H. ; POULOS, T. L.: The Structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. In: *nature struc. Biol.* 4 (1997), Nr. 2, S. 140–146
- [120] SEVRIOUKOVA, I. F. ; LI, H. ; THANG, H. ; PETERSON, J. A. ; POULOS, T. L.: Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), S. 1863–1868
- [121] LI, H. ; POULOS, T. L.: Fatty acid metabolism, conformational change, and electron transfer in cytochrome P-450BM-3. In: *Biochim. Biophys. Acta.* 1441 (1999), S. 141–149
- [122] CUPP-VICKERY, J. R. ; GARCIA, C. ; HOFACRE, A. ; MCGEE-ESTRADA, K.: Ketoconazole-induced Conformational Changes in the Active Site of Cytochrome P450eryF. In: *J. Mol. Biol.* 311 (2001), S. 101–110
- [123] LI, H. ; POULOS, T. L.: Conformational dynamics in cytochrome P450-substrate interactions. In: *Biochimie* 78 (1996), S. 695–699
- [124] LEPESHEVA, G. I. ; VIRUS, C. ; WATERMAN, M. R.: Conservation in the Cyp51 Family. Role of the B'Helix/BC Loop and Helices F and G in ENzyme Function. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 30, S. 9091–9101
- [125] GOTOH, O.: Substrate Recognition Sites in Cytochrome P450 Family 2 (CYP2) Proteins Inferred from Comparative Analyses of Amino Acid and Coding Nucleotide Sequences. In: *J. Biol. Chem.* 267 (1992), Nr. 1, S. 83–90
- [126] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y.: Different Substrate Specificities of Lanosterol 14alpha-Demethylase (P-45014DM) of *Saccharomyces cerevisiae* and Rat Liver for 24-Methylene-24,25-dihydrolanosterol and 24,25-Dihydrolanosterol. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 (1991), Nr. 3, S. 1064–1071
- [127] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: The 3-hydroxy group of lanosterol is essential for orienting the substrate in the substrate site of cytochrome P-450(14Dm)(Lanosterol 14alpha-demethylase). In: *Biochim. Biophys. Acta* 1006 (1989), S. 209–213
- [128] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: Role of the 8-double bond of lanosterol in the enzyme-substrate interaction of Cytochrome P-450(14DM)(Lanosterol 14alpha-demethylase. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1001 (1989), S. 196–200
- [129] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: Role of the side chain of lanosterol in substrate recognition and catalytic activity of Lanosterol 14alpha-demethylase (cytochrome P-45014Dm) of yeast. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1081 (1991), S. 262–266
- [130] SONODA, Y. ; SEKIGAWA, Y. ; SATO, Y.: Metabolism of 24,25-Dihydrolanosterol Analogs by Partially Purified Cytochrome P-450(14DM) from Rat Liver Microsomes. In: *Chem. Pharm. Bull.* 337 (1989), Nr. 3, S. 718–722
- [131] TUCK, S. F. ; AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; DE MONTELANO, P. R. O.: Active Site Topology of *Saccharomyces cerevisiae* Lanosterol 14alpha Demethylase (CYP51) and Its G310D Mutant (Cytochrome P-450SGI). In: *J. Biol. Chem.* 267 (1992), Nr. 19, S. 13175–13179

- [132] AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: 7-oxo-24,25-dihydrolanosterol: a novel lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (P-45014DM) inhibitor which blocks electron transfer to the oxyferro intermediate. In: *Biochim. Biophys. Acta* 922 (1987), S. 270–277
- [133] SEKIGAWA, Y. ; SONODA, Y. ; SATO, Y.: Metabolism of 32-Hydroxylated 24,25-Dihydrolanosterol by Partially Purified Cytochrome P-450(14DM) from Rat Liver Microsomes. In: *Chem. Pharm. Bull.* 36 (1988), Nr. 8, S. 3049–3054
- [134] FISCHER, R. T. ; STAM, S. H. ; JOHNSON, P. R. ; KO, S. K. ; MAGOLDA, R. L. ; GAYLOR, J. L. ; TRZASKOS, J. M.: Mechanistic studies of Lanosterol 14 $\alpha$ -methyl demethylase: substrate requirements for the component fractions catalyzed by a single cytochrome P-450 isozyme. In: *J. Lipid Res.* 30 (1989), S. 1621–1632
- [135] TUCK, S. F. ; PATEL, H. ; SAFI, E. ; ROBINSON, C. H.: Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (P45014DN): effects of P450(14DM) inhibitors on sterol biosynthesis downstream of Lanosterol. In: *J. Lipid Res.* 32 (1991), S. 893–902
- [136] ARONOFF, S.: Perchloric Acid Titration of Porphyrins in Nitrobenzene. In: *J. Phys. Chem.* 62 (1958), Nr. 2, S. 428–431
- [137] WHITE, R. E. ; COON, M. J.: Heme Ligand Replacement Reactions of Cytochrome P-450. In: *J. Biol. Chem.* 257 (1982), Nr. 6, S. 3073–3083
- [138] YOSHIDA, Y. ; IMAI, Y. ; HASHIMATO-YUTSUDO, C.: Spectrophotometric Examination of Exogenous-Ligand Complexes of Ferric Cytochrome P-450. Characterization of the Axial Ligand trans to Thiolate in the Native Ferric Low-Spin Form. In: *J. Biochem* 91 (1982), S. 1651–1659
- [139] LUPETTI, A. ; DANESI, R. ; CAMPA, M. ; TACCA, M. D. ; KELLY, S.: Molecular basis of resistance to azole antifungal. In: *TRENDS Molec. Med.* 8 (2002), Nr. 2, S. 76–81
- [140] PEREA, S. ; LÓPEZ-RIBOT, J. ; KIRKPATRICK, W. R. ; MCATEE, R. K. ; SANTILLIÁN, R. A. ; MARTÍNEZ, M. ; CALABRESE, D. ; SARGLARD, D. ; PATTERSON, T. F.: Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001), Nr. 10, S. 2676–2684
- [141] PEREA, S. ; LÓPEZ-RIBOT, J. L. ; WICKES, B. L. ; KIRKPATRICK, W. R. ; DIB, O. P. ; BACHMANN, S. P. ; KELLER, S. M. ; MARTINEZ, M. ; PATTERSON, T. F.: Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002), Nr. 6, S. 1695–1703
- [142] WHITE, T. C. ; HOLLEMAN, S. ; DY, F. ; MIRELS, L. F. ; STEVENS, D. A.: Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002), Nr. 6, S. 1704–1713
- [143] MARICHAL, P. ; KOYMANS, L. ; WILLEMSSENS, S. ; BELLENS, D. ; VERHASSELT, P. ; LUYTHEN, W. ; BORGERS, M. ; RAMAEKERS, F. C. S. ; ODDS, F. C. ; BOSSCHE, H. V.: Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -Demethylase (Erg11p, Cyp51) to azole resistance in *Candida albicans*. In: *Microbiology* 145 (1999), S. 2701–2713

- [144] FAVRE, B. ; DIDMON, M. ; RYDER, N. S.: Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14alpha-demethylase contribute to azol resistance in *Candida albicans*. In: *Microbiology* 145 (1999), S. 2715–2725
- [145] NAKAYAMA, H. ; NAKAYAMA, N. ; ARISAWA, M. ; AOKI, Y.: In Vitro and In Vivo Effects of 14alpha-Demethylase (ERG11) Depletion in *Candida glabrata*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001), Nr. 1, S. 3037–3045
- [146] OROZCO, A. S. ; HIGGINBOTHAM, L. M. ; HITCHCOCK, C. A. ; PARKINSON, T. ; FALCONER, D. ; IBRAHIM, A. S. ; GHANNOUM, M. A. ; FILLER, S. G.: Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998), Nr. 10, S. 2645–2649
- [147] LAI, M. H. ; KIRSCH, D. R.: Nucleotide sequence of Cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14alpha-demethylase) from *Candida albicans*. In: *Nucleic Acids Res.* 17 (1989), Nr. 2, S. 804
- [148] STRÖMSTEDT, M. ; ROZMAN, D. ; WATERMANN, M. R.: The Ubiquitously Expressed Human Cyp51 Encodes Lanosterol 14alpha-Demethylase, a Cytochrome P450 Whose Expression is Regulated by Oxysterols. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 329 (1996), Nr. 1, S. 73–81
- [149] BAIROCH, A. ; APWEILER, R.: The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. In: *Nucleic Acids Res.* 28 (2000), S. 45–48
- [150] TRETIAKOV, V. E. ; DEGTYARENKO, K. N. ; UVAROV, V. Y. ; ARCHAKOV, A. I.: Secondary Structure and Membrane Topology of Cythochrome P450s. In: *Arch Biochem. Biophys.* 275 (1989), Nr. 2, S. 429–439
- [151] LAMB, D. C. ; KELLY, D. E. ; VENKATESWARLU, K. ; NIGEL, N. J. ; FRANCES, H. ; BLIGH, J. ; SCHUNK, W.-H. ; KELLY, S. L.: Generation of a Complete, Soluble, and Catalytically Active Sterol 14alpha-Demethylase-Reductase Complex. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 27, S. 8733–8738
- [152] HITCHCOCK, C. A.: Cytochrome P-450-dependent 14alpha demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungal. In: *Biochem. Soc. Trans.* 19 (1991), S. 783–787
- [153] LAMB, D. C. ; KADERBHAI, N. N. ; KELLY, D. E. ; KELLY, S. L. ; KABERBHAI, M. A.: HUman Sterol 14alpha-Demethylase Activity Is Enhanced by the Membrane-Bound State of Cytochrome b5. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 395 (2001), Nr. 1, S. 78–84
- [154] RAAG, R. ; SWANSON, B. A. ; POULOS, T. L. ; MONTELLANO, P. R. O.: Formation, Crystal Structure, and Rearrangement of a Cytochrome P-450cam Iron-Phenyl Complex. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 35, S. 8119–8126
- [155] SWANSON, B. A. ; DE MONTELLANO, P-R. O.: Structure and Absolute Stereochemistry of the four N-Phenylprotoporphyrin IX Regioisomers Isolated from Phenylhydrazine-Treated Myoglobin. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), Nr. 21, S. 8146–8153
- [156] TUCK, S. F. ; PETERSON, J. A. ; DE MONTELLANO, P. R. O.: Active Site Topologies of Bacterial Cytochromes P450101(P450cam) P450108 (P450terp), and P450102 (P450BM-3). In: *J. Biol. Chem.* 267 (1992), Nr. 8, S. 5614–5620

- [157] SWANSON, B. A. ; HALPERT, J. R. ; BORNHEIM, L. M. ; DE MONTELLANO, P. R. O.: Topological Analysis of the Active Sites of Cytochromes P40IIB4, P450IIB10(Mouse), and P450IIB11 (Dog) by in Situ Rearrangement of Phenyl-Iron Complexes. In: *Arch. Biochem. Biophys* 292 (1992), Nr. 1, S. 42–46
- [158] SWANSON, B. A. ; DUTTON, D. R. ; LUNETTA, J. M. ; YANG, C. S. ; DE MONTELLANO, P. R. O.: The Active Sites of Cytochromes P450 IA1, IIB1, IIB2, and IIE1. In: *J. Biol. Chem.* 266 (1991), Nr. 29, S. 19258–19264
- [159] ALRICHS, R. ; BÄR, M. ; HÄSER, M. ; HORN, H. ; KLÖMEL, C.: Electronic Structure calculation on Workstation computers: The Program system Turbomole. In: *Chem. Phys. Lett.* 162 (1989), Nr. 3, S. 165–169
- [160] WEIGAND, F. ; HÄ, M.: RI-MP2: first derivatives and global consistency. In: *Theor. Chem. Acc.* 97 (1997), S. 331–340
- [161] SCHÄFER, A. ; HUBER, C. ; ALRICHS, R.: Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for Li to Kr. In: *J. Chem. Phys.* 100 (1994), Nr. 8, S. 5829–583
- [162] TAFI, A. ; COSTA, R. ; BOTTA, M. ; SANTO, R. D. ; CORELLI, F. ; MASSA, S. ; CIACCI, A. ; MANETTI, F. ; ARTICO, M.: Antifungal Agents. 10. Derivatives of 1-[(Aryl)[4-aryl-1H-pyrrol-3-yl]methyl]-1H-imidazole, Synthesis, Anti-Candida Activity, and Quantitative Structure-Analysis Relationship Studies. In: *J. Med. Chem.* 45 (2002), Nr. 13, S. 2720–2732
- [163] BOTTA, M. ; CORELLI, F. ; GASPARRINI, F. ; MESSINA, F. ; MUGNAINI, C.: Chiral Azole Derivatives. 4. Enantiomers of Bifonazol and Related Antifungal Agents: Synthesis, Configuration Assignment, and Biological Evaluation. In: *J. Org. Chem.* 65 (2000), Nr. 15, S. 4736–4739
- [164] LAMB, D. C. ; KELLY, D. ; WATERMANN, M. B. ; STROMSTED, M. ; ROZMAN, D. ; KELLY, S.: Characteristic of the Heterologously Expressed Human Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (Other Names: P45014DM, CYP51, P45051) and Inhibition of Purified Human and *Candida albicans* CYP51 with Azole Antifungal Agents. In: *Yeast* 15 (1999), S. 755–763
- [165] ROTSTEIN, D. M. ; KERTESZ, D. J. ; WALKER, K. A. M. ; SWINNEY, D. C.: Stereoisomers of Ketokonazole: Preparation and Biological Activity. In: *J. Med. Chem.* 35 (1992), Nr. 15, S. 2818–2825
- [166] BOSCOFF, P. E. ; GRANT, G. H.: Modeling cytochrome P450 14 $\alpha$  demethylase (*Candida albicans*) from P450cam. In: *J. Mol. Graphics* 12 (1994), S. 185–192
- [167] HÖLTJE, H.-D. ; FATTORUSSO, C.: Construction of a model of the *Candida albicans* lanosterol 14- $\alpha$ -Demethylase active site using the homology modelling technique. In: *Pharm. Act. Helv.* 72 (1998), S. 271–277
- [168] LEWIS, D. F. V. ; WISEMANN, A. ; TARBIT, M. H.: Molecular Modelling of Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) from *Saccharomyces cerevisiae* via Homology with CYP102, a unique Bacterial Cytochrome P40 Isoform: Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) within two related series of Antifungal Azole Derivatives. In: *J. Enz. Inhib.* 14 (1999), S. 175–192



- [169] Ji, H. ; ZHANG, W. ; ZHIU, Y. ; ZHANG, M. ; ZHU, J. ; SONG, Y. ; LÜ, J. ; ZHU, J.: A Three-Dimensional Model of Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase of *Candida albicans* and Its Interaction with Azole Antifungals. In: *J. Med. Chem.* 43 (2000), Nr. 13, S. 2495–2505
- [170] ROSSELLO, A. ; BERTINI, S. ; LAPUCCI, A. ; MACCHIA, M. ; MARTINELLI, A. ; RAPPOSELLI, S. ; HERREROS, E. ; MACCHIA, B.: Synthesis, Antifungal Activity, and Molecular Modeling Studies of New Inverted Oxime Ethers of Oxiconazole. In: *J. Med. Chem* 45 (2002), Nr. 22, S. 4903–4912
- [171] Ji, H. ; ZHANG, W. ; M.ZHANG ; KUDO, M. ; AOYAMA, Y. ; YOSHIDA, Y. ; SHENG, C. ; SONG, Y. ; YANG, S. ; ZHOU, Y. ; LÜ, J. ; ZHU, J.: Structur-Based de Novo Design, Synthesis and Biological Evaluation of Non-Azole Inhibitors Specific for Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase of Fungi. In: *J. Med. Chem.* 46 (2003), Nr. 4, S. 474–485



# Anhang A

## Bezeichnung der Aminosäuren

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



# Anhang B

## Farbtabelle der Atomtypen

Atomtyp	Farben
C	grün oder weiß
O	rot
N	blau
S	gelb
H	weiß oder cyan
Zn	magenta
Cl	hellgrün
F	blaugrün
Fe	magenta oder blaugrün
Na	blau



# Anhang C

## Glossar

**Austauschenergie, -Potential** Die Austauschenergie ist eine Korrektur, die am Coulomb-Integral  $J$  vorgenommen wird, um den Effekt der Spinkorrelation zu berücksichtigen. Dieser quantenmechanische Effekt erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Elektronen mit entgegengesetztem Spin in geringer Entfernung voneinander angetroffen werden, hält jedoch Elektronen mit gleicher Spinorientierung auseinander. Wenn zwei Elektronen denselben Spin besitzen, ist die wahre mittlere Abstoßungsenergie kleiner als  $J$ , da die Elektronen bestrebt sind, sich voneinander zu entfernen. Die mittlere Abstoßungsenergie reduziert sich von  $J$  auf  $J - K$ . Dabei bezeichnet  $K$  das Austauschintegral. Dieses ist immer positiv und wird bei der Hartree-Fock-Theorie automatisch berücksichtigt.

**Alignment** Vergleich zweier oder mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen, bei dem gleiche oder sehr ähnliche Sequenzbereiche der unterschiedlichen Moleküle in der Regel untereinander geschrieben werden.

**Apoplexien** Schlaganfall oder Gehirnschlag, ursächlich als 1. ischämischer Hirninfarkt infolge arterieller Durchblutungsstörungen in ca. 80 % der Fälle, 2. als intrazerebrale Massenblutung nach Ruptur eines Gefäßes mit schlechter Prognose. Die Klinik umfasst als Vorzeichen Vertigose, Tinnitus; sie beginnt akut mit Hemiparese und Gesichtsmuskelparese, die Irreversibel sein können.

**Ektotoxine** Ezernierte giftige Stoffwechselprodukte von Bakterien und anderen Organismen.

**Exotoxine** Gifte, die nach der Auflösung der Bakterien und anderer Organismen freierwerden.

**glomeruläre Kapillaren** Glomerulum/us. Kapillarknäuel der Malpighi-Körperchen bzw. Nierenkörperchen in der Nierenrinde; in ihnen erfolgt die Bildung des Primärharns. Die einzelnen Kapillarschlingen sind vom inneren Blatt der Bowman-Kapsel überzogen; zuführendes und abführendes Gefäß werden als Vas afferens und efferens bezeichnet. Beide Nieren weisen ca. 2 Mio. G. auf, deren Filtrationsleistung bei 180 l / Tag liegt.

**IC-Wert** engl.: inhibitory concentration (IC); die kleinste Konzentration eines Wirkstoffes, die ein bestimmtes Zielprotein inhibieren kann. Der  $IC_{50}$  beschreibt die Konzentration, die nötig ist, um 50 % eines Ziels zu inhibieren. Unter Ziel versteht man meist bestimmte Proteine wie Rezeptoren oder Enzyme. Bei Enzymen entspricht der  $IC_{50}$ -Wert der Konzentration, bei der die Enzymaktivität um 50 % gesenkt wird.

**iatrogen** Durch ärztliche Einwirkung infolge einer Therapie oder bei der Diagnostik verursacht bzw. entstanden.

**Kommensale, Kommensalismus** Mitesser; bakterielle Symbionten leben als Partner friedlich mit dem Menschen zusammen und schützen ihn vor pathogenen Keimen. Diese auch als fakultativ pathogen bezeichneten Keime finden sich auf Haut und Schleimhäuten von Gesunden. Bei Verschleppung dieser Keime an unphysiologische Orte kommt es zur Infektion. Beispiele für K. sind *Escherichia coli* im Dickdarm und *Lactobazillus vaginae*.

**Korrelationsenergie, -Potential** Die Korrelationsenergie ist der Energieanteil, der durch die Wechselwirkung zweier lokaler Elektronen zur Verzerrung eines Orbitals führt. Wichtig ist diese Energie allerdings nur, wenn man Strukturen außerhalb des Gleichgewichtszustandes berechnen möchte, da bei Vernachlässigung der Korrelationsenergie die Kraftkonstanten außerhalb des Gleichgewichtszustandes viel zu hoch berechnet werden.



**MIC-Wert** Abk.: MHK, MIC; engl.: minimum inhibitory concentration (MIC); die kleinste Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) eines antimikrobiellen Wirkstoffes (z.B. Antibiotikum), die die Keimvermehrung im Kulturansatz noch verhindert.

**nosokomiale Infektionen, Übertragung** Erregerbedingte Entzündungen, die durch Keime hervorgerufen werden, die normalerweise zu keiner Erkrankung führen. N.I. treten in Intensivstationen meist durch Vernachlässigung der Hygienevorschriften auf. Dabei werden die Keime vom Personal auf die oft immungeschwächten Patienten übertragen. Zusätzlich spielen auch antibiotikaresistente Hospitalismusekime eine Rolle.

**Paresen** paresis ... erschlafft; Schwäche eines Muskels oder einer gesamten Extremität oder auch des Zwerchfells aufgrund einer Schädigung der entsprechenden Nerven. Paresen kommen bei Myasthenia gravis, nach Apoplexie und Poliomyelitis vor. Bei Querschnittssyndrom kann die Parese zunächst spastisch, später schlaff ausgebildet sein; sie kann auch in eine komplette Paralyse übergehen.

**Paresthesien** Der Begriff "Parästhesie" beschreibt die vom Patienten beklagten Kribbel-Missempfindungen, zum Beispiel an den Händen oder Füßen, was eine Störung der Oberflächensensibilität (Empfindlichkeit), wie zum Beispiel die Kälteempfindlichkeit beim Raynaud-Syndrom, bedingt.

**Relaxin** Polypeptidhormon. Strukturell sehr ähnlich zu Insulin. Seit längerem bekannt als "Schwangerschaftshormon". In geringem Maße sind auch Vorkommen in der Prostata des Mannes bekannt. In der Schwangerschaft lockert Relaxin das Gewebe im Geburtskanal und bereitet die Brustdrüsen auf den Stillvorgang vor.

Seit neuerem auch bei herzinsuffizienten Patienten im Herzen nachgewiesen. Relaxin hemmt dabei die mit der Drucksteigerung verbundene Vermehrung von Bindegewebszellen im Herzmuskelgewebe.

**Schwannsche Zellen** Schwannsche Zellen (lateinisch Gliocytus periphericus; englisch Schwann cell) bilden im peripheren Nervensystem die Markscheiden der markhaltigen Nerven und die Hüllen um marklose Axone aus. Diese Gliazellen ernähren und isolieren die Axone der zugehörigen Nerven und können eine Längenausdehnung von zum Teil über  $100\ \mu\text{m}$  aufweisen. Zwischen benachbarten Schwann-Zellen bilden

sich entlang der zugehörigen markhaltigen Nerven die Ranvierscher'schen Schnürringe aus, an denen die springende (saltatorische, sehr schnelle) Reizweiterleitung erfolgt. Gelegentlich finden sich schräg verlaufende Unterbrechungen der sonst sehr engen Wicklungen der Markscheide, die Schmidt-Lantermann'schen Einkerbungen.

**Xenobiotika** Für ein best. Ökosystem von Natur aus fremde Substanzen; z.B. die in der Umwelt des Menschen vork. luft- u./oder wasserverunreinigenden Substanzen (z.B. Schädlingsbekämpfungsmittel, Arzneistoffe, Kosmetika etc.).

# Anhang D

## Verwendete Hard- und Software

Die Berechnungen in dieser Arbeit wurden mit den folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

- SGI IRIS O2 R12000
- SGI IRIS INDIGO<sup>2</sup> R10000
- SGI IRIS O2 R5000
- SGI Origin 2000 mit 38 R10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
- Fujitsu Siemens PC-Cluster 16 Pentium III 500 MHz 8 Pentium III 800 MHz (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Folgende Software wurde genutzt:

<b>PSIPRED</b>	Programm zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen
<b>INSIGHT II</b>	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHT II/DISCOVER der Firma accelrys zur Visualisierung
<b>HOMOLOGY</b>	Modul des Programmpakets INSIGHT II/DISCOVER der Firma accelrys zur Erstellung von Homologie-basierten Protein-Modellen
<b>SCWRL</b>	Programm zur Optimierung der Position von Protein-Seitenketten Computermodellen nach Mutation
<b>PROCHECK</b>	Programm zur Überprüfung der Proteingeometrie
<b>GROMACS</b>	Molecular Modelling-Software zur Berechnung von Moleküldynamik-Simulationen in einer Lösungsmittelbox
<b>SYBYL</b>	Molecular Modelling-Paket der Firma TRIPOS

# Anhang E

## Abkürzungsverzeichnis, Einheiten

### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
Cyp	Cytochrom P450
Cyp51	Cytochrom P450 Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase
Cyp51MTB	CYP51 aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DFT	Dichtefunktional Theorie
d.h.	das heißt
et al.	et altera; und andere
evtl.	eventuell
H-Brücke/n	Wasserstoffbrücke/n
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
P450 <sub>14DM</sub>	Cytochrom P450 Lanosterol 14-Demethylase
P450 <sub>BM-3</sub>	Cytochrom P450 Fettsäure-Monooxygenase aus <i>Bacillus megaterium</i>
P450 <sub>cam</sub>	Cytochrom P450 Campherhydroxylase aus <i>Pseudomonas putida</i>
P450 <sub>EryF</sub>	Monooxygenase aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>
P450 <sub>terp</sub>	Cytochrom P450 $\alpha$ -Terpineol-Hydroxylase aus <i>Pseudomonas</i>

PME	Particle Mesh Ewald
RMS / RMSD	Root Mean Square / Deviation
RMSF	Root Mean Square / Fluktuation
s. Abb.	siehe Abbildung
SCR	Structurally Conserved Region
SDEP	Standard Deviation of Error Prediction
SGI	Silicon Graphics Inc.
sog.	sogenannt
SPC-Wasser	Single Point Charge-Modell für Wasser
SRS	Substrate Recognition Site
s. Tab.	siehe Tabelle
SVR	Structurally Variable Regions
usw.	und so weiter
z.B.	zum Beispiel

### Einheiten

Å	Ångström, Längeneinheit ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
Da	Dalton
K	Kelvin, Temperatureinheit ( $0 \text{ K} = -273,15^\circ \text{ Celsius}$ )
kJ	Kilojoule, Energieeinheit ( $1 \text{ kJ} = 0,239 \text{ kcal}$ )
ps	Picosekunde, Zeiteinheit ( $1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$ )
mol	Mol, Einheit der Stoffmenge ( $1 \text{ mol} = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ Teilchen}$ )
nm	Nanometer, Längeneinheit ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ )
ns	Nanosekunde, Zeiteinheit ( $1 \text{ ns} = 10^{-9} \text{ s}$ )

# Anhang F

## Übergangsstrukturen des Insulins

**$T_3T_3'$ -Struktur:** Diese Struktur wird als erstes Transformationsprodukt nur theoretisch diskutiert. Es wird vermutet, dass hier Wassermoleküle gegen heterotrope Liganden ausgetauscht werden, was aber noch nicht ausreicht, um ein T-Trimer in ein R-Trimer zu überführen. Erhärtert wird diese Vermutung durch Titrations mit KSCN, bei denen schon bei geringer  $SCN^-$  Konzentration eine Hyperchromie des UV-Spektrums zu beobachten ist, die auf eine Veränderung in der Komplexbindung hindeutet.

**$T_3R_3^f$ -Struktur:** Hierbei handelt es sich um eine typische Übergangsstruktur. Der einzige Unterschied zur  $T_3R_3$ -Struktur besteht darin, dass das N-terminale Ende der B-Kette noch nicht als  $\alpha$ -Helix vorliegt, sondern erst ab der Aminosäure B4 in eine helikale Struktur übergeht, während die Aminosäuren B1-B3 noch keine Sekundärstruktur besitzen. Das ist wahrscheinlich auf die unvollständige Besetzung der Phenol bindenden Taschen zurückzuführen, die aber noch genauer beschrieben werden. Die  $T_3R_3^f$ -Struktur enthält neben dem Phenolliganden in der Phenol bindenden Tasche zwei Wassermoleküle, die durch einen zweiten phenolischen Liganden stabil an die Insulin B-Kette gebunden werden. Diese Struktur bildet sich allerdings nur aus, wenn an dem phenolischen Liganden eine polare Gruppe in para-Stellung substituiert wurde.

**$R_3R_3'$ -Struktur:** Sobald die Konzentration der homotropen Liganden mindestens zur Besetzung von drei der sechs Phenolbindenden Taschen ausreicht, entsteht kurz vor der Umwandlung in die  $R_6$ -Struktur die  $R_3R_3'$ -Struktur. Durch die Bindung der homotropen Liganden auf der einen Seite öffnen sich auf der anderen Seite die

Phenolbindenden Taschen und werden mit Wasser aufgefüllt. Auf Grund des positiv kooperativen Effektes können auf beiden Seiten des Hexamers R-Strukturen stabilisiert werden, die sich jedoch in der Bindungsstärke des Komplexes und damit spektroskopisch unterscheiden.



## **Anhang G**

### **Sekundärstrukturvorhersagen**





# Curriculum Vitae

<b>NAME</b>	Bernd Friedrich Rupp
<b>GEBURTSTAG</b>	03. September 1972
<b>GEBURTSORT</b>	Creglingen
<b>FAMILIENSTAND</b>	ledig
<b>SCHULBILDUNG</b> 1984 - 1990	Realschule, Creglingen
<b>BERUFLICHE AUSBILDUNG</b> 1990 - 1992	Berufskolleg für Chemisch- technische Assistenten an der Naturwiss.- Technischen Akademie, Prof. Dr. Grübler, Isny im Allgäu Abschlüsse: - Chemisch-technischer Assistent - Fachhochschulreife
<b>STUDIUM</b> 10/1992 - 03/1996	Studium zum Diplom-Ingenieur (FH) für Pharmazeutische Chemie an der Naturwissenschaftlich-Technischen Akademie, Prof. Dr. Grübler, Isny im Allgäu
<b>WEHRDIENST</b> 03/1997-12/1997	Sanitätssoldat der Luftwaffenanitätsstaffel Radarführungsabteilung 23, Lauda-Königshofen
<b>STUDIUM</b> 4/1998-4/1999	Studium zur Vorbereitung der Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in den Fächern: Biochemie, Theoretische Chemie, Physikalische Chemie und Pharmazeutische Chemie
<b>BERUFSTÄTIGKEIT</b> seit 07/1999	Promotionsstudent und Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf