

**Molecular Modelling Untersuchungen an der
Dihydropyridin-Bindungsstelle
von offenen Ca²⁺-Kanälen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Vollbrecht

aus Schleswig

Düsseldorf 2004

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

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht und kann incl.
der Farbabbildungen unter: <http://www.ub.uni-duesseldorf.de/> abgerufen
werden.

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje

Koreferent: PD Dr. Klaus-Jürgen Schleifer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2004

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2000 bis Juli 2004 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die außergewöhnlich guten Arbeitsbedingungen.

Herrn PD Dr. K.-J. Schleifer danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit. Seine Einführung am Beginn der Promotion hat mir sehr geholfen. Auch nach seinem Wechsel zur BASF war er per Email und auf Kongressen stets zu Anregungen und Diskussionen bereit und fertigte abschließend das Zweitgutachten für diese Dissertation.

Schließlich danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises und der WE Pharmazie für die freundschaftliche Atmosphäre und die konstruktive Zusammenarbeit.

INHALT

1	EINLEITUNG	11
1.1	Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems	11
1.2	Ca ²⁺ -Ionen im Mechanismus der Blutdruckregulation	13
1.3	Spannungsgesteuerte Ionenkanäle.....	15
1.3.1	Aufbau.....	16
1.3.2	Die Template: Kristallstrukturen von K ⁺ -Kanälen	20
1.3.3	Selektivität.....	24
1.4	Molekulare Grundlagen der DHP-Bindungsstelle.....	25
1.4.1	Ca ²⁺ -Kanal-Inaktivierung.....	25
1.4.2	Experimentelle Bestimmung der DHP-sensitiven Aminosäuren.....	27
1.5	Dihydropyridine – Wirkung und Pharmakophor	29
1.5.1	Erkundung des Dihydropyridin-Pharmakophors	29
1.5.2	Zusammenfassung des Pharmakophors.....	39
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	43
3	METHODEN	47
3.1	Homologie Modelling	47
3.1.1	Sekundärstrukturvorhersagen	47
3.1.2	Multiples Sequenz-Alignment	49
3.2	Seitenkettenrotamer-Bibliotheken.....	52
3.2.1	Die Bibliothek nach Ponder und Richards	52
3.2.2	SCWRL.....	52
3.2.3	PROCHECK.....	53
3.3	Liganden-Docking	53
3.3.1	AutoDock	53
3.3.2	FlexX.....	55
3.4	Quantenchemie	59
3.5	Kraftfeldmethoden	60
3.6	Moleküldynamiksimulation (MDS).....	64

3.6.1	Clustereinteilung mit dem Programm NMRClust	66
4	DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	71
4.1	Determination der transmembranären helikalen Bereiche	73
4.2	Multiples Sequenz-Alignment (MSA).....	76
4.3	Struktur-Alignment.....	83
4.3.1	Aufbau des Modells.....	83
4.4	Optimierung des Modells auf die DHP-Liganden.....	92
4.4.1	Gen-Alignment	95
4.4.2	Modelle auf der Grundlage der Kristallstruktur des K ⁺ -Kanals KvAP	98
4.4.3	Docken der Liganden	101
4.4.4	Vergleich mit dem vorliegenden Pharmakophor	105
4.4.5	Docken eines DHPs mit größerem Rest auf der Backbordseite	108
4.4.6	Vergleich von Modellen der DHP-Bindungsstelle am offenen und geschlossenen Kanal	110
4.5	Moleküldynamiksimulationen (MDS).....	113
4.5.1	Moleküldynamiksimulationen des Agonisten	116
4.5.2	Moleküldynamiksimulationen des Antagonisten	124
4.5.3	Qualität des Modells.....	128
4.6	Untersuchung der Möglichkeit eines Charge-Transfer-Komplexes.....	131
5	DISKUSSION	135
5.1	Bau der Modelle.....	135
5.2	Das Selektivitätsfenster	138
5.3	Die DHP-Bindungsstelle	139
5.3.1	Vergleich von Ca ²⁺ -Kanal-Modellen in der offenen und der geschlossenen Konformation	140
5.3.2	Docking-Ergebnisse	141
5.4	Moleküldynamiksimulationen	142
5.5	Abschlussbemerkungen.....	145
6	ZUSAMMENFASSUNG	149

7	LITERATURVERZEICHNIS.....	153
8	ANHANG	163
	Anhang A: Abkürzungen	163
	Anhang B: Aminosäuren: Drei- und Einbuchstabencode.....	164
	Anhang C: Nomenklatur der Modelle.....	165
	Anhang D: Benutzte Hard- und Software.....	166
	Anhang E: Eingabedateien.....	167

1 Einleitung

1 Einleitung

Als Arthur Rudolf Hantzsch im Jahr 1882 die „Hantzsch-Synthese“ zur Herstellung von Pyrrol- und Dihydropyridin-Derivaten vorstellte, konnte er nicht ahnen, dass er hiermit die Möglichkeit zur Synthese potenter Arzneimittel zur Therapie der Hypertonie und damit zur Gruppe der Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems geschaffen hatte. Diese Wirkung wurde erst in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts erkannt. Schließlich wurde 1975 mit Nifedipin (Adalat[®]) das erste Dihydropyridin-Derivat (DHP) in die Therapie der Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems eingeführt [25].

1.1 Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems

Hypertonie ist eine Volkskrankheit, die bei 15% der Bevölkerung diagnostiziert wird. In der westlichen Gesellschaft ist jedoch eine steigende Tendenz zu bemerken. Die WHO definiert Hypertonie als einen Blutdruck, der 160/95 mmHg nach Riva-Rocci erreicht bzw. übersteigt. Es wird unterschieden zwischen primärer, also angeborener, und sekundärer Hypertonie, die Folge einer bekannten Grundkrankheit, z.B. einer endokrinen, renalen, kardiovaskulären oder neurogenen Störung oder eines Phäochromocytoms (Katechol-bildender Tumor) ist. 80% der Erkrankten haben eine primäre Hypertonie. Diese wird u. a. ausgelöst durch Übergewicht, ungesunde Ernährung, Stress und Nikotin- oder Alkoholabusus, also Dinge, die in einer Wohlstandsgesellschaft weit verbreitet sind. Hypertonie entsteht auch durch den normalen Alterungsprozess, während dessen die Gefäße durch Alterung oder atherosklerotische Veränderungen die Elastizität verlieren.

Normalerweise leben die an einer Hypertonie erkrankten Patienten jahre- bis jahrzehntelang beschwerdefrei, da die Hypertonie zunächst symptomfrei ist. Die Patienten sind jedoch leicht an z.B. der „frischen“, roten Gesichtsfarbe und dem starken Drang zur Aktivität zu erkennen. Es ist daher häufig ein Problem, die Patienten von der Notwendigkeit einer antihypertensiven Therapie zu überzeugen. Schließlich fühlen sie sich gut und die anfänglichen Beeinträchtigungen während der Therapie sind nicht förderlich für die Patienten-Compliance. Es treten jedoch durch die Dauerbelastung der Gefäße und des Herzens schwerwiegende Folgeerkrankungen auf, wie z.B. Angina pectoris, Arteriosklerose, Herzmuskelversagen,

Myocardinfarkt, Arrhythmien, apoplektischer Insult oder Niereninsuffizienz. Diese Krankheiten ziehen eine lebenslange Behandlung nach sich, die nicht nur kostenintensiv ist, sondern vor allem die Lebensqualität und Lebenserwartung des Patienten einschränkt.

Bei Diagnose einer sekundären Hypertonie wird natürlich die zu Grunde liegende Erkrankung therapiert und zusätzliche Maßnahmen zur Senkung des Blutdrucks ergriffen. Diese Patienten spüren eine gesundheitliche Beeinträchtigung und sind daher bereit, zusätzlich die unten beschriebenen medikamentösen Maßnahmen zu ergreifen.

Bei der primären Hypertonie beginnt die Behandlung mit allgemeinen Maßnahmen wie Reduktion des Übergewichts (eine Abnahme von 5 kg bewirkt eine Senkung von 10 mm Hg), Vermeidung von Stress bzw. Stressabbau durch autogenes Training, Reduktion des Alkohol- und Nikotin-Genusses sowie körperliche Aktivität. Führt dies nicht zu einer erfolgreichen Senkung des Blutdrucks, wird die medikamentöse Therapie zuerst in Form einer Monotherapie begonnen. Hierfür stehen Diuretika zur Verringerung des Blutvolumens, β -Blocker, welche den blutdrucksteigernden Einfluss des vegetativen sympathischen Nervensystems einschränken, ACE (angiotensin converting enzyme)-Inhibitoren und Sartane, die beide ins Renin-Angiotensin-Alodsteron-System eingreifen und Ca^{2+} -Antagonisten vom Phenylalkylamin-, vom Benzothiazepin- und vom Nifedipin-Typ, die den Ca^{2+} -Influx in die Zelle und damit die Kontraktionsfähigkeit der Gefäßmuskelzellen einschränken, zur Verfügung (Abbildung 1.1). Bewirkt auch eine medikamentöse Monotherapie keine ausreichende Blutdrucksenkung, so wird eine Kombinationstherapie in Erwägung gezogen. Diuretika werden mit Beta-Blockern, Ca^{2+} -Antagonisten, ACE-Hemmern oder α_1 -Blockern kombiniert. Auch die Kombination eines Ca^{2+} -Antagonisten mit einem Beta-Blocker oder einem ACE-Hemmer ist möglich. Schließlich gibt es die Möglichkeit einer Dreierkombination. Es muss immer auf die individuellen Gegebenheiten des Patienten eingegangen werden. Z.B. eignen sich β -Blocker gut für jugendliche Patienten mit Tachykardie, bei Neigung zu Bronchospasmen sind sie jedoch kontraindiziert. Diuretika werden bevorzugt bei Hypertonikern mit bereits bestehender Herzinsuffizienz eingesetzt, um Vor- und Nachlast des Herzens zu verringern, da sie die K^+ -Ausscheidung fördern, sollten sie jedoch nicht bei Neigung zu Hypokaliämie gegeben werden. In großangelegten Studien konnte nachgewiesen

werden, dass bei Beachtung der Anamnese und der Arzneimittel-Interaktionen Morbidität und Mortalität abnehmen [57].

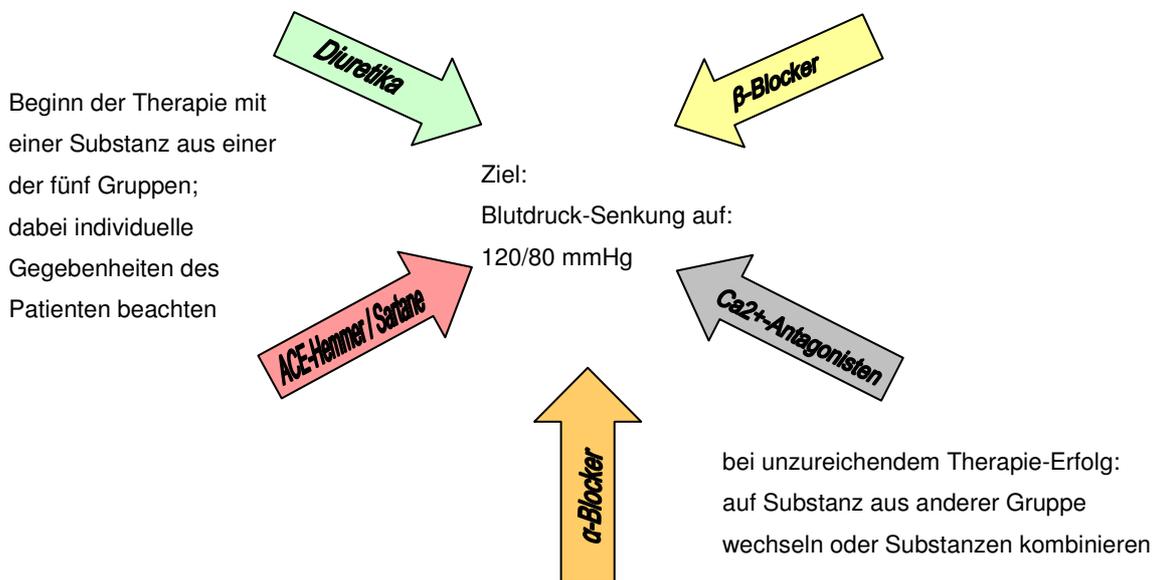


Abbildung 1.1: Möglichkeiten der medikamentösen Behandlung der Hypertonie nach [57]

Mit diesen Maßnahmen lässt sich in 90-95% der Fälle eine ausreichende Blutdrucksenkung erreichen. Dies bedeutet für die Patienten einen Gewinn an Lebensjahren und durch die Vermeidung von Folgekrankheiten einen Gewinn an Lebensqualität. [58]

1.2 Ca^{2+} -Ionen im Mechanismus der Blutdruckregulation

Der Blutdruck wird in letzter Instanz durch den Tonus der Blutgefäße bestimmt. Diese Gefäßspannung wird durch glatte Muskelzellen eingestellt. Mittels Kontraktion wird der Gefäßraum, das sog. Lumen, verengt, es wird mehr Druck benötigt, um den Blutfluss aufrecht zu erhalten. Dilatieren die glatten Gefäßmuskel-Zellen, sinkt der Blutdruck. Zur Kontraktion von Muskelzellen werden generell Ca^{2+} -Ionen benötigt. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Rolle des Ca^{2+} in der Kontraktion glatter Muskelzellen. Diese haben einerseits einen Ca^{2+} -Ionen-Vorrat im sarkoplasmatischen Retikulum. Zum anderen verfügen sie über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran. Bei einer Depolarisation der Membran durch das Öffnen von Na^{+} - und K^{+} -Kanälen während eines Aktionspotentials kommt es durch

die Veränderung des Membranpotentials zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen und damit zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Hierdurch wird zusätzlich der Ca^{2+} -Ionen-Vorrat aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Dieser Trigger-Effekt bewirkt ein sehr schnelles Anfluten von Ca^{2+} -Ionen. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen-Konzentration steigt von 10^{-7}M auf mehr als 10^{-6}M [25]. Bei dieser Konzentration kommt es zu einer Muskelfaserkontraktion. Wie Abbildung 1.2 zeigt, werden Ca^{2+} -Ionen an Troponin gebunden, welches daraufhin seine Konformation ändert. Dies erlaubt den Tropomyosinfäden, tiefer in die Rinne zwischen den Aktinfäden der Muskelzelle einzudringen. Nun kommt es zur Verbrückung der Myosinköpfe an die Aktinfilamente. Unter Spaltung eines am Myosinkopf gebundenen ATPs wird durch Neigung der Querbrücke um 45° das Aktinfilament gegen das Myosinfilament verschoben. Die erneute Bindung eines ATPs hebt die Verbrückung auf. Der Zyklus wiederholt sich und so werden die Aktinfilamente weiter in die Myosinfilamente hineingezogen. Die Zelle kontrahiert.

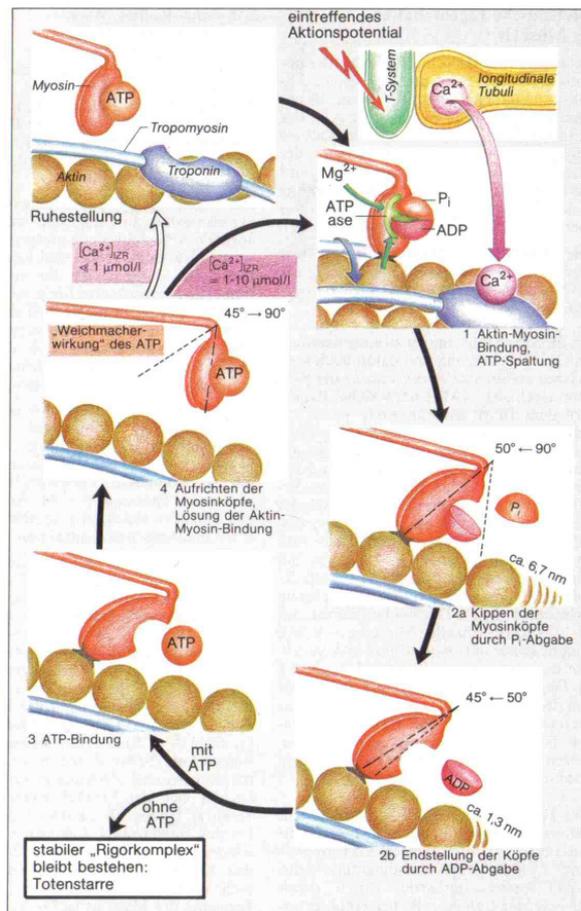


Abbildung 1.2: Mechanismus der Muskelkontraktion nach [79]

Anschließend werden die Ca^{2+} -Ionen wieder in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen bzw. in den Extrazellulärraum transportiert. Sinkt die Ca^{2+} -Ionenkonzentration unter 10^{-7}M dilatieren die Filamente vollständig, der Ausgangszustand ist wieder erreicht. [25]

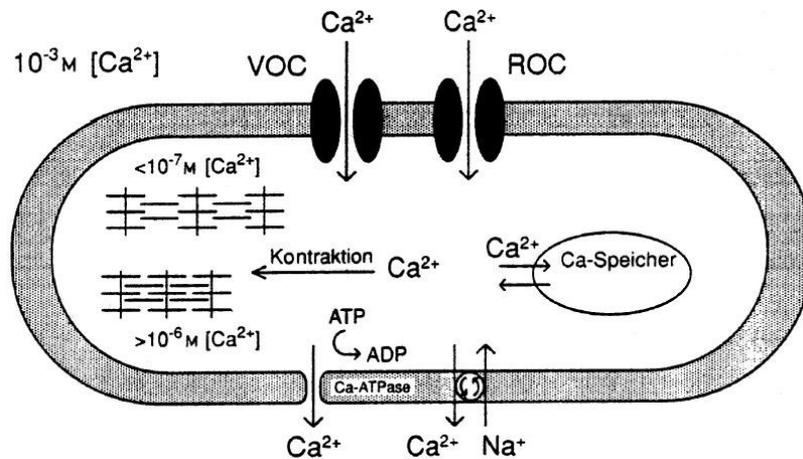


Abbildung 1.3: Beeinflussung der Muskelzelle durch Ca^{2+} nach Goldmann [25]; VOC: spannungsabhängiger Kanal; ROC: rezeptorabhängiger Kanal

1.3 Spannungsgesteuerte Ionenkanäle

In Zellen herrscht ein anderes Milieu als außerhalb. Um die Funktionsfähigkeit der Zelle und damit auch des Gewebes, zu dem sie gehört, aufrecht zu erhalten, muss diese Kompartimentierung erhalten bleiben. Dies geschieht durch Zellmembranen. Gleichzeitig muss die Zelle aber auch mit ihrer Umgebung interagieren können.

Die Zellmembran besteht aus einem Phospholipid-Bilayer und ist für Ionen und polare Stoffe undurchdringlich, da sich zwischen den nach außen zeigenden hydrophilen Schichten eine lipophile Schicht befindet. In der Natur ist dies nötig, um Unterschiede zwischen Intra- und Extrazellulärraum zu schaffen, welche für das Leben unabdingbar sind. So ist im Intrazellulärraum die Konzentration an K^{+} -Ionen sehr groß, im Extrazellulärraum sehr gering. Bei Na^{+} -Ionen dagegen ist die Konzentration im Extrazellulärraum sehr groß, der Ionengradient verläuft in die andere Richtung. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines Potentials an der Zellmembran. Um dieses Potential oder das Cytoplasma-Milieu zu beeinflussen, sind Transportmechanismen notwendig, z.B. Ionenkanäle. Dies sind porenformende Proteine, die spezifisch mono- oder divalente Ionen leiten können. Sie sind in der Lage, zwischen ein- und zweiwertigen Ionen, wie K^{+} und Ca^{2+} zu unterscheiden,

differenzieren aber auch unterschiedliche einwertige (Na^+ vs. K^+) und zweiwertige Ionen (Ca^{2+} vs. Mg^{2+}).

Es gibt Kanäle, die auf den pH-Wert oder die Konzentration bestimmter Ionen reagieren. Änderungen führen zu einer Aktivierung und Erhöhung der Permeabilität für spezifische Substanzen. Man bezeichnet dies als Öffnung. Die Durchlässigkeit der Membran wird also erhöht und die Ionen fließen dem Konzentrationsgradienten folgend in die Zelle oder den Extrazellulärraum. Daneben gibt es Kanäle, die auf die Änderung des Potentials einer Membran reagieren. Diese bezeichnet man als spannungsgesteuerte Ionenkanäle (engl: voltage-gated ion channel VGIC). Es gibt Ionenkanäle, die spezifisch Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} oder Cl^- -Ionen leiten.

1.3.1 Aufbau

1.3.1.1 Allgemeines

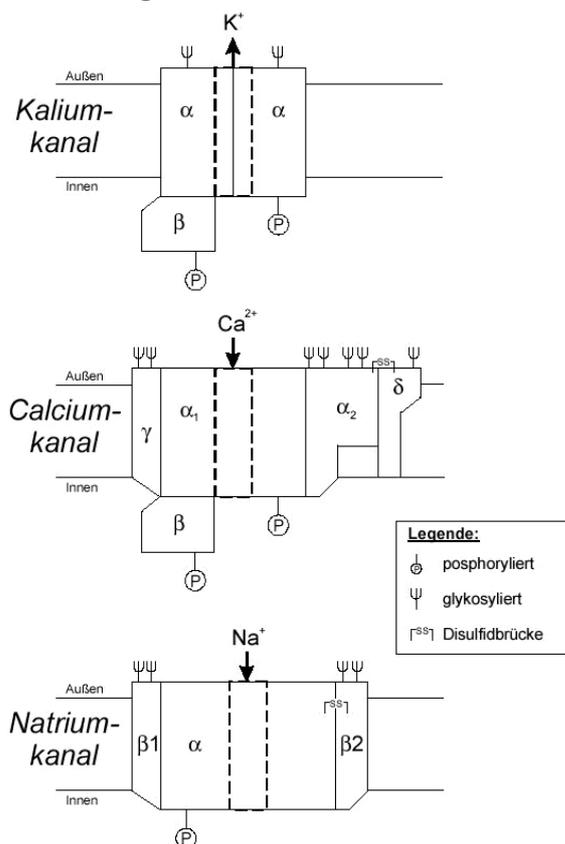


Abbildung 1.4: Aufbau der Kationenkanäle nach [13]

VGICs bestehen aus mehreren Untereinheiten, d.h. Proteinsträngen, für die jeweils eigene Gene codieren. Die α -Untereinheit formt den Porenbereich und das Selektivitätsfenster, bestimmt also die elementaren Eigenschaften des VGICs. Sie ist auch unabhängig von den anderen Protein-Untereinheiten funktionsfähig. Durch weitere Untereinheiten können die Eigenschaften der α -Untereinheit, wie Aktivierungs- und Inaktivierungsgeschwindigkeit, modifiziert werden. Sie sind häufig Gewebe- oder Spezies-spezifisch, ohne die α -Untereinheit jedoch nicht funktionsfähig. Abbildung 1.4 zeigt schematisch die Zusammenstellung der Untereinheiten der VGICs.

Die Kationen-Kanäle sind im Laufe der Evolution durch Genduplikation entstanden und zeigen daher viele Gemeinsamkeiten. Einfache K^+ -Kanäle bestehen aus zwei helikalen, transmembranären (TM) Bereichen, die durch eine kurze, porenformende Region, den P-Loop, miteinander verbunden sind. Vier dieser Domänen formen einen Kanal. Mehrfache Genduplikation der die TM-Bereiche codierenden Gene führte zur Bildung von Domänen mit sechs TM-Bereichen. Auch hier müssen sich vier Domänen zusammenfinden, um einen funktionsfähigen Ionenkanal zu bilden. Schließlich kam es auch zur Duplikation der gesamten Domäne. Dafür spricht, dass die Domänen I und III sowie II und IV zueinander größere Homologie besitzen als die vier Domänen untereinander. Die spannungsgesteuerten Kationen-Kanäle bestehen aus vier verbundenen Domänen mit je sechs TM-Bereichen und dem P-Loop. Die Domänen werden als Repeats bezeichnet, die TM-Bereiche als Segmente. Vom N-Terminus beginnend werden Repeats (I-IV) und Segmente (S1-S6) zur besseren Unterscheidung durchnummeriert. Die S4-Segmente enthalten positiv geladene Arginine und werden allgemein als Spannungsänderungen registrierende Bereiche angesehen. Die Pore wird durch die Segmente S5 und S6 aller vier Repeats gebildet, das Selektivitätsfenster ist in den P-Loops lokalisiert. Die K^+ -Kanäle sind die entwicklungsgeschichtlich ältesten Kanäle. Sie bestehen aus einer 6TM-Domäne, die sich viermal wiederholt. Aus ihnen entwickelten sich die Ca^{2+} -Kanäle, welche in einfachen Zellverbänden für die Reizweiterleitung zuständig sind. Erst mit der Entwicklung des Nervensystems in sehr großen Zellverbänden kam es zur Beteiligung der Na^+ -Ionen an der Signaltransduktion und zu Entwicklung der Na^+ -Kanäle [3].

Abbildung 1.5 zeigt den unterschiedlichen Aufbau verschiedener Ionenkanäle. Es gibt solche, in denen die Aminosäure-Sequenz relativ kurz ist, und die Domäne nur aus zwei Segmenten und dem P-Loop besteht. Hiervon müssen vier Domänen zusammen kommen, um die α -Untereinheit eines funktionsfähigen Kanals zu bilden. Die letzte Entwicklungsstufe stellen die spannungsgesteuerten Kanäle dar, die aus einer langen Aminosäure-Sequenz bestehen, die die vier benötigten Domänen enthält. Jede Domäne besteht aus sechs Segmenten und dem P-Loop, der sich immer zwischen den Segmenten S5 und S6 befindet.

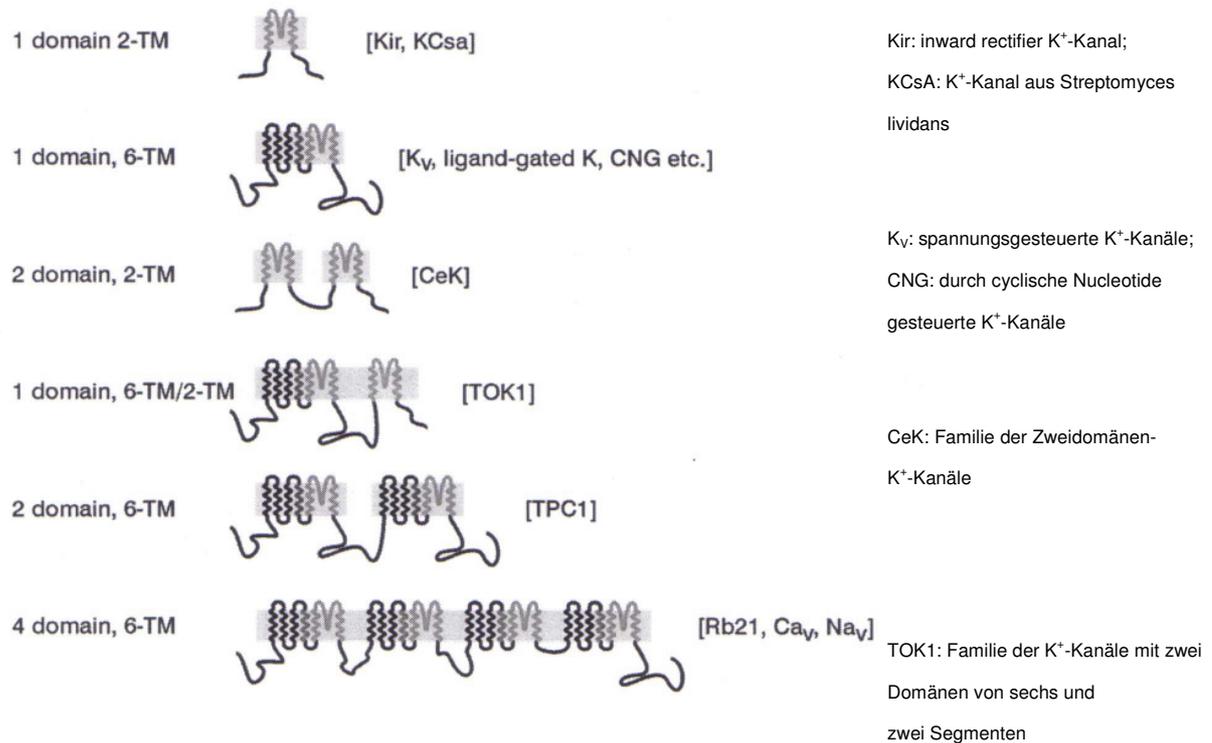


Abbildung 1.5: Aufbau von Ionenkanälen nach [3]; die hellgrauen Bereiche der Sequenz zeigen den Porenbereich.

Auch wenn der TM-Teil als ähnlich angenommen wird, so sieht man durch Untersuchungen der Sequenzen und ihrer Topologie, dass es Unterschiede zwischen den Kanälen gibt. Während der K⁺-Kanal ohne größere Loop-Bereiche in die nächste Helix übergeht, zeigen Ca²⁺- und Na⁺-Kanäle Loop-Sequenzen mit einer Länge von 20 bis 100 Aminosäuren zwischen den Segmenten. Der P-Loop zwischen Segment S5 und S6 ist einer dieser Loops. Er beinhaltet das Selektivitätsfenster. Wie Abbildung 1.5 zeigt, treffen sich die das Selektivitätsfenster bildenden Aminosäuren aller vier Repeats in der Pore während die übrigen Aminosäuren des P-Loops in den Extrazellulärraum ragen.

1.3.1.2 Spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle

Spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle (VGCC) gehören zu den Kanälen, die vier Domänen zu sechs Segmenten haben. Sie sind in jeder Species mit mehreren Subtypen vertreten, wobei die Diversität bei den Vertebraten (Wirbeltieren), wie dem Menschen, größer ist als bei den Invertebraten. Die Subtypen werden unterschieden nach ihrer Funktion, der Lokalisation im Gewebe und ihren Hemmstoffen. Hierbei wird unterteilt in die Gruppen der L-Typ- und der non-L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, welche sich

weiter in die Gruppen der N, P/Q- und B-Typen aufteilen. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Typen, ihre Charakteristika und Modulatoren.

Die α_1 -Untereinheit bestimmt die Eigenschaften des Kanals. Nur die Gruppe der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, mit der α_1 -Untereinheit $\text{Ca}_v1.X$ ist in der Lage, durch Inhibitoren vom Dihydropyridin-Typ beeinflusst zu werden.

Typ	L	N	P/Q	B	T
	(long lasting)	(neither L/T)	(Purkinje)	(brain)	(transient/ tiny)
α_1 -Untereinheit	$\text{Ca}_v1.X$	$\text{Ca}_v2.X$	$\text{Ca}_v2.X$	$\text{Ca}_v2.X$	$\text{Ca}_v3.X$
Vorkommen	Muskeln/ Neuronen	Neuronen	Purkinje-Zellen	Gehirn	Schrittmacher- zellen
Aktivierungs- potential	> -30mV	> -30mV	> -50mV	> -30mV	> -70mV
Inaktivierung	langsam	moderat	sehr langsam	moderat	schnell
Inhibitoren	DHP,PAA, BTZ, Cd^{2+}	ω -Conotoxin MVIIA + GVIA	ω -Conotoxin MVIIC, ω -Agatoxin IVa + TK	Ni^{2+} , Cd^{2+}	Flunizarin, Ni^{2+} , Octanol

Tabelle 1.1: Einteilung der Ca^{2+} -Kanäle der Säugetiere entsprechend ihrer Funktion nach [74], [20] und [45]

Bei allen Kanälen sind weitere Untereinheiten nötig, welche die Funktionalität modifizieren. Beim Ca^{2+} -Kanal sind dies die β -, γ -, δ - und die α_2 -Untereinheit.

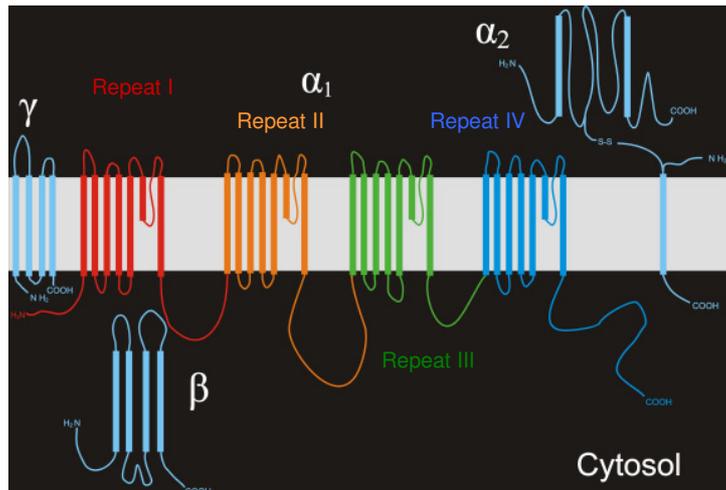


Abbildung 1.6: schematischer Aufbau der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle nach [74]

In Abbildung 1.6 ist schematisch der Aufbau der spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle dargestellt. Vier Domänen mit je sechs helikalen Segmenten durchdringen als α_1 -Untereinheit die Membran. Zwischen Segment 5 und 6 befindet sich der P-Loop mit dem Selektivitätsfenster. Weil es hier nach Sekundärstrukturvorhersagen zur Ausbildung von kurzen Helices kommen soll, wird dieser Bereich auch als „short segment“ (SS) bezeichnet. K^+ -Kanäle (VGPCs) zeigen nur eine Helix und ein β -Faltblatt. Es ist anzunehmen, dass VGCCs ähnlich aussehen, doch das kann nur durch Aufnahme einer Kristallstruktur geklärt werden.

1.3.2 Die Template: Kristallstrukturen von K^+ -Kanälen

Der strukturelle Aufbau von Ionenkanälen war lange unklar, erst in den letzten Jahren konnten Kristallstrukturen von K^+ -Kanälen durch Kristallstruktur-Analysen geklärt werden. Jeder K^+ -Kanal hat eine Kurzbezeichnung, die abgeleitet ist aus dem geleiteten Ion und dem Organismus, aus dem der Kanal isoliert wurde.

Die erste aufgeklärte Kristallstruktur eines K^+ -Kanals war die eines pH-abhängigen Kanals (KcsA) aus *Streptomyces lividans* (Abbildung 1.7). Sie wurde 1998 veröffentlicht. KcsA gehört zu den Kanälen mit einer, zwei TM-Bereiche und den P-Loop beinhaltenden Domäne. Je vier Domänen (sog. Repeats) liegen als Homotetramer vor und formen die Pore. Die vier Repeats formen ein invertiertes Tipi. Dadurch kommt es unterhalb der Pore zur Bildung einer wassergefüllten Kavität von 10 Å Durchmesser. Jeder P-Loop enthält eine Helix, deren C-Terminus zur Kavität zeigt. Helices weisen ein Dipolmoment auf, bei dem die negative Ladung zum C-

Terminus und die positive Ladung zu N-Terminus zeigt. In der Mitte des Membran-Bilayers herrscht die größte Lipophilie der Membran und somit liegt hier die stärkste von den Ionen zu überwindende energetische Barriere. Durch den Dipol und die Kavität wird in der Mitte der Membran eine hydrophile Umgebung geschaffen und dadurch die Diffusionsstrecke der Kationen von 34 Å (Membrandicke) auf 12 Å (Länge des Selektivitätsfensters) verkürzt [18]. Auch Anionen-Kanäle nutzen die Dipolarität von Helices. Da Anionen leichter die Membran durchdringen können, genügen bei Cl⁻-Ionen jedoch zwei Helices [19].

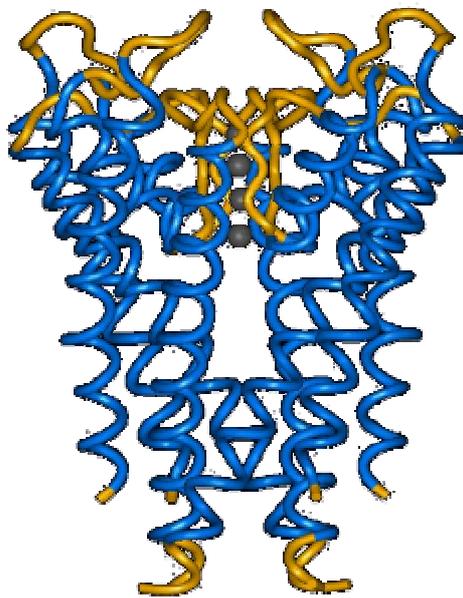


Abbildung 1.7: Struktur des K⁺-Kanals KcsA mit einer Auflösung von 2,8 Å; helikale Bereiche sind blau, Loops orange, K⁺-Ionen und Wassermoleküle im Selektivitätsfenster als graue CPK-Kugeln dargestellt; das Cytoplasma befindet sich unterhalb, der Extrazellulärraum oberhalb der Struktur.

Kationen-Kanäle können in verschiedenen Zuständen vorliegen. Im geschlossenen Ruhezustand leiten sie keine Ionen. Durch einen entsprechenden Reiz (Aktionspotential, Änderung des pH-Werts oder der Konzentration bestimmter Ionen) gehen sie in einen offenen, aktivierten Zustand über (vgl. Abschnitt 1.4.1). Von hier kommt es zur Inaktivierung und schließlich nehmen sie wieder den Ruhezustand ein. Diese Reihenfolge ist nicht obligat, sie wird jedoch meist eingehalten. Aus der KcsA-Struktur ist nicht ersichtlich, in welchem Zustand (offen, geschlossen, aktiviert, inaktiv) der Kanal vorliegt oder welche konformatorischen Änderungen mit der Aktivierung einhergehen [55]. Dass diese konformatorischen Änderungen während der Aktivierung recht beträchtlich sind, zeigten MacKinnon et al. [52] 2002 mit der

Veröffentlichung eines Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanals (MthK) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*, dessen Konformation dem offenen Zustand entspricht [47].

Wie Abbildung 1.8 zeigt, bleibt der Bereich des Selektivitätsfensters erhalten, die Helices schwingen nach außen und erweitern so die Kavität. Sie verbindet sich mit dem Cytoplasma. Abbildung 1.9 zeigt die Änderung des Verlaufs des elektrischen Potentials während der Öffnung.

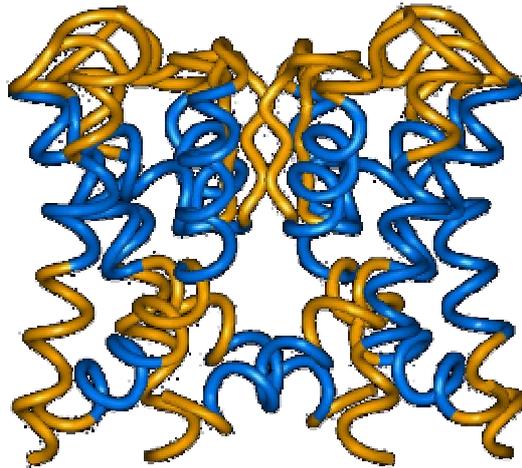


Abbildung 1.8: Struktur des Kanals MthK

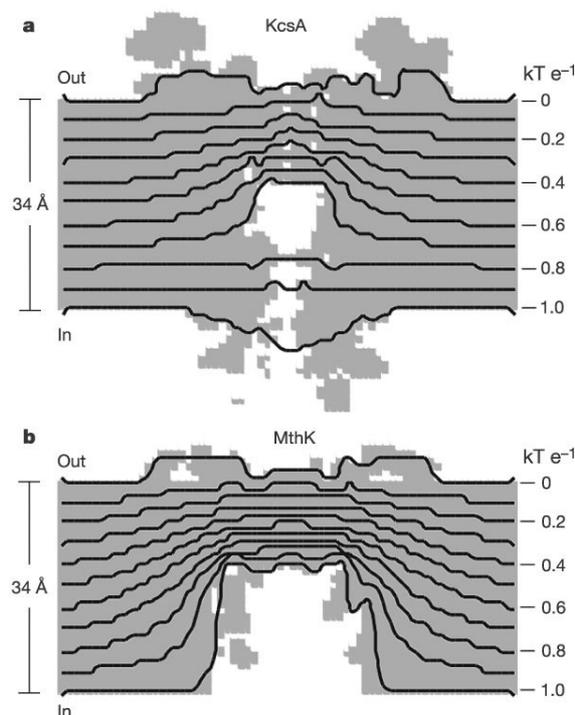


Abbildung 1.9: Elektrostatistische Konturen von KcsA (a) und MthK (b) in einer Membran nach [42]; die grauen Regionen entsprechen der Membran bzw. dem Protein (Dielektrizitätskonstante $\epsilon= 2$). Weiße Bereiche kennzeichnen das wässrige Medium ($\epsilon = 80$).

Durch die phylogenetische Verwandtschaft von K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen kann man davon ausgehen, dass auch die spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanäle in ihrem Porenbereich ähnlich aussehen. Die Präferenz der DHPs für die offene Konformation macht die MthK-Struktur zu einem erfolgversprechenderen Templat als die KcsA-Struktur.

Eine weitere Bestätigung für die Hypothese, dass alle spannungsgesteuerten Kanäle die gleiche Struktur im Porenbereich aufweisen, erfolgte im Jahr 2003 mit der Veröffentlichung einer Röntgenkristallstruktur eines spannungsgesteuerten K^+ -Kanals (KvAP) aus *Aeropyrum pernix* [43], dargestellt in Abbildung 1.10. Überlagerungen von KcsA mit MthK zeigen, dass dieser Kanal im Poren-Bereich eher MthK entspricht. Dies bestätigt die Annahme der strukturellen Ähnlichkeit von K^+ -Kanälen und zeigt außerdem, dass KvAP in der offenen Konformation kristallisiert wurde. Da aufgrund der phylogenetischen Entwicklung von der Ähnlichkeit aller Kationen-Kanäle ausgegangen werden kann [3] und DHPs bevorzugt an die offene Konformation binden [10] ist KvAP eine gute Vorlage für die Modellierung eines spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals vom L-Typ.

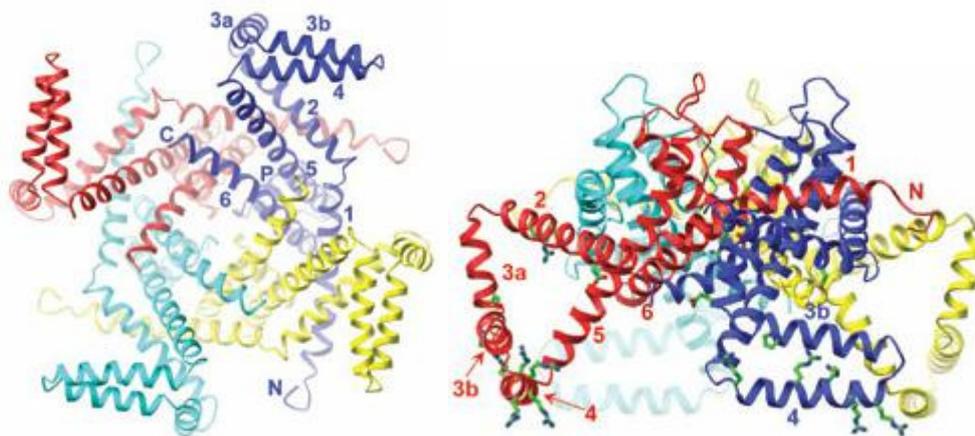


Abbildung 1.10: Struktur von KvAP; links: Blick vom Intrazellulärraum, rechts von der Seite, nach [52]; die Segmente sind nummeriert

Neu ist die Erkenntnis, dass die Helices einer Domäne kein paralleles Bündel darstellen, sondern die spannungsmessenden S4-Segmente sich wie die Flunken, d.h. wie die Greifarme eines Ankers, in die Membran erstrecken. Das Segment S3 ist keine durchgängige Helix, sondern teilt sich in die Segmente S3a und S3b auf. S3b liegt parallel zu S4. Es wird diskutiert, ob eine Bewegung von S3b und S4 hin zur Oberfläche der Membran zur Translokation der Segmente des Porenbereichs und

damit zur Öffnung des Kanals führt („Paddle“-Modell) oder ob eine Translokation von Ladungen den Aktivierungsmechanismus darstellt. Ausführlicher wird dieses Thema bei [52] und [84] diskutiert.

1.3.3 Selektivität

Kationen-Kanäle sind in der Lage, zwischen mono- und divalenten Ionen zu unterscheiden. So kann ein Ca^{2+} -Kanal auch Ba^{2+} -Ionen leiten (dies wird für experimentelle Untersuchungen genutzt), wird aber Na^+ -Ionen ignorieren. In den P-Loops der vier Repeats findet man vier hochkonservierte Glutamate (E), eines je Repeat, auch bezeichnet als EEEE-Motiv. Na^+ -Kanäle zeigen ein entsprechendes DEKA-Motiv, wobei das Lysin in Repeat III essentiell für die Selektivität von Na^+ über K^+ ist [21]. Mutationsstudien am humanen kardialen L-Typ Ca^{2+} -Kanal zeigen, dass die passende Mutation der Glutamate genügt, um aus einem Ca^{2+} - einen Na^+ -Kanal zu konstruieren [29]. Da das Vorhandensein vier negativer Ladungen für die Ca^{2+} -Selektivität essentiell ist, ging man bisher davon aus, dass die Stabilisierung des Liganden im Selektivitätsfenster über ionische Wechselwirkungen zwischen Anion und Kation stattfindet. Beim Na^+ -Kanal finden sich nur zwei geladene Aminosäurereste, K^+ -Kanäle dagegen kommen mit vier Glycinen, d.h. ganz ohne Ladungen aus. Somit kann in Frage gestellt werden, ob wirklich die Seitenketten mit dem Ion interagieren. Die KcsA-Struktur zeigt eine Stabilisierung der Ionen zwischen mehreren Ringen aus Carbonyl-Sauerstoffen des Proteinrückgrates, welche ein Dipolmoment induzieren. Hierbei halten sich im Selektivitätsfenster ständig zwei durch Dipolmomente in dehydratisierter Form stabilisierte K^+ -Ionen auf (Abbildung 1.7) [61]. Die Kristallstrukturen zeigen auch zwei Wassermoleküle im Selektivitätsfenster. Sie separieren die K^+ -Ionen, können aber keine Hydrathülle für die K^+ -Ionen ausbilden.

Da Repeat III eine Mutation des Glutamates, z.B. zum Aspartat oder Alanin [21], toleriert, wenn auch unter geringer Einbuße der Ca^{2+} -Ionen-Selektivität, wird eine asymmetrische Anordnung des Selektivitätsfensters diskutiert [16].

1.4 Molekulare Grundlagen der DHP-Bindungsstelle

1.4.1 Ca^{2+} -Kanal-Inaktivierung

Die Kinetik der Inaktivierung ist ein entscheidendes Charakteristikum der Ca^{2+} -Kanäle (s. 1.3.1.2). Sie wird hauptsächlich durch die α_1 -Untereinheit bestimmt, kann jedoch durch die β -, α_2/δ - und die γ -Untereinheit modifiziert werden. Diese Untereinheiten haben außerdem Einfluss auf die Aktivierung, die Spannungsabhängigkeit und auf pharmakologische Eigenschaften der α_1 -Untereinheit. Der molekulare Mechanismus der Ca^{2+} -Kanal-Inaktivierung wird nicht so gut verstanden wie der von Na^+ - oder K^+ -Kanälen. Die schnelle Inaktivierung der Na^+ -Kanäle erfolgt über einen „*hinge lid*“ (Deckel“-)Mechanismus. Dieser Deckel wird durch das im Loop zwischen Repeat III und IV vorkommende IFM-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin, gebildet. Diese Aminosäuren legen sich nach der Aktivierung in die geöffnete Pore und verschließen sie so mechanisch. Die K^+ -Kanäle dagegen besitzen an ihrem N-Terminus eine sog. „*Ball*“-Region, die an einer frei beweglichen Aminosäure-Kette anschließt und sich vergleichbar dem IFM-Motiv in die geöffnete Pore legt. Man nennt dies auch „*Ball and Chain*“-Mechanismus. Für Ca^{2+} -Kanäle ist ein vergleichbarer Mechanismus nicht bekannt.

Es existieren Krankheiten wie hemiplegische Migräne oder Ataxie, die durch eine Mutation verursacht werden, welche die Inaktivierung von Ca^{2+} -Kanälen beeinflusst. Vergleicht man die Sequenzen dieser mutierten, pathogenen Kanäle mit denen von „gesunden“ Sequenzen des Wildtyps, so fällt auf, dass die Mutationen zum Austausch von Aminosäuren in den S5- und S6-Segmenten und den P-Loops führen. Es ist daher anzunehmen, dass der Mechanismus der Inaktivierung mit diesen Segmenten verknüpft ist [31]. Wie in Abschnitt 1.4.2 gezeigt wird, befindet sich die DHP-Bindungsstelle den Mutationsstudien zufolge ebenfalls in diesem Bereich.

Spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle können in verschiedenen Zuständen vorliegen. Der Grundzustand ist der geschlossene/aktivierbare Zustand. Durch ein Aktionspotential gehen sie in den offenen, von hier in den Zustand der schnellen Inaktivierung, dann in den der langsamen Inaktivierung über. Schließlich wird nach einer Regenerationsphase wieder der geschlossen/aktivierbare Zustand eingenommen. Erst jetzt ist die Refraktärzeit zu Ende und der Kanal kann durch ein neues Aktionspotential aktiviert werden. Diese Reihenfolge ist nicht obligat. Der

Kanal kann im Zustand der schnellen Inaktivierung in den offenen Zustand zurückkehren. Der Kanal oszilliert zwischen diesen beiden Zuständen und die statistische Verteilung der Kanäle über die beiden Zustände bestimmt den Ca^{2+} -Einstrom. Auch kann der Kanal diesen Zustand überspringen und sofort in die langsame Inaktivierung übergehen. In dieser Phase müssen sich die intensivsten konformatorischen Änderungen vollziehen.

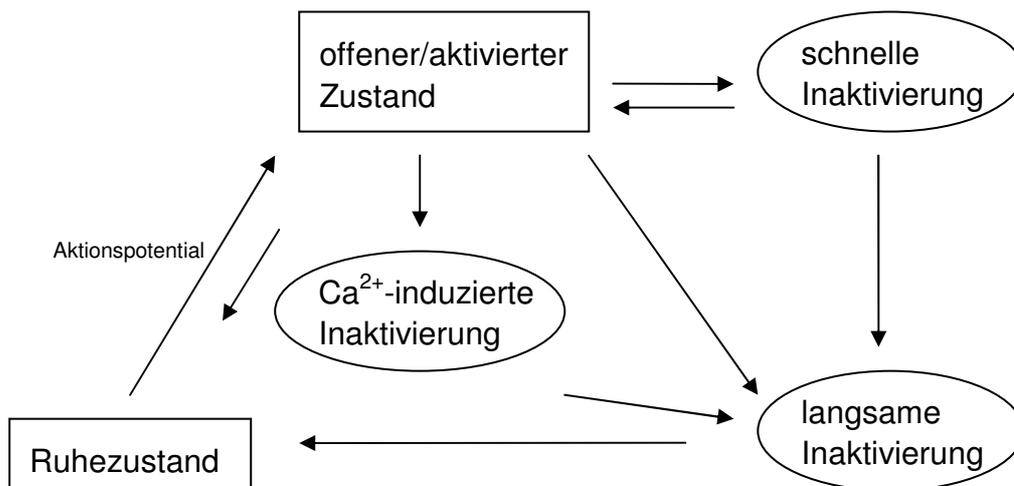


Abbildung 1.11: Zustandsübergänge in spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen

Außerdem kann die Inaktivierung diverse Beeinflussungen erfahren. Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, Phenylalkylamine (PAA, z.B. Verapamil), Benzothiazepine (BTZ, z.B. Diltiazem) und Dihydropyridin-Agonisten (DHPs) beschleunigen die Inaktivierung. PAAs, BTZs und DHPs binden im gleichen Bereich, jedoch nicht an der gleichen Stelle. Sie beeinflussen sich gegenseitig über einen allosterischen Mechanismus [85].

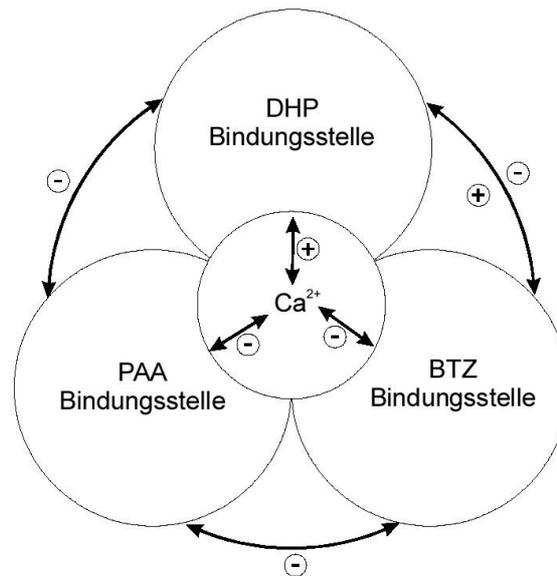


Abbildung 1.12: Gegenseitige Beeinflussung der Ca^{2+} -Antagonisten nach [25]

Nach der Hypothese des modulierten Rezeptors (*modulated receptor hypothesis*) ist die Wirkung eines Inhibitors davon abhängig, ob sich der Rezeptor im ruhenden, offenen oder inaktivierten Stadium befindet. Hering et al. [7] konnten im Experiment zeigen, dass die Inaktivierung beschleunigt ist, wenn DHPs an den Rezeptor gebunden werden und außerdem zwischen intrinsischer Inaktivierung und DHP-induzierter Inaktivierung eine gegenseitige Abhängigkeit besteht. Nun stellt sich die Frage, ob DHPs an die aktive Konformation binden und einen beschleunigten Übergang in die inaktive Phase bewirken oder an den bereits inaktiven Kanal binden und diesen Zustand stabilisieren, so dass der Übergang in den Ruhezustand hinausgezögert wird. Die experimentellen Daten zeigen, dass die schnelle Inaktivierung beschleunigt, die langsame jedoch nicht beeinflusst wird. Die Oszillation zwischen offenem/aktiven und schnellem inaktiven Zustand wird folglich dahingehend verschoben, dass mehr Kanäle des Gewebes im inaktiven Zustand vorliegen.

1.4.2 Experimentelle Bestimmung der DHP-sensitiven Aminosäuren

Mutationsstudien haben gezeigt, dass vierzehn Aminosäuren, die sich in den Segmenten IIS5, IIS6 und IVS6, sowie im P-Loop des Repeats III (SS-III) befinden, für die DHP-Wirkung verantwortlich zeichnen [85]. Es gibt zwei Möglichkeiten, um festzustellen, welche Aminosäuren für die DHP-Wirkung verantwortlich sind. Im destruktiven Ansatz wird ein Alanin-Scan durchgeführt, d.h. jede einzelne Aminosäure wird zu Alanin mutiert, der Kanal exprimiert und auf Funktionalität und

gewünschte Interaktion untersucht. Hierbei kann geprüft werden, welche Aminosäure welchen Anteil an der Interaktion hat [65]. Eine weitere destruktive Variante besteht darin, Teile der Sequenz eines non-L-Typ-Kanals in einen L-Typ-Kanal einzufügen [77]. Bei den Ca^{2+} -Kanal-Typen ist es auch möglich, im konstruktiven Ansatz einen Typen (z.B. einen non-L-Typ), der eine gewünschte Interaktion nicht zeigt, durch Einführen der Aminosäure zu einem anderen Typ (z.B. einem L-Typ) umzuwandeln. Hierbei hat sich gezeigt, dass neun Aminosäuren ausreichend sind, um DHP-Sensitivität in einen non-L-Typ-Kanal einzuführen [80]. Die weiteren fünf Aminosäuren, die im destruktiven Ansatz zusätzlich identifiziert wurden, sind innerhalb der Ca^{2+} -Kanäle konserviert. Als Besonderheit sind zwei Aminosäuren zu erwähnen: S1114 im P-Loop des Repeats III (III-SS) beeinflusst verstärkt die Agonisten und zeigt auf Antagonisten kaum eine Wirkung. T1056 wurde früher eine direkte Wirkung auf DHPs zugesprochen [60], da im konstruktiven Ansatz das Phenylalanin der P/Q-Typ-Kanäle mutiert werden muss, um eine Wirkung zu erzielen. Im Alanin-Scan zeigt es jedoch keine große Wirkung. Man geht davon aus, dass die Einführung großer, raumfüllender Substituenten den Liganden verdrängt, aber keine funktionelle Interaktion vorliegt [40].

Tabelle 1.2 zeigt die für die DHP-Wirkung verantwortlichen Aminosäuren der drei Repeats IIIS5, IIIS6, IVS6 und des P-Loops III-SS.

Segment	konstruktiv	destruktiv	Besonderheiten
IIIS5	Q1060		T1056
IIIS6	I1170, I1173, M1178	F1175, F1176, M1177	
IVS6	Y1508, M1509, I1515, I1516	N1517	
III-SS			S1114

Tabelle 1.2: Aminosäuren, die an der DHP-Bindung beteiligt sind, nummeriert nach Sequenz Q13936

Die in der Tabelle 1.2 genannten Segmente sind in den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen konserviert. Die Sequenzen unterscheiden sich jedoch in ihrer Länge und in anderen Segmenten auch in ihrer Zusammensetzung. Es muss also eine Sequenz ausgesucht werden, mit der repräsentativ das Modell erstellt wird. Die SwissProt-

Datenbank des ExPasy Molecular Biology Servers [39] findet 125 Einträge mit Sequenzen der α_1 -Untereinheit der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle. Von diesen wurde für diese Arbeit die Sequenz mit der Erkennungsnummer Q13936 gewählt, da es sich um einen humanen L-Typ Ca^{2+} -Kanal handelt, dem therapeutischen Ziel der DHPs.

1.5 Dihydropyridine – Wirkung und Pharmakophor

Die Dihydropyridine (DHPs) gehören zur Gruppe der sog. Ca^{2+} -Antagonisten, zu der auch Phenalkylamine (PAA) wie Verapamil (Cordichin[®] Falicard[®]) und Benzothiazepine (BTZ) wie Diltiazem (Diltiac[®]) gehören. Diese Bezeichnung entstand zur Zeit ihrer Entdeckung und bezieht sich auf die beobachtete Wirkung. Die in Abschnitt 1.2 beschriebene Muskel-Kontraktion bleibt aus, da das Ca^{2+} nicht wirken kann. Man vermutete einen antagonistischen Wirkmechanismus, in dem der Wirkstoff die Ca^{2+} -Bindungsstelle besetzt. Inzwischen weiß man, dass der Wirkmechanismus ein anderer ist. Daher ist die Bezeichnung „ Ca^{2+} -Antagonist“ irreführend. Substanzen dieser Gruppe greifen nicht in einem antagonistischen Mechanismus an der gleichen Bindungsstelle wie Ca^{2+} -Ionen an. Sie verringern vielmehr den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle durch die Verkürzung der leitenden Phase der VGCCs. Da sich dieser Begriff jedoch eingebürgert hat und IUPAC-anerkannt ist, soll er auch im Weiteren benutzt werden.

1.5.1 Erkundung des Dihydropyridin-Pharmakophors

Die DHPs sind ein Beispiel für Arzneistoffe, deren Effekt zwar bekannt ist, ihr molekularer Wirkmechanismus jedoch nicht, da Daten über den Aufbau ihres Wirkortes, also der Bindungsstelle am Zielprotein fehlen. Die antihypertensive Wirkung wurde bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts ausführlich untersucht [56], ihr Wirkort an den L-Typ Ca^{2+} -Kanälen konnte allerdings bis jetzt nicht mittels einer Kristallstruktur identifiziert und charakterisiert werden. In einem solchen Fall muss man die Eigenschaften der Liganden nutzen, um Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Bindungsstelle zu ziehen. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip verhält sich der Ligand wie ein dreidimensionaler Schlüssel zum dreidimensionalen Schloss der Bindungsstelle. Mit einem Pharmakophor werden die gemeinsamen dreidimensionalen Eigenschaften einer Gruppe von Liganden beschrieben. Ein Pharmakophor erlaubt Rückschlüsse darauf, welcher Art die

Interaktionspartner des Rezeptors in diesem Bereich sein müssen. DHPs sind synthetisch leicht über die Hantzsch'sche Pyridin-Synthese zugänglich, daher existieren wegen der großen Anzahl untersuchter DHPs genaue Vorstellungen über den Pharmakophor.

Der Dihydropyridinring liegt laut Kristallstrukturen in einer flachen Bootkonformation vor (Abbildung 1.13). An Position 1 befindet sich der Stickstoff, welcher unsubstituiert vorliegen muss. In Position 4 bewirkt ein Aryl-Ring die höchste antihypertensive Wirkung. In Position 2 und 6 finden sich Alkyl-Substituenten, in Position 3 und 5 Esterfunktionen.

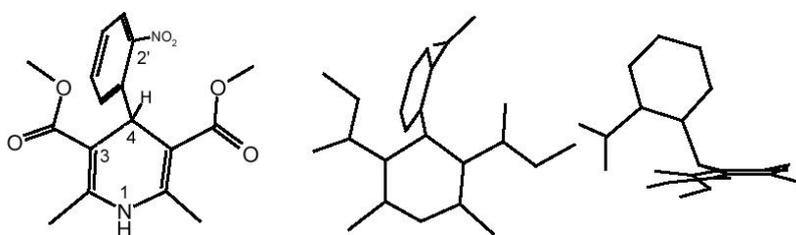


Abbildung 1.13: Strukturformel (links) und Kristallstruktur (CSD-Code BICCI2) von Nifedipin, von oben (Mitte) und von Backbord (rechts) nach [72]

Auf Grund der flachen Bootkonformation hat es sich eingebürgert, Dihydropyridinringe mit nautischen Termen zu beschreiben. So definiert man den Stickstoff als Heck und den Arylsubstituenten als Bug. Die linke Molekülhälfte wird als Backbord, die rechte als Steuerbord bezeichnet. Sind Backbord und Steuerbord symmetrisch substituiert ist das DHP achiral wie im Fall des Nifedipins, asymmetrische Substitution führt zu einem Chiralitätszentrum am Bug, dem C4-Atom [71].

Nun müssen auch die konformatorischen Aspekte betrachtet werden. Das Molekülgerüst ist flexibel und erlaubt Rotationen des Aryl-Ringes, der Ester und konformative Änderungen des Dihydropyridinrings. Durch Untersuchungen an konformativ starren DHPs gibt es Hinweise auf die aktive Konformation der DHPs, die durch theoretische Berechnungen und Kristallstrukturen gestützt werden. Während in Position 4 unsubstituierte DHPs lt. kristallographischen Aufnahmen planar vorliegen, bevorzugen Aryl-substituierte die flache Bootkonformation. Hieraus ergibt sich, dass der Aromat axial bzw. äquatorial vorliegen kann (Abbildung 1.14). Durch Methylierung des Dihydropyridinrings in Position vier wird der Aryl-Rest in äquatorialer Stellung fixiert. Dieses DHP ist pharmakologisch inaktiv.

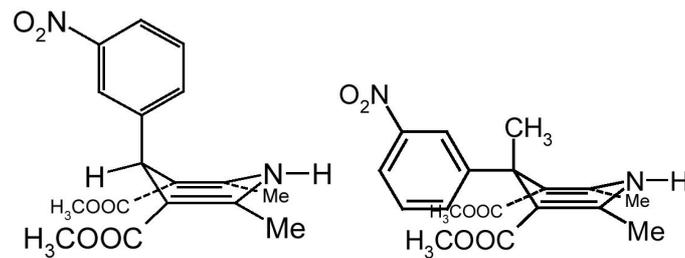


Abbildung 1.14: Stellung des Arylrings in axialer (links) und äquatorialer Stellung (rechts), die durch Umklappen des DHP-Rings eingenommen wird

Rigidisiert man ein DHP-Molekül durch eine Verbrückung des Alkylsubstituenten an C-2 oder C-6 mit dem Aromaten, vergleichbar dem DHP in Abbildung 1.15, zeigt sich ebenfalls, dass die axiale Anordnung der beiden Ringe essentiell ist. Dieses DHP ist im Gegensatz zu dem in Abbildung 1.14 rechts dargestellten pharmakologisch aktiv .

Substitution am Aromaten in ortho-Stellung erhöht durch die Einschränkung der freien Drehbarkeit des Aromaten die pharmakologische Wirkung. Dieser Substituent kann synperiplanar (sp) auf der Seite des C4-Wasserstoffs stehen oder antiperiplanar (ap) über den Dihydropyridinring. Im Kristall tritt bevorzugt die sp-Stellung auf, auch NMR-spektroskopische Messungen zeigen eine Prävalenz der sp-Konformation in Lösung. Die Energieunterschiede zwischen beiden Formen sind jedoch so gering, dass nicht vorhergesagt werden kann, welche am Wirkort bevorzugt wird. Durch den Mechanismus des „induced fit“ kann der Rezeptor den Liganden in eine der beiden Stellungen „zwingen“. Auch hier helfen rigidisierte Verbindungen weiter. Durch eine Schwefelbrücke zwischen Aryl-Rest und Dihydropyridinring kann eine stabile sp- oder ap-Stellung ohne Möglichkeit zur Rotation geschaffen werden (Abbildung 1.15).

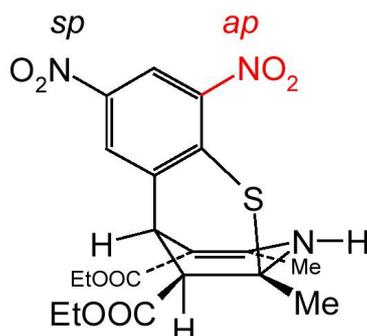


Abbildung 1.15: Schwefel-verbrücktes DHP-Analogon; die *sp*-Stellung des Aryl-Restes ist in schwarz, die *ap*-Stellung in rot dargestellt [49].

Das Konformer mit der erzwungenen *sp*-Stellung ist zwei Zehnerpotenzen wirksamer als dasjenige mit *ap*-Stellung. Dieses Ergebnis macht die *sp*-Form als bioaktive Konformation am Wirkort wahrscheinlich.

Abbildung 1.16 zeigt, dass der Aromat durch Einführung eines 5-gliedrigen Lactons in eine Konformation gezwungen wird, die eine orthogonale Stellung der beiden Ringe zueinander nicht zulässt. Dieses Derivat ist pharmakologisch inaktiv. Erst nach Aufweitung des Ringes zum Zwölfring, was eine orthogonale Konformation erlaubt, erhält man eine antihypertensiv wirksame Verbindung [25].

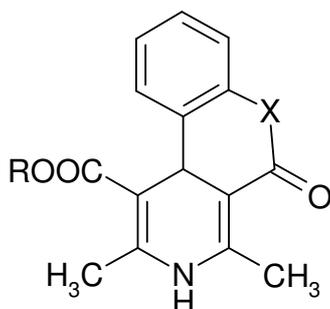


Abbildung 1.16: rigidisiertes DHP, für $X=O$ ist die Verbindung pharmakologisch inaktiv, bei Aufweitung des Lactonringes mit $X=-O-(CH_2)_5-O-$ erhält man die pharmakologisch günstige orthogonale Stellung der beiden Ringe.

Auch die Stellung der Ester muss betrachtet werden. Setzt man eine günstige coplanare Anordnung der Estercarbonylfunktionen mit den DHP-Doppelbindungen voraus, können drei Rotationsisomere vorliegen: *trans/trans*, *cis/trans* und *cis/cis*. Hierbei bedeutet „*cis*“, dass Carbonyl-Doppelbindung und Dihydropyridinring-Doppelbindungen parallel liegen, dies wird auch als „*sp*“-Stellung bezeichnet.

Entsprechend ist „trans“ die „ap“-Stellung, in der beide Doppelbindungen zu verschiedenen Seiten zeigen (s. Tabelle 1.3). Die Analyse von Kristallstrukturen hat gezeigt, dass eine trans/trans-Anordnung nicht beobachtet werden kann, während die Bevorzugung von cis/trans oder cis/cis vom Arylsubstituenten abhängig ist. Für die Backbordestergruppe scheint die cis-Stellung essentiell zu sein, der Steuerbordester ist variabler, bevorzugt aber in Anwesenheit eines o-Aryl-Substituenten die cis-Stellung.

	trans/trans (ap/ap)	cis/trans (sp/ap)	cis/cis (sp/sp)	
		trans/trans	cis/trans	cis/cis
mit o-Aryl-Substituent	0	3 von 10	7 von 10	
ohne o-Aryl-Substituent	0	14 von 16	2 von 16	

Tabelle 1.3: Bevorzugte Konformationen der Estergruppen in DHPs; es besteht eine Abhängigkeit der Konformation von der Substitution des Aryl-Restes. Die cis-Stellung an der Backbordseite wird in jedem Fall bevorzugt.

Die pharmakologische Wirkung geht jedoch nicht notwendigerweise auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum Rezeptor zurück wie sich an dem Thiophen-Derivat in Abbildung 1.17 erkennen lässt.

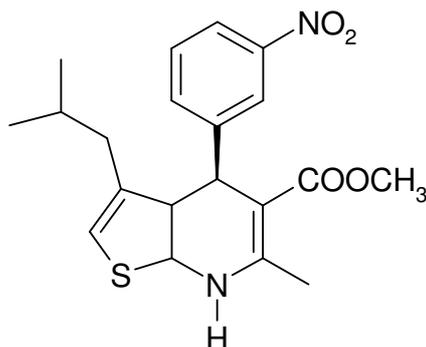


Abbildung 1.17: Pharmakologisch aktives S-Thiophen-Derivat, dessen Backbordseite einer rigidisierten Form des Backbordesters in cis-Stellung entspricht

Dieses S-Thiophen-Derivat ist 50mal aktiver, d.h. es verdrängt [^3H]-S-Nitrendipin 50mal stärker, und, wie man an der Hemmung der K^+ -induzierten Kontraktion der Kaninchenaorta gemessen hat, 20mal Ca^{2+} -antagonistischer als das entsprechende R-Derivat, welches den Thiophen-Ring an der Steuerbordseite hat. Dieser Unterschied zeigt, wie wichtig die cis-Konformation (sp) an der Backbordseite ist. Sie bewirkt, dass die lipophile raumfüllende Alkylkette parallel zum Arylrest liegt. Erzwingt man eine der trans-Form entsprechende Lage wie in Abbildung 1.18, ist das resultierende DHP nahezu wirkungslos.

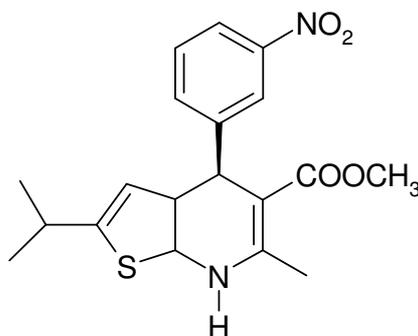


Abbildung 1.18: Der Backbord-Isopropylrest dieses S-Thiophen-Derivats kann keine Stellung parallel zum Arylrest einnehmen, dies entspricht einer rigidisierten Form des Backbordesters in trans-Stellung

Chirale DHP-Derivate, wie S-Nitrendipin, S-Isradipin etc., zeigen größere Wirksamkeit als nichtchirale wie Nifedipin, wobei sich eine Vergrößerung des Backbordesters als Aktivitäts-steigernd darstellt. Ersetzt man im Nifedipin den Methylrest des Backbordesters durch einen Isopropylrest, so zeigt das resultierende Derivat eine 15fache Steigerung der Wirkung. Auch die Methylreste an C-2 und C-4 können durch größere Substituenten ohne Wirkverlust ersetzt werden, dies hat jedoch keine Steigerung der Wirksamkeit zur Folge. Ein Beispiel für ein solches DHP ist das S-Amlodipin (Abbildung 1.19).

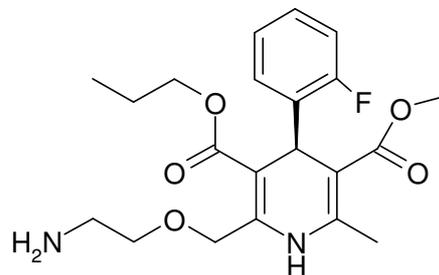


Abbildung 1.19: S-Amlodipin

Die antagonistische Wirkung lässt sich einfach in eine agonistische umwandeln [25]. Dazu wird nur statt des Backbordesters eine Nitrogruppe, ein Fünf-Ring-Lacton oder ein H-Atom eingeführt. DHP-Derivate mit Nitro-Funktion zeigen die stärkste Ca^{2+} -agonistische Wirkung. Nur die Substitution des Backbordesters bewirkt eine Umkehr der Wirkung, Ersatz des Steuerbordesters führt zu einem schwachen Ca^{2+} -Antagonisten (s. Abbildung 1.20) [92].

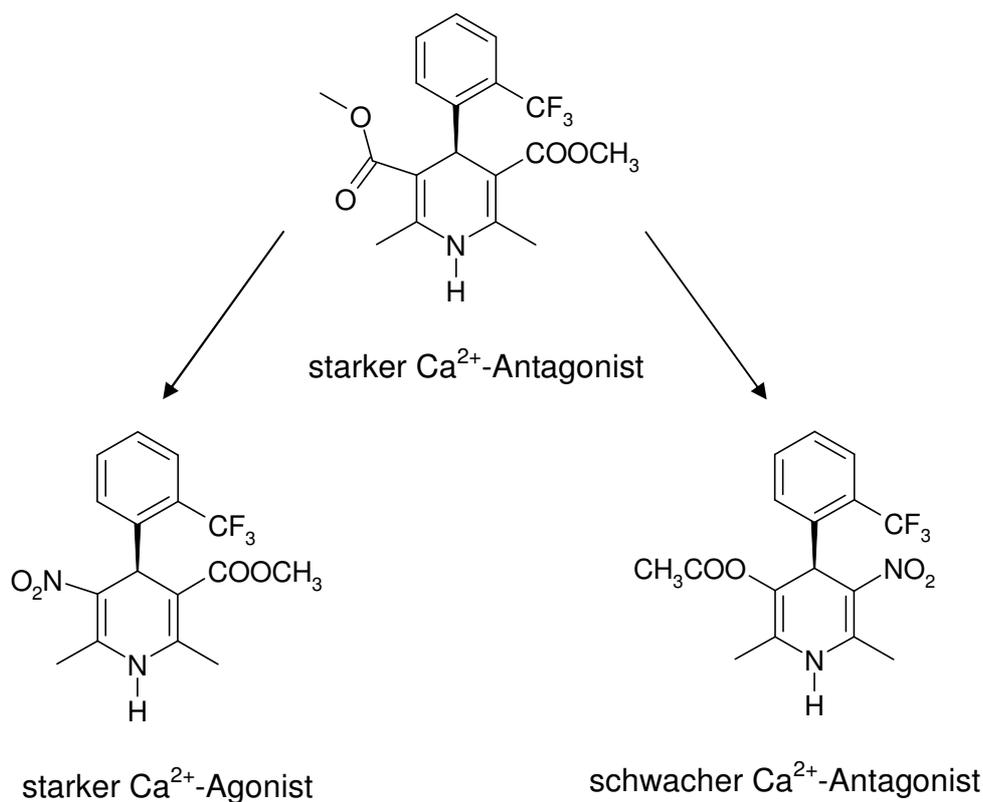


Abbildung 1.20: Umwandlung eines Antagonisten in einen Agonisten durch Einführen einer Nitro-Gruppe

Marrer et al. untersuchten das molekulare elektrostatische Potential (MEP) der DHP-Agonisten und Antagonisten. In der bereits diskutierten Konformation erhöhen Antagonisten das MEP des Rezeptors durch ihr positives Potential an der Backbordseite, während Agonisten das MEP des Rezeptors erniedrigen, da das negative Potential des Aryl-Restes nicht durch den Alkyl-Rest abgeschirmt, sondern durch das negative Potential einer Nitro-Gruppe sogar verstärkt wird [34].

Schleifer untersuchte die Konformationen der Ester und des Aryl-Substituenten von Nifedipin im Vergleich zu einem rigidisierten Dihydropyrimidin mit quantenmechanischen Methoden. Diese Untersuchungen zeigen für die $sp/sp/sp$ -Konformation der Atome C3/C4/C5 die niedrigste potentielle Energie (vgl. Abbildung 1.15 und Tabelle 1.3). D.h. der Aromat ist so gedreht, dass sein Substituent zur gleichen Seite zeigt wie der Wasserstoff am Bug des Dihydropyridinrings und die Doppelbindungen des Dihydropyridinrings und der Ester-Carbonyle an Back- und Steuerbord parallel, also in *cis*-Stellung vorliegen. Außerdem bestätigen diese

Untersuchungen die Notwendigkeit eines positiven Potentials an der Backbordseite [72].

Nifedipin-Analoga mit elektronenziehenden Substituenten wie Halogenen oder Nitrogruppen haben eine höhere Bindungsaffinität als solche mit Methyl- oder Methoxy-Gruppen [15]. Elektronenziehende Substituenten fördern die Ausbildung eines energetisch günstigen LUMOs (lowest unoccupied molecular orbital). DHPs haben bevorzugt ein HOMO (highest occupied molecular orbital) auf dem Dihydropyridinring, durch die Substituenten-induzierte Elektronenverarmung kommt es zu einem LUMO auf dem Aryl-Ring. Dieses kann mit einem HOMO des Rezeptors in eine Elektronen-Donator-Akzeptor-Wechselwirkung eingehen, dies bezeichnet man auch als Charge-Transfer-Effekt (CT) [76]. Eine Charge-Transfer-Interaktion kann zwischen elektronenreichen und elektronenarmen π -Systemen ausgebildet werden. Es entsteht ein Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplex (EDA-Komplex), in dem der Elektronen-Donator reversibel Elektronen auf den Akzeptor überträgt.

Die Arbeiten von Schleifer [75] haben gezeigt, dass die Wirkung der DHPs unter anderem auf der Ausbildung eines Charge-Transfer-Komplexes zwischen dem aromatischen Substituenten und einer Seitenkette des Proteins beruhen könnte. Es kommt zu einem Elektronenübergang zwischen einem LUMO auf dem DHP-Aromaten als Akzeptor und einem HOMO des Proteins als Donator. Diese können von Threonin- oder Methionin-Seitenketten zur Verfügung gestellt werden.

Die Eigenschaften des Pharmakophors werden von Schleifer (Abbildung 1.21) in einem Pseudorezeptor zusammen gefasst. In Pseudorezeptoren wird eine mögliche Liganden-Bindungsstelle aufgebaut, in die Informationen der Liganden und des Rezeptors eingehen [75].

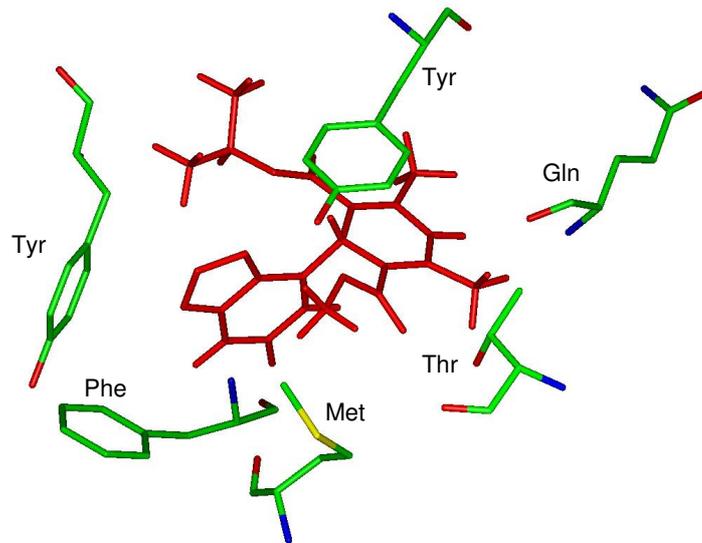


Abbildung 1.21: Pseudorezeptor nach [75]

In dem in Abbildung 1.21 dargestellten Pseudorezeptor sind die Aminosäuren Glycin, Methionin, Threonin, Phenylalanin und Tyrosin benutzt worden, um mögliche Interaktionspartner für die Eigenschaften des Liganden, z.B. Wasserstoffbrücken, CT- oder π/π -Wechselwirkungen, zu finden. Diese Aminosäuren wurden in Mutationsstudien als an der Ligandenbindung beteiligt identifiziert (s. Abschnitt 1.4.2).

1.5.2 Zusammenfassung des Pharmakophors

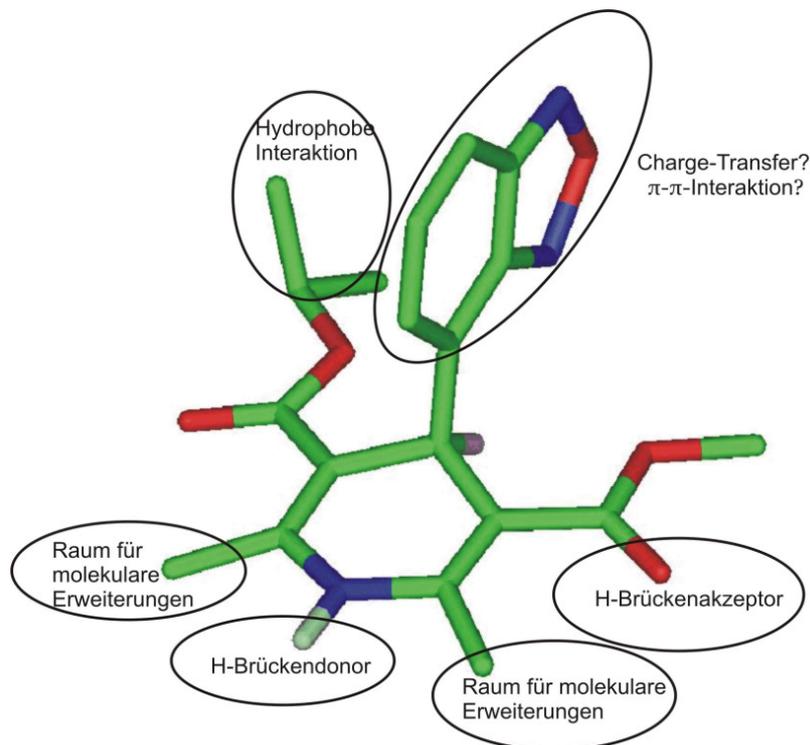


Abbildung 1.22: Zusammenfassung des Pharmakophors am Beispiel des S-Isradipins nach [49]

- Wasserstoffbrückendonator am N1
- Wasserstoffbrückenakzeptor-Möglichkeit auf der sp-orientierten Steuerbord-Seite
- Lipophile Wechselwirkungsmöglichkeit bzw. Abschirmung der negativen Ladung der Backbordseite notwendig für antagonistische Wirkung
- Carbonyl-Gruppe des Backbordester mit sp-Konformation
- orthogonaler, pseudoaxialer Aryl-Ring mit Substituenten in sp-Konformation, der CT oder π - π -Wechselwirkungen eingehen kann.
- Größere Reste an C2 und C6 werden toleriert, soweit der N1-Wasserstoffbrücken-Donor nicht behindert wird.
- Vergrößerung der Ester, führt auf der Backbordseite zur Änderung der Affinität, wobei der Isopropyl-Rest bevorzugt wird, auf der Steuerbordseite ist eine Vergrößerung möglich, jedoch nicht aktivitätssteigernd.

2 Problemstellung und Zielsetzung

2 Problemstellung und Zielsetzung

DHPs sind ein fester Bestandteil des Arzneimittelschatzes, ihr Wirkmechanismus ist jedoch ungeklärt. Da keine experimentellen Daten über die dreidimensionale Struktur der DHP-Bindungsstelle vorliegen, muss hier auf Modelle zurückgegriffen werden.

Das Aufgabengebiet der Protein-Modellierung umfasst das Erstellen eines Modells von Proteinen unbekannter Struktur unter Zuhilfenahme von Proteinkoordinaten verwandter Proteine mit hinreichender Sequenz-Homologie, deren dreidimensionaler Aufbau durch NMR, Elektronen-Mikroskopie oder Kristallstrukturanalyse geklärt wurde.

Das Ziel dieser Arbeit ist die dreidimensionale Darstellung der Bindungsstelle der Dihydropyridine am spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanal vom L-Typ. Problematisch ist hierbei, dass im Fall des Ca^{2+} -Kanals keine Kristallstrukturen verwandter Kanäle vorliegen, deren Sequenzen eine hinreichend hohe Homologie aufweisen. Die aufgeklärten K^{+} -Kanäle zeigen maximal eine Sequenz-Homologie von 20% in den transmembranären Bereichen. Es gilt also, konservierte bzw. homologe Aminosäuren aufzuspüren, die als Anhaltspunkte für Strukturmodelle dienen können. Allein auf der Grundlage der vorhandenen Kristallstrukturen ein zuverlässiges Modell zu erstellen, ist daher nicht möglich. Diese Kristallstrukturen sind jedoch die einzige verfügbare strukturelle Grundlage. Ein ähnliches Problem zeigen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins zeigt zu vielen GPCRs ebenfalls eine Homologie von ca. 20%, es gibt jedoch so genannte „*pinpoints*“, d.h. Aminosäuren, die in der gesamten Gruppe konserviert sind. Diese Hilfe haben die Kationen-Kanäle nicht. Dafür kann auf die Information aus dem Pharmakophor zurückgegriffen werden.

Es gilt, möglichst viele der experimentell ermittelten Daten im Modell zusammen zu fassen. So ist bekannt, welche Aminosäuren an der Bindung bzw. Inaktivierung beteiligt sind. Man weiß, dass sie sich in den transmembranären Regionen befinden und dass diese helikal vorliegen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Topologie der Ca^{2+} -Kanal-Sequenz Q13936 untersucht und transmembranäre, helikale Bereiche identifiziert. In einem multiplen Sequenz-Alignment werden die Sequenzen der jeweiligen transmembranären

Bereiche diverser K^+ -Kanäle und Ca^{2+} -Kanäle bzgl. ihrer Homologie verglichen. So soll eine Brücke zwischen den Sequenzen der Kristallstruktur und Q13936 geschlagen werden. Auf dieser Grundlage wird im zweiten Schritt ein Struktur-Alignment durchgeführt bei dem die Koordinaten der Kristallstruktur auf Q13936 übertragen werden.

Das so erzeugte Modell wird im zweiten Abschnitt dieser Arbeit auf seine Fähigkeit mit den DHP-Liganden interagieren zu können geprüft. Mit Docking-Methoden werden die Liganden in die Bindungsstelle eingebracht und die möglichen Interaktionen betrachtet. Zur Verbesserung des Modells kann dann das Sequenz-Alignment geändert werden, bis günstige Kontakte gefunden werden.

Da ein Docking in flexible Proteine (noch) nicht möglich ist, sollen im letzten Teil durch Moleküldynamik-Simulationen (MDS) die Interaktionen zwischen Ligand und beweglichem Protein betrachtet werden. Auch dies kann Hinweise zur Verbesserung des Modells geben. Besondere Beachtung verdient hierbei der Unterschied zwischen DHP-Agonisten und -Antagonisten. Sie unterscheiden sich ausschließlich in dem Ersatz des Backbordesters durch eine Nitro-Gruppe, die mit S1114 zu interagieren scheint.

3 Methoden

3 Methoden

3.1 Homologie Modelling

Für den pharmazeutischen Chemiker ist eine genaue Kenntnis des Targets eines Arzneistoffes wichtig, um auf chemischem Wege die Wirksamkeit zu verbessern. Gibt es keine Kristallstruktur eines Target-Proteins, so fehlen Informationen über den dreidimensionalen Aufbau der Bindungsstellen. Die Aminosäuresequenz bestimmt die physikochemischen Eigenschaften und damit Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins. Da man davon ausgehen kann, dass Proteine ähnlicher Funktion einen analogen dreidimensionalen Aufbau ihres aktiven Zentrums haben, können Proteinkoordinaten homologer Sequenzen auf Proteine nicht geklärter Struktur übertragen werden. Hierzu muss untersucht werden, welche Bereiche eine hohe Sequenzidentität bzw. -ähnlichkeit aufweisen. Diese wird als Homologie bezeichnet. Homologe Abschnitte weisen in den meisten Fällen die gleiche oder zumindest ähnliche Sekundärstruktur auf. Bei membranständigen Proteinen ist auch die Fähigkeit eines Sequenzabschnitts, eine membranäre oder zytoplasmatische Position einnehmen zu können, wichtig.

3.1.1 Sekundärstrukturvorhersagen

Die physikochemischen Eigenschaften einer Aminosäuresequenz bestimmen die Sekundärstruktur und die Fähigkeit eine transmembranäre Lage einzunehmen. Zur Untersuchung dieser Eigenschaften stehen verschiedene rechnerische Methoden zur Verfügung. Der Metaserver PredictProtein [35] bietet die Möglichkeit eine gegebene Sequenz an verschiedene Server zu schicken.

3.1.1.1 PHD

Das Programm PHD macht eine Vorhersage von Sekundärstrukturen transmembranärer Helices. Die eingegebene Sequenz wird einem in der Datenbank HSSP [33] enthaltenen Alignment zugeordnet. Dieses Alignment dient als Input für ein neuronales Netzwerk [70]. Für jede Aminosäure kennt das Netz die Wahrscheinlichkeit, dass sie Teil einer transmembranären Helix ist. Mit einer Fenstergröße von 16 Aminosäuren wird nach Sequenzabschnitten gesucht, die die höchste Wahrscheinlichkeit haben, Teil einer transmembranären Helix zu sein. In

einem anschließenden Schritt wird nach dem Modell gesucht, dass für Helixlängen zwischen 18 und 25 Aminosäuren den besten Kompromiss aller möglichen Modelle bzgl. der Wahrscheinlichkeit, Teil einer transmembranären Helix zu sein, darstellt.

3.1.1.2 Dense Alignment Surface (DAS)

Die DAS-Methode wurde entwickelt, um transmembranäre Bereiche von Sequenzen, für die es keine homologen Proteine geklärter Struktur gibt, vorhersagen zu können. Zuerst wird eine DAS-Oberfläche für die zu untersuchende Sequenz erstellt. Dabei wird die Sequenz in Gruppen von zehn Aminosäuren jeweils paarweise mit den Sequenzen eines Datensatzes auf Grundlage der jeweiligen Hydrophobizität verglichen. Wird ein Cutoff-Wert überschritten, wird dieser Stelle ein Punkt zugeordnet. Die Summe dieser Punkte ergibt die DAS-Oberfläche. Die Eigenschaften dieser Oberfläche werden mittels einer Matrix mit der Oberfläche nicht homologer Proteinen, zu deren Topologie es experimentelle Daten gibt, verglichen [17]. Nachdem das Fenster die Sequenz „abgefahren“ hat, wird der Bereich der größten Hydrophobizität der Membranmitte zugewiesen.

3.1.1.3 Psipred

Beruhend auf experimentellen Strukturdaten und mit Hilfe von neuronalen Netzwerken errechnet Psipred Sekundärstrukturvorhersagen, wobei es in der Lage ist, α -Helices und β -Faltblätter vorher zu sagen [44].

3.1.1.4 TopPred

Das Programm TopPred sagt die Hydrophobizität einer Sequenz beruhend auf dem von-Heijne-Algorithmus unter Berücksichtigung der „*positive-inside-rule*“ voraus. Diese besagt, dass bei transmembranären Helices die positiv geladenen Aminosäuren typischerweise am zytoplasmatischen Ende zu finden sind [87]. Die Topologie einer Sequenz der Länge von $n+q$ Aminosäuren wird bestimmt. Die Größe n repräsentiert die Länge des transmembranären Teil, q den Übergang Membran-Zytoplasma. Beginnend beim N-Terminus wird eine Aminosäure als Anfangspunkt betrachtet und das Fenster erweitert, bis ein Topologie-Profil eines transmembranären Bereichs gefunden wird.

3.1.1.5 ProtScale

Das Programm ProtScale beruht auf den Hydropathie-Untersuchungen von Kyte und Doolittle [51]. In der von ihnen aufgestellten Skala wird jedem Protein ein Wert zugewiesen, der ihre Hydrophilie bzw. Hydrophobie (zusammen: Hydropathie) widerspiegelt. Diese Werte werden aus verschiedenen experimentellen Daten abgeleitet. Bei der Untersuchung der Sequenz wird jeder Aminosäure der entsprechende Wert zugeordnet. Anschließend wird die Sequenz mit einem Fenster definierter Größe „abgefahren“: die Werte innerhalb des Fensters werden addiert und der Aminosäure in der Mitte des Fenster zugeordnet. Fährt man mit diesem Fenster über die gesamte Sequenz, so ergeben sich je nach gewählter Fenstergröße unterschiedlich genaue Hydropathieprofile. Kleine Fenster (ca. sieben Aminosäuren) ergeben eine bessere Auflösung, aber auch häufiger falsch positive Ergebnisse, d.h., es werden z.B. transmembranäre Bereiche gefunden, die nicht vorhanden sind [6]. Größere Fenster reduzieren das Problem der falsch positiven Bereiche, bergen aber das Risiko, dass nahe beieinander liegende transmembranäre Bereiche nicht unterschieden werden können.

3.1.2 Multiples Sequenz-Alignment

Der Vergleich von Sequenzen ist ein wichtiges Werkzeug, um konservierte und homologe Bereiche oder Aminosäuren einer Sequenz zu identifizieren. Sequenzen können in einem globalen Alignment über ihre gesamte Länge verglichen werden oder auch abschnittsweise mittels eines lokalen Alignments. Bei hoch homologen Sequenzen von Proteinen empfiehlt sich ein globales Alignment. Bei Sequenzen geringer Homologie, die z.B. ein ähnliches aktives Zentrum haben, empfiehlt es sich, nur diesen Bereich in einem lokalen Alignment zu untersuchen.

3.1.2.1 ClustalW

Dieses Programm ist in der Lage, unter Zuhilfenahme verschiedener Matrices Protein- oder DNA-Sequenzen zu vergleichen. Als Ergebnis werden wahlweise konservierte bzw. homologe Aminosäuren oder physikochemische Eigenschaften angegeben. Da Loop-Regionen membranständiger Proteine häufig variabel in der Sequenzlänge sind, können an diesen Stellen „Gaps“ eingeführt werden [86].

3.1.2.2 Gen-Alignment

Das Genom enthält Codons von drei Basen, die jeweils eine Aminosäuren codieren. Zwar gibt es für fast alle Aminosäuren mehrere Codons, doch kann auch der

Austausch einer Base zur Codierung einer anderen Aminosäuren führen. Tabelle 3.1 zeigt den genetischen Code anhand der Codons der Messenger-Ribonucleinsäure. So codiert z.B. CUU Leucin. AUU wäre eine konservative Mutation zu Isoleucin, also einer homologen Aminosäure, während CCU ein Prolin in die Aminosäure-Sequenz einführt, welches durch seine cyclische Struktur andere Eigenschaften besitzt als Leucin und Isoleucin.

Punktmutationen des Genoms können einen wichtigen Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz und damit auf die Eigenschaften eines Proteins nehmen. Es kann also möglich sein, dass Aminosäure-Sequenzen geringer Homologie Gen-Sequenzen höherer Homologie aufweisen. Die Gen-EMBL-Datenbank [90] des European Bioinformatics Institute stellt die bekannten Sequenzen zur Verfügung. Die Vernetzung der SwissProt-Einträge mit Gen-EMBL erleichtert das Auffinden. Es gibt Programme, die den Translationsprozess revers (von der Protein- zur Gen-Sequenz) durchführen. Ihre Verwendung ist nicht zu empfehlen, da sich der genetische Code zwischen den Spezies unterscheidet und eine AS mehrere Codons aufweisen kann. Das Programm wird das am häufigsten benutzte Codon wählen, dies muss aber nicht der realen Sequenz entsprechen. Es empfiehlt sich also, auf sequenzierte Gene zurückzugreifen.

1.Base	2.Base				3.Base
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (Start)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Tabelle 3.1: der Genetische Code

Auch die Auswahl des Programms ist wichtig. Das vom Center for Bioinformatics and Biological Computing der Murdoch University/Australien im World Wide Web verfügbare Programm CBA [36] wandelt die Gensequenz zuerst in die Aminosäure-Sequenz um, führt ein multiples Sequenz-Alignment mit ClustalW durch und gibt das Alignment wieder als Gensequenz aus. Logischerweise ergibt sich hierdurch für die Problemstellung dieser Arbeit keine Verbesserung. Besser ist es, direkt mit der Gensequenz zu arbeiten, wofür es auch entsprechende Matrices gibt, z.B. Blosom oder Pileupdna. Das Software-Paket GCG [24] des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg (DKFZ) ist hierfür gut geeignet.

3.2 Seitenkettenrotamer-Bibliotheken

Protein-Seitenketten nehmen bevorzugt bestimmte Konformationen ein, die mit der wachsenden Zahl aufgeklärter Kristallstrukturen immer genauer analysiert werden können.

3.2.1 Die Bibliothek nach Ponder und Richards

Die Rotamer-Bibliothek von Ponder und Richards [67] beruht auf einer Analyse von 19 Proteinen hoher Auflösung ($\leq 2.0 \text{ \AA}$) mit insgesamt 2273 Aminosäuren. Für jede Aminosäure wurden die einzelnen Seitenketten- (χ) -Torsionswinkel gemessen und statistisch ausgewertet. Dabei wurde festgestellt, dass die Seitenketten nur einen kleinen Teil der theoretisch möglichen Konformationen einnehmen. Die Ergebnisse wurden in eine Tabelle überführt, die die Grundlage der Rotamer-Bibliothek des Programms Insight2000 bildet.

Für einige Aminosäuren konnten in der ursprünglichen Datenbank nur eingeschränkt Aussagen gemacht werden: die Verteilung der χ_1 -Winkel des Prolins zeigt keine deutlichen Cluster, die drei in der Bibliothek vorhandenen Rotamere wurden künstlich eingeteilt. Für χ_3 des Glutamins sowie χ_3 und χ_4 von Lysin und Arginin konnten keine statistischen Aussagen gemacht werden, da diese Winkel in den Kristallstrukturen durch die hohe Flexibilität zu schlecht aufgelöst waren.

3.2.2 SCWRL

Für das Programm SCWRL [78] wurden die Konformationen der Seitenketten von zuletzt 814 Proteinen der Protein Data Bank [8] analysiert und, im Gegensatz zur vorher beschriebenen Bibliothek, als Funktion der Konformation des Protein-Rückgrats aufgefasst. Schon bei den χ_1 -Winkeln treten manche Rotamere sehr selten auf – die Datenbank enthält in diesen Fällen nicht genügend Material, um die Wahrscheinlichkeit für diese Winkel verlässlich abschätzen zu können. Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Kristallstrukturen für χ_1 -Winkel und für bestimmte Kombinationen von χ_1 -, χ_2 -, χ_3 - und χ_4 -Winkeln durch Bayesianische Statistik ergänzt und so ihre Wahrscheinlichkeit genauer festgelegt.

Die SCWRL-Rotamerbibliothek enthält also für alle Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit für die verschiedenen χ_1 -Rotamere in Abhängigkeit von den Rückgratwinkeln ϕ und ψ (zusätzlich gibt es für Asp und Asn auch eine Abhängigkeit des χ_2 -Winkels von ϕ und ψ). Bei allen weiteren Seitenkettenwinkeln wird von einer Abhängigkeit

von aufeinander folgenden Winkel ausgegangen. Das Programm ist allerdings bisher nicht in der Lage, χ_3 -Winkel und χ_4 -Winkel zuzuordnen, für diese wird eine gestreckte Konformation angenommen.

Für ein gegebenes Protein-Rückgrat baut SCWRL jedes mögliche Rotamer für alle Aminosäuren und sucht nach Kombinationen, die möglichst geringe Kollisionen zwischen Rückgrat und Seitenketten bzw. zwischen den Seitenketten selbst verursachen. Jedem Rotamer wird eine Energie zugewiesen, die aus seiner Wahrscheinlichkeit abgeleitet ist, so dass bei der Suche nach energetisch günstigen Kombinationen die Häufigkeit der einzelnen Rotamere berücksichtigt wird.

3.2.3 PROCHECK

Bei PROCHECK [68] handelt es sich um eine Reihe von Programmen, mit denen Proteinstrukturen auf ihre Qualität hin überprüft werden können. Dabei wird, neben der stereochemischen Qualität an sich, auch ein Vergleich mit Kristallstrukturen der gleichen Auflösung angestellt. PROCHECK berechnet eine Anzahl von Parametern, die als gute Indikatoren der stereochemischen Qualität angesehen werden [62], wie z.B. die Verteilung der ϕ , ψ , ω und χ_1 -Winkel und vergleicht sie mit Standardwerten, die aus Protein-Kristallstrukturen abgeleitet sind. Andere Parameter wie die Standard-Bindungslängen und -winkel sind von Kristallstrukturen der Cambridge Structural Database [2] abgeleitet.

3.3 Liganden-Docking

3.3.1 AutoDock

Das Programm AutoDock dient dem automatisierten Docking von Liganden in ein starr gehaltenes Rezeptor-Protein. Ursprüngliche Versionen benutzen ein Monte Carlo (MC) Simulated Annealing (SA) Protokoll, auch Metropolis-Methode genannt. Dies bedeutet, die Startgeometrie wird mit dem Metropolis-Algorithmus willkürlich gewählt, dann wird der Komplex aus Rezeptor und freiem Liganden erwärmt, langsam abgekühlt, wieder erwärmt, abgekühlt usw. Dadurch bewegt sich das Molekül. Die Anzahl dieser Zyklen kann variiert werden. Es soll hierdurch das globale Minimum gefunden werden. Die gefundenen Endgeometrien werden in Clustern zusammen gefasst [26]. Hierbei wird zuerst mit dem Unterprogramm „Autogrid“ ein Grid-Kubus über das Protein gelegt. Dieser wird für die im Liganden vorkommenden

Atomtypen berechnet, indem ein Sondenatom die Bindungsstelle „abfährt“ und die Interaktionsenergie für jeden Punkt des Grid-Kubus berechnet. Der Ligand darf sich in diesem Kubus nach dem Zufallsprinzip frei bewegen. In jedem Simulationsschritt wird eine geringfügige Veränderung der Freiheitsgrade (z.B. Rotation des Schwerpunktes, Drehung um Bindungen oder des gesamten Moleküls) durchgeführt. So erhält man in jedem Schritt eine neue Konformation. Die Energie wird gegen das Grid-Feld evaluiert, indem je acht Grid-Punkte zusammengefasst und ihre Interaktions-Energie mit einem bestimmten Atomtyp, z.B. Kohlenstoff, Fluor usw., der durch den Liganden dort zu liegen kommt, berechnet wird. In einem weiteren Simulationsschritt darf sich der Ligand wieder bewegen und die Interaktions-Energie zum Grid-Feld wird aufs Neue berechnet. Diese neue Energie wird mit der Interaktions-Energie des voran gegangenen Schrittes verglichen. Wenn die Energie höher ist, wird die Akzeptanz dieser Konformation geprüft. Hierbei wird berücksichtigt, dass bei höherer Temperatur eine energetisch ungünstige Konformation mit größerer Wahrscheinlichkeit vorkommt als bei geringerer Temperatur. Die Temperatur wird durch den Benutzer vorgegeben. Sie geht nach folgender Formel in die Wahrscheinlichkeit der Akzeptanz ein.

$$P(\Delta E) = e^{\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)} \quad (3.1)$$

ΔE Energiedifferenz zum vorherigen Schritt

K_B Boltzmann-Konstante

Ist die Temperatur hoch genug, werden alle ΔE akzeptiert, bei niedrigerer Temperatur nur Strukturen geringerer Energie.

Es werden mehrere Zyklen durchlaufen und die Ergebnisse in Clustern zusammengefasst [23]. Die erhaltenen Konformationen können mit der Modelling Software Sybyl oder der kürzlich entwickelten AutoDock-Tools-Software visualisiert werden.

3.3.2 FlexX

Mit Hilfe des Programmes FlexX [69] ist man in der Lage, Liganden in die Bindungstaschen von Proteinen einzupassen und Liganden-Rezeptorkomplexe zu generieren. Das Programm platziert den Liganden durch einen inkrementartigen Aufbau in der Bindungstasche des Rezeptors.

Die Informationen, die das Programm benötigt, sind: eine Datei, die Koordinaten und Atomtypen der Rezeptorproteins enthält, eine Definition der Bindungstasche durch Angabe der mit dem Liganden interagierenden Aminosäuren und eine Datei, die Koordinaten und Atomtypen des Liganden enthält.

In einem ersten Schritt wird der Ligand in Fragmente aufgeteilt. Aus diesen wird automatisch oder manuell ein Basisfragment ausgewählt. Diese Teilstruktur sollte aussagekräftige Eigenschaften besitzen, die für eine Ligand-Rezeptor-Interaktion von entscheidender Bedeutung sein können, z.B. die Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden. Mögliche Interaktionen werden wie folgt berechnet: ein Interaktionszentrum wird definiert und eine sphärische Oberfläche wird um dieses Interaktionszentrum gelegt. Eine Interaktion kommt dann zu Stande, wenn die Oberfläche eines Interaktionspartners mit dem Interaktionszentrum einer anderen interagierenden Gruppe Kontakt hat.

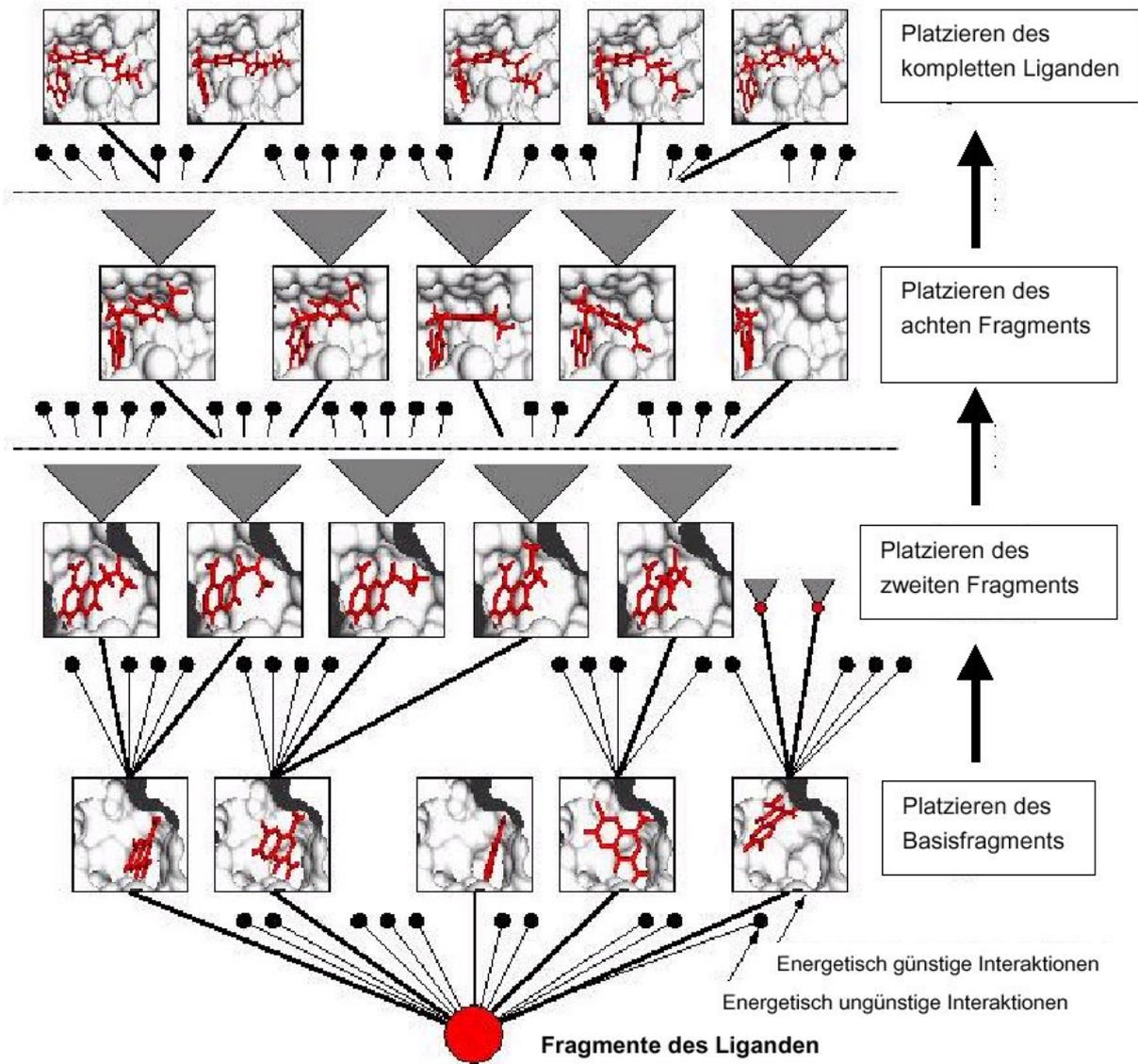


Abbildung 3.1: Vorgehensweise des Programms FlexX: inkrementartiger Aufbau des Liganden in der Bindungstasche der Dihydrofolsäurereduktase nach Rarey [69]

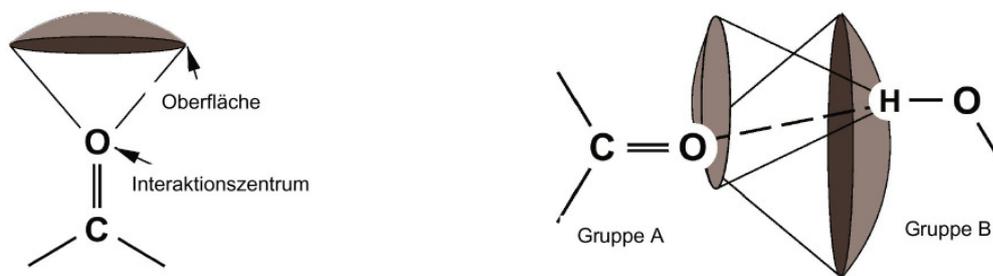


Abbildung 3.2: Links: die interagierende Fläche einer Carbonyl-Gruppe
Rechts: das Zustandekommen einer Interaktion der Gruppen A und B. Die Interaktionszentren liegen jeweils auf der Interaktionsfläche des Wechselwirkungspartners.

Neben der in Abbildung 3.2 dargestellten Möglichkeit kegelförmiger Oberflächen werden auch Teilkegel und sphärische Rechtecke erhalten, je nachdem, welche Interaktion berechnet wird. Die Berechnung der Oberflächen stammt aus Untersuchungen von Interaktionen in Kristallstrukturen [50]. In Tabelle 3.2 sind Interaktionen und relevante Interaktionsoberflächen wiedergegeben. Das Basisfragment wird nach einem „Pose Clustering“-Algorithmus in die Bindungstasche eingepasst. Hierbei wird nach Lösungen gesucht, bei der für das Basisfragment drei Interaktionen mit dem Rezeptorprotein gefunden werden können. Anschließend wird von diesen Lösungen ausgehend der Rest des Liganden inkrementartig in dem Rezeptorprotein aufgebaut. Der Aufbau geht sehr rasch vonstatten, da die Fragmente nur mit einer diskreten Anzahl von Torsionswinkeln addiert werden. Die erweiterten Fragmente, die nicht mit Teilen der Rezeptor-Struktur oder mit sich selbst überlappen, werden beibehalten und für den weiteren Aufbau verwendet. Während des Aufbaus wird nach zusätzlichen Kontakten mit dem Rezeptor gesucht, die dann auch in die Gesamtbewertung der Platzierung mit eingehen. Die Bewertung erfolgt anhand einer von Böhm [12] entwickelten Scoring-Funktion, die leicht modifiziert wurde [69].

Interagierende Gruppe	Beispiel	Geometrie der Oberfläche	Interaktionszentrum
H-Brücken Donor	O-H	Kegel	H
	N-H	Kegel	H
Metall-Ion	Zn ²⁺	Sphäre	Zn
H-Brücken oder Metall-Ion Akzeptor	C=O on COO ⁻	2 sphärische Rechtecke	O
	C=O; S=O; V=O	Kegel	O
	R-O-H	2 sphärische Rechtecke	O
	R ₂ O, R ₃ N	Kegel	O,N
Aromatische Gruppen		2 Kegel oberhalb und unterhalb der Oberfläche	Ringzentrum
Gruppen, die mit Aromaten interagieren	Aromaten	Kegel	H
	Methylgruppen	Sphäre	C
	Amide	2 Kegel oberhalb und unterhalb der Oberfläche	Mitte der C-N Bindung

Tabelle 3.2: Interagierende Gruppen und Geometrie der Interaktion im Programm FlexX

FlexX bietet mit dem Modul „Pharm“ die Möglichkeit der Einführung eines Filters, der die Ergebnisse auf bestimmte Interaktionen untersucht und so den Ergebnis-Raum eingrenzt. Das Modul kann auch nachträglich als Filter eingesetzt werden, um die Anzahl an Docking-Ergebnissen zu verringern und so übersichtlicher zu gestalten.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich FlexX dem Programm AutoDock überlegen. Die Bindungsstelle kann mit FlexX einfacher definiert werden, das Platzieren eines Kubus wie beim Programm AutoDock entfällt. Auch werden mögliche Interaktionen von FlexX tabellarisch angegeben, was die Auswertung erleichtert. Da die Ergebnisse vergleichbar sind, wurde auf den Gebrauch von AutoDock im letzten Teil dieser Arbeit, dem Bau der Modelle nach KvAP verzichtet.

3.4 Quantenchemie

Mit dem Begriff Quantenchemie bezeichnet man die Anwendung der Quantenmechanik auf chemische Fragestellungen wie z. B. die Beschreibung chemischer Reaktionen oder auch die Berechnung von Molekülgeometrien und Moleküleigenschaften.

Nutzt man außer den Werten der Fundamentalkonstanten (z.B.: Elementarladung $e=1,6022 \cdot 10^{-19}$ C; Masse des Elektrons $m_e=9,1094 \cdot 10^{-31}$ kg; das Plancksche Wirkungsquantum $h=6,6261 \cdot 10^{-24}$ Js) nur die Kernladungen der beteiligten Atome und keine experimentell abgeleiteten Parameter, spricht man auch von *ab initio*-Berechnungen (*ab initio* (lat.): von Anfang an). Ein Molekül wird demnach nur über Atomkerne, Elektronen, Multiplizität und die Kernkonfiguration definiert. Im Gegensatz dazu werden bei den semiempirischen Verfahren viele der zu berechnenden Integrale aus empirischen Parametern abgeleitet.

Grundlage quantenchemischer Berechnungen ist die Schrödinger-Gleichung:

$$\overline{H}\Psi = E\Psi \quad (3.2)$$

\overline{H} Hamilton-Operator

Ψ Wellenfunktion

E Energie des Zustands

Die Lösung der Schrödinger-Gleichung ergibt eine Wellenfunktion eines Systems, dessen Eigenschaften aus ihr abgeleitet werden können. Eine exakte Lösung der Gleichung ist allerdings nur für sehr kleine Systeme wie ein Wasserstoffatom möglich. Für größere Moleküle werden Näherungen wie die Self Consistent Field

(SCF)-Methode verwendet, die von Hartree und Fock entwickelt wurde. Drei Näherungen sind dabei wichtig [28]:

1. Die Bewegung von Kern und Elektron wird getrennt, die Position der Atomkerne wird stationär angenommen (Born-Oppenheimer-Näherung). Die Kerne bewegen sich „aus der Sicht der Elektronen“ nur wenig, weil sie eine wesentlich höhere Masse besitzen. Dies führt zur Eliminierung der kinetischen Energie der Atomkerne aus der Schrödinger-Gleichung und lässt nur einen konstanten Term für die potentielle Energie übrig (elektronische Schrödinger-Gleichung).
2. Auftrennung der Elektronenbewegung (Hartree-Fock-Näherung): Die Vielelektronen-Wellenfunktion wird als eine Summe der Produkte von Einelektronen-Wellenfunktionen betrachtet.
3. Die einzelnen Molekülorbitale werden als Linearkombinationen von Atomorbitalen (LCAO) dargestellt.

3.5 Kraftfeldmethoden

Im Gegensatz zu quantenchemischen Methoden erlaubt ein Kraftfeld die schnelle Berechnung auch großer Moleküle. Nur so ist es zum Beispiel möglich, das dynamische Verhalten von Proteinen zu untersuchen. Allen Kraftfeldern liegt die Annahme zugrunde, dass sich der Energieinhalt eines Moleküls über die Gesetze der klassischen Mechanik berechnen lässt („Molekülmechanik“). Dabei wird die Energie des Moleküls als Funktion seiner Atomkoordinaten berechnet. Die Atome werden als Massenpunkte betrachtet, die über Federn miteinander verbunden sind. Die Geometrie der Ruhelage wird über Gleichgewichtswerte beschrieben, Kraftkonstanten geben die Festigkeit der Bindungen an. Die aktuellen Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel etc. in einem Molekül werden bei einer Minimierung im Kraftfeld über mechanische Kräfte diesen Referenzwerten angenähert. Ist die ideale Geometrie nicht erreichbar, werden Abweichungen von den Gleichgewichtswerten mit Strafenergien belegt, deren Summe die Gesamtenergie des Moleküls ergibt. Ein völlig entspanntes Molekül hätte demnach den Energiewert Null. Kraftfeldenergien haben keine physikalische Relevanz, Energiedifferenzen können aber miteinander verglichen werden.

Standardenergieterme in Kraftfeldern die Bindungslängenenergie E_B , die Bindungswinkelenergie E_W , die Torsionswinkelenergie E_T , die Schwingungsenergie der Atome E_{oop} und die beiden Terme für Wechselwirkungen über den Raum, nämlich die van-der-Waals-Energie E_{vdW} und die elektrostatische Energie E_{ele} (3.5):

$$E = \sum E_B + \sum E_W + \sum E_T + \sum E_{oop} + \sum E_{vdW} + \sum E_{ele} \quad (3.3)$$

In dieser Arbeit wurde das als CVFF bezeichnete Kraftfeld (CVFF = consistent valence force field) verwendet. Es wurde ursprünglich entwickelt, um die Eigenschaften von Proteinen bzw. Peptiden wiedergeben zu können. Inzwischen wurde es aber dahingehend erweitert, dass auch andere chemische Systeme berechnet werden können, die allerdings ähnliche funktionelle Gruppen wie Proteine besitzen sollten. Um die Interaktion zwischen Protein und DHP berechnen zu können wurde ein modifiziertes Kraftfeld benutzt, in dem die flache Boot-Konformation der DHP parametrisiert vorliegt. Die Kraftfeld-Terme sollen im folgenden näher beschreiben werden.

Bindungslänge:

$$E_B = \sum k_d (d - d_0)^2 \quad (3.4)$$

d aktuelle Bindungslänge (Å)

d_0 Referenz-Bindungslänge (Å)

k_d Bindungslängenkräftkonstante (kcal/Å²)

Üblicherweise wird für die Berechnung der Bindungslängenenergie eine quadratische Funktion verwendet, jede Abweichung vom Idealwert führt so zu einer Erhöhung der Energie.

Bindungswinkel:

Auch die Bindungswinkelenergie wird über einen harmonischen Term berechnet:

$$E_w = \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (3.5)$$

- Θ aktueller Winkel zwischen zwei aneinander grenzenden Bindungen
- Θ Referenz-Bindungswinkel
- k_θ Bindungswinkel-Kraftkonstante (kcal/mol)

Torsionswinkel:

Dieser Term beschreibt die Drehung um eine Einfachbindung und wird mit trigonometrischen Funktionen berechnet:

$$E_T = \sum k_T [1 + \cos(n\omega - \omega_0)] \quad (3.6)$$

- K_T halbe Torsionsbarriere (kcal/mol)
- n Periodizität
- ω aktueller Torsionswinkel
- ω_0 Referenztorsionswinkel (0° oder 180°)

Out of plane bending:

Mit diesem Energie-Term wird die Auslenkung eines planar gebundenen Atoms aus der Ebene beschrieben. Das CVFF-Kraftfeld benutzt hierfür so genannte *improper torsions*. Dabei wird ein fiktiver Torsionswinkel aus drei miteinander verbundenen Atomen und einem vierten (benachbarten) Atom gebildet und wie ein normaler Torsionswinkel berechnet.

$$E_{oop} = k[1 + \cos n\chi - \chi_0] \quad (3.7)$$

K_{oop} Kraftkonstante oder *out-of-plane*-Energie

n Periodizität

χ aktueller fiktiver Torsionswinkel

χ_0 fiktiver Referenztorsionswinkel

Interaktionen über den Raum:

Nichtkovalente Wechselwirkungen treten zwischen Atomen auf, die mindestens zwei kovalente Bindungen von einander entfernt sind. In Kraftfeldern werden sie über die Dispersionsenergie und die Coulomb-Wechselwirkung berücksichtigt.

Dispersionsenergieterm:

Dispersion entsteht bei unpolaren Molekülen durch die Bewegung der Elektronen, die in benachbarten Atomen ein Dipolmoment induzieren. Nähern sich die Atome zu sehr an, stoßen sie sich gegenseitig ab. Anziehung und Abstoßung sind nur über sehr kurze Entfernungen wirksam und können über das Lennard-Jones-Potential beschrieben werden. Die Abstoßung nimmt dabei in der zwölften Potenz, die Anziehung in der sechsten Potenz des Abstands ab.

$$E_{vdw} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (3.8)$$

A_{ij} Konstante im repulsiven Term ($\text{kcal}/\text{\AA}^{12}$)

B_{ij} Konstante im attraktiven Term ($\text{kcal}/\text{\AA}^6$)

R_{ij} Abstand zwischen den Atomen i und j

Elektrostatistischer Term:

Für die Berechnung der elektrostatischen Energie wird das Coulomb-Potential verwendet, das die Wechselwirkung zwischen zwei Ladungen in Abhängigkeit von ihrem Abstand und der Dielektrizitätskonstante wiedergibt. Die Dielektrizitätskonstante kann dabei ebenfalls abstandsabhängig gewählt werden.

$$E_{ele} = \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon} \quad (3.9)$$

q_i, q_j Ladung der Atome i, j (e)

r_{ij} Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)

ϵ Dielektrizitätskonstante

3.6 Moleküldynamiksimulation (MDS)

Bei moleküldynamischen Methoden (MD) wird im Gegensatz zur Molekülmechanik (MM) auch die Beweglichkeit der Moleküle berücksichtigt. Bewegung ist in der Natur auch im molekularen Maßstab sehr wichtig. Chemische Reaktionen kommen nur durch das Aufeinandertreffen der Reaktionspartner zustande, Liganden müssen ihre Konformation ändern, um an den Rezeptor binden zu können (z.B. *induced fit*), Proteine müssen sich bewegen, um Signale weiterleiten zu können (z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren) etc.

Um die Bewegung simulieren zu können, wird in der Moleküldynamik die Newton'sche Bewegungsgleichung für ein System von n Atomen gelöst:

$$F_i(t) = m_i a_i(t) \quad (3.10)$$

F_i Kraft auf das Atom i

m_i Masse des Atoms i

a_i	Beschleunigung des Atoms i
t	Zeit

Die Kraft auf das Atom i kann direkt aus der Ableitung der potentiellen Energie abgelesen werden. Kennt man die Ausgangskordinaten des Moleküls und eine anfängliche Beschleunigung, so können Koordinaten und Beschleunigung zu einer späteren Zeit $t + \Delta t$ berechnet werden. Wichtig ist dabei die richtige Wahl des Zeitschritts Δt . Dies soll am Beispiel des Verlet-Leapfrog-Algorithmus erklärt werden, der im Programm INSIGHT2000/FDISCOVER [41] implementiert ist. Bei diesem Algorithmus wird angenommen, dass Geschwindigkeit und Beschleunigung über den gewählten Zeitschritt konstant bleiben. Die schnellste Vibration in einem organischen Molekül, die der C-H-Bindung mit einer Periode von 10^{-14} s, muss dafür in acht bis zehn Segmente aufgeteilt werden. So ergibt sich ein Zeitschritt von $1\text{fs} = 10^{-15}$ s.

Eine Moleküldynamiksimulation kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden: der Äquilibrierung und der Datensammlung. In der Äquilibrierungsphase wird der Konformationsraum nach der wahrscheinlichsten Konformation für gegebene Bedingungen (z.B. Druck und Temperatur) abgesucht. Das Molekül wird auf die Simulationstemperatur gebracht und kann sich bewegen. Dabei strebt es einen Zustand möglichst geringer Energie an. Ein Gleichgewichtszustand ist erreicht, wenn die Parameter Temperatur, RMSD (root mean square deviation) und/oder Druck konstante Durchschnittswerte zeigen. Nach der Äquilibrierung können Daten über die Konformation des Moleküls gesammelt werden. Dafür wird in regelmäßigen Intervallen eine „Momentaufnahme“ des Moleküls, d.h. der Koordinaten und Vektoren der beteiligten Atome aufgenommen und das Molekül in diesem Zustand gespeichert. Man erhält eine große Anzahl sog. *Frames* (engl.: Form, Rahmen, Gestell), die weiter analysiert werden.

Ein wichtiger Parameter bei Moleküldynamik-Simulationen ist die Dielektrizitätskonstante ϵ , die ein Maß für die relative Durchlässigkeit eines Materials darstellt und in den elektrostatischen Term eines Kraftfeldes eingeht. Sofern nicht im Vakuum gerechnet wird, ist sie stets größer als 1. Im Inneren von Proteinen wird ϵ auf 2 bis 4 geschätzt [27]. Häufig werden abstandsabhängige Dielektrizitätskonstanten verwendet. So vermeidet man Artefakte, die durch Cutoffs verursacht werden.

Elektrostatische Interaktionen wirken über große Abstände. Werden sie durch einen Cutoff bei einem bestimmten Abstand plötzlich auf Null abgesenkt, kann dies die Moleküldynamik empfindlich stören. Bei abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstanten wird die elektrostatische Interaktion schneller vermindert, da sie mit dem Quadrat der Entfernung abnimmt.

Anwendungen für Moleküldynamik-Simulationen sind z.B. Konformationsanalysen, Stabilitätsuntersuchungen oder die Analyse der Bewegung von Molekülen.

3.6.1 Clustereinteilung mit dem Programm NMRClust

Während einer MDS wird in regelmäßigen zeitlichen Abständen der aktuelle Zustand der simulierten Moleküle aufgezeichnet. Diese Momentaufnahme, mit dem Wort „*Frame*“ (engl.: Schablone, Form) bezeichnet, beinhaltet z.B. die aktuelle Konformation, den Energiegehalt, die Koordinaten der Atome und ihren Vektor. So wird die Bewegung des Moleküls über den gegebenen simulierten Zeitraum verfolgt. Um eine statistisch repräsentative Aussage zur Konformation eines Moleküls und seiner Bewegung während einer MDS machen zu können müssen sehr viele Frames (Anzahl=N) gesammelt werden. Durch Vergleich der Frames und Einteilung in Gruppen wird eine repräsentative Konformation bestimmt.

Das Programm NMRClust sortiert die Frames in konformatorisch ähnliche Gruppen, sog. Cluster, und wählt eine repräsentative Struktur jedes Clusters aus. Im Folgenden wird die Vorgehensweise des Programms beschrieben.

Nach der Überlagerung der erhaltenen N Frames, wird über Atome, die frei wählbar sind der RMS-(Root Mean Square)- Wert berechnet. Hieraus wird eine Matrix aus N x N RMS-Werten aufgebaut (RMSD-Matrix). Im nächsten Schritt erfolgt das eigentliche Clustern nach dem *average linkage*-Algorithmus. Auf der Basis der RMSD-Matrix wird zwischen jeweils zwei Frames ein Wert berechnet, der mit einem Mittelwert der RMSD-Differenz vergleichbar ist. Im Anschluss daran werden die beiden ähnlichsten Frames in einem Cluster zusammengefasst. Diese Prozedur wird (N-1)mal durchgeführt. Auf jeder Stufe (1 – N-1) wird außerdem die Streuung der RMS-Differenzen innerhalb der einzelnen Cluster berechnet. Aus diesen Werten ergibt sich dann der Mittelwert der Streuung über alle Cluster, der zusammen mit der

zugehörigen Anzahl an Clustern für jede einzelne Stufe gespeichert wird. Diese beiden Werte werden im nächsten Schritt benötigt.

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

4 Durchführung und Ergebnisse

4 Durchführung und Ergebnisse

Um ein Modell der DHP-Bindungsstelle des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals zu entwickeln, wurden als Template die Kristallstrukturen der K^+ -Kanäle KcsA, MthK und KvAP verwendet. Modelle auf der Basis von KcsA und MthK repräsentieren den offenen und den geschlossenen Modus eines Ionenkanals. Der Effekt des Zustandes auf die DHP-Bindung wurde untersucht. KvAP sieht als spannungsgesteuerter K^+ -Kanal den spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen am Nächsten. Auf dieser Grundlage wurde unter Verwendung der an den vorherigen Strukturen entwickelten Überlegungen und Methoden das endgültige Modell aufgebaut. In dieses Modell wurden Liganden eingedockt und die Interaktionsmuster mit dem DHP-Pharmakophor verglichen, um die Qualität des Modells zu beurteilen

Um die auf den verschiedenen Templaten beruhenden Modelle besser unterscheiden zu können, wird folgende Nomenklatur benutzt:

Die Kristallstrukturen werden mit ihren Kürzeln KcsA, MthK oder KvAP bezeichnet.

Die Modelle des Ca^{2+} -Kanals werden mit dem Kürzel ihres Templates, z.B. KvAP-, und einem Index bezeichnet, der Bezug auf ihre Erstellung gibt.

Beispiel 1: KvAP-C bedeutet, das Modell beruht auf den Koordinaten von KvAP, das Protein-Sequenz-Alignment wurde mit ClustalW erstellt.

Beispiel 2: MthK-G bedeutet, die Koordinaten von MthK liegen dem Modell zu Grunde, das Gen-Sequenz Alignment wurde mit GCG erstellt.

In Anhang C findet sich eine Übersicht aller Modelle und ihrer Bezeichnung.

Ein großes Problem stellt die geringe Sequenzidentität (zwischen Q13936 und KcsA bzw. MthK je ca. 10%, zwischen Q13936 und KvAP ca. 20%) dar. Der Hauptfokus dieser Arbeit liegt in der Modellierung der DHP-Bindungsstelle, welche sich innerhalb der Membran befindet. Daher wird auf die Modellierung der Loops verzichtet. Ausgehend von den Vorhersagen der Transmembranär-

und Loop-Bereiche, werden Sequenzabschnitte von 40 AS je Segment einzeln betrachtet. Die Vorhersage der SwissProt-Datenbank [39] bzgl. der transmembranären Lage wird mit weiteren Programmen geprüft. Zusätzlich wird untersucht, ob diese Bereiche als Sekundärstruktur eine Helix aufweisen können und schließlich ein Multiples Sequenz-Alignment (MSA) durchgeführt. Dies soll Aufschluss darüber geben, ob die Sequenz in einem Vergleich mit entsprechenden Abschnitten anderer Ca^{2+} - und K^+ -Kanäle sowie den Sequenzen der Template homologe oder gar konservierte Aminosäuren vorweist.

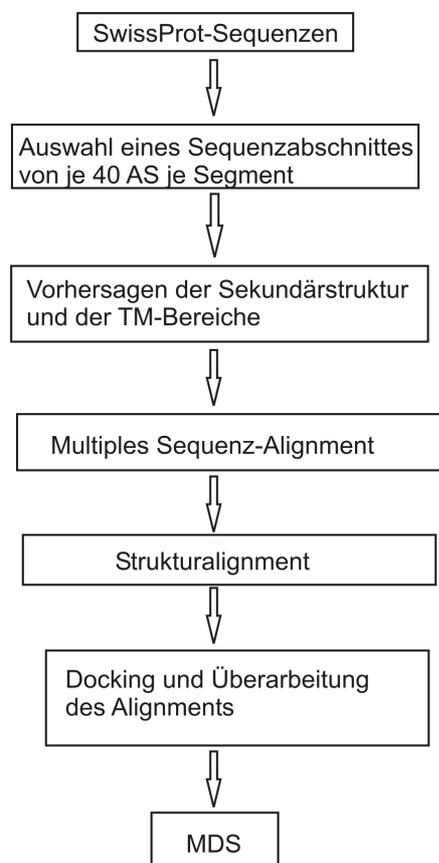


Abbildung 4.1: Schematische Vorgehensweise bei der Modellierung der DHP-Bindungsstelle des Ca^{2+} -Kanals vom L-Typ

Mit Hilfe dieses MSA soll ein strukturelles Alignment erstellt werden. Das daraus gewonnene Modell kann verwendet werden, um den dreidimensionalen Aufbau der DHP-Bindungsstelle und möglicher Interaktionen zu untersuchen. Die Interaktionsmöglichkeiten sollen durch Docking verifiziert werden. Da Docking-Programme das Protein starr betrachten, soll im letzten Schritt eine Moleküldynamik-Simulation (MDS) die Bewegung innerhalb des Komplexes veranschaulichen.

Abbildung 4.1 zeigt schematisch die Vorgehensweise.

Die Sequenzabschnitte, welche für das Struktur-Alignment verwendet werden sollen, müssen die folgenden drei Eigenschaften aufweisen: Homologie zur Templat-Sequenz, Beinhalten der durch Mutationsstudien als wichtig erkannten Aminosäuren und helikale Sekundärstruktur. Die Länge der Sequenz Q13936 beträgt 2221 AS, was einen hohen Rechen- und damit Zeitaufwand bedeutet. Da, wie in Abschnitt 1.4.2 erläutert, für die DHP-Bindungsstelle ausschließlich die helikalen Segmente IIIS2, IIIS5, IIIS6, IVS1, IVS5, IVS6 sowie die SS-Bereiche der Repeats III und IV wichtig sind, wurden nur diese weiter untersucht. Dadurch kann das Modell auf 254 Aminosäuren beschränkt werden.

4.1 Determination der transmembranären helikalen Bereiche

Untersuchungen von Kass et al. [46] und Schleifer [73] haben gezeigt, dass sich die DHP-Bindungsstelle innerhalb der Membran in Bereichen mit helikaler Sekundärstruktur befindet. Da für die, die TM-Helices verbindenden, Loops keine DHP-Interaktionspunkte bekannt sind, konzentrierten sich die Untersuchungen dieser Arbeit auf die TM-Bereiche. Das SRS (Sequence Retrieval System) der SwissProt-Sequenz-Datenbank stellt unter anderem eine Vorhersage von TM-Bereichen einer Sequenz zur Verfügung. Diese kann als Orientierung verwendet werden, sollte aber auf ihre Verlässlichkeit geprüft werden. Daher wurden ausgehend von dieser Vorhersage zuerst die Sequenzabschnitte IIIS5, IIIS6 und IVS6 und die angrenzenden Aminosäuren untersucht. Nach Testung der von PredictProtein [35] zur Verfügung gestellten Programme mit Sequenzen bekannter Kristallstrukturen wurden die Sequenzabschnitte des L-Typ Calcium-Kanals Q13936 bzgl. transmembranärer Lage und helikaler Sekundärstruktur untersucht (s. Tabelle 4.1). Zur Testung wurden das Templat KcsA sowie drei weitere Proteine, welche sich durch die Anwesenheit transmembranärer Bereiche auszeichnen, eingesetzt. Die Sequenz wird über das WWW-Interface eingelesen und kann über den Meta-Server an mehrere Programme zugleich geschickt werden. Dies ist eine praktische Zeitersparnis.

Protein	PDB-Code	PHD	Psipred	DAS	Toppred	ProtScale
KcsA	1BL8	Helices und Faltblätter	gute Vorhersage der Helices	TM und Helices länger	alle Helices, aber kürzer	gute Vorhersage der Helices
Protease	1AF0					
Cytochrom- Oxidase	1AR					
CIC-Kanal	1KPL					

Protein	PDB-Code	JPred	SSpro	SAM-T99
KcsA	1BL8	Probleme der Datei- Inkompatibilität	Datei-Inkompatibilität Helices falsch vorhergesagt	Helices falsch vorhergesagt
Protease	1AF0			
Cytochrom- Oxidase	1AR			
CIC-Kanal	1KPL			

Tabelle 4.1: Die zur Testung des Sekundärstrukturvorhersagen benutzen Kristallstrukuren und Methoden sowie die Beurteilung der Vorhersage

Die besten Vorhersagen liefern die Programme DAS, Toppred und ProtScale. DAS sagt Helices generell etwas zu lang voraus, Toppred findet kürzere Helices als in den Kristallstrukuren vorliegen. Längenunterschiede um 2-3 Aminosäuren am Helixende sind akzeptabel, da die Struktur durch die Lage der Loops beeinflusst wird. Psipred und PHD machen sehr gute Vorhersagen für KcsA, für die anderen Proteine waren 2/3 der Helices gut vorhergesagt, die anderen teilweise sehr kurz.

Nach diesem Test wurden die akkuratesten Programme PHD, Psipred, DAS, Toppred und ProtScale für die Vorhersage transmembranärer, helikaler Bereiche einer Ca²⁺-Kanal-Sequenz eingesetzt.

Da es sich bei den DHPs um Arzneistoffe handelt, die bevorzugt am Menschen eingesetzt werden und zwischen den Spezies geringfügige Unterschiede

bestehen, wurde für die Untersuchung die Sequenz mit der SwissProt-Zugriffsnummer Q13936 gewählt, weil es sich um einen humanen Ca^{2+} -Kanal vom L-Typ handelt. Zuerst wurden die Bereiche der Pore d.h. die Segmente IS5, IS6, IIS5, IIS6, IIIS5, IIIS6, IVS5 und IVS6 bestimmt. Nach der Veröffentlichung der Kristallstruktur von KvAP wurden zusätzliche Untersuchungen für die Segmente IIIS2 und IVS1 vorgenommen.

Tabelle 4.2 zeigt die Bereiche von Q13936, die nach Untersuchungen mit den beschriebenen Programmen als potentiell transmembranär und helikal bestimmt wurden. Diese Sequenzabschnitte wurden benutzt, um anhand der Koordinaten des KvAP das im Folgenden beschriebene Modell zu erstellen.

Bereich	AS-Nummern in Q13936
IS5	263-292
IS6	384-412
IIS5	646-675
IIS6	729-761
IIIS2	929-955
IIIS5	1022-1080
IIIS6	1159-1194
IVS1	1273-1266
IVS5	1402-1438
IVS6	1497-1532

Tabelle 4.2: Potentiell transmembranäre, helikale Bereiche der Ca^{2+} -Kanal-Sequenz Q13936

4.2 Multiples Sequenz-Alignment (MSA)

Die Homologie der Sequenzen der zur Verfügung stehenden strukturaufgeklärten K⁺-Kanäle zur Sequenz der Ca²⁺-Kanäle ist sehr gering. Zudem ist ausschließlich die Struktur der transmembranären Bereiche bekannt. Gruppen von Proteinen ähnlicher Funktion wie z.B. spannungsgesteuerte Kanäle, zeigen eine gewisse Homologie und besitzen daher auch eine strukturelle Ähnlichkeit. Ein pH-abhängiger K⁺-Kanal wie KcsA zeigt größere Homologie zu einem spannungsgesteuerten K⁺-Kanal als zu einem Ca²⁺-Kanal. Spannungsgesteuerte K⁺- und Ca²⁺-Kanäle zeigen auf Grund ihrer ähnlichen Funktionsweise eine höhere Homologie untereinander. Kombiniert man die Sequenzen von KcsA, MthK oder KvAP mit verschiedenen K⁺-Kanal- und Ca²⁺-Kanal-Sequenzen, so kann über diese Brücke das MSA zwischen KcsA, MthK oder KvAP und Q13936 erstellt werden

Tabelle 4.3 zeigt in der mittleren Spalte die konservierten, also identischen Aminosäuren zwischen KcsA, Q13936 und den übrigen, hier nicht dargestellten, Sequenzen. In der rechten Spalte befinden sich die homologen Aminosäuren. Hier auftretende identische Aminosäuren (z.B. L105 und L401 in IS6) sind nicht konserviert, da sie nicht in allen berücksichtigten Kanalsequenzen vorkommen.

Das mit ClustalW durchgeführte MSA mit KcsA zeigt, dass sich in den, die DHP-Bindungsstelle formenden, Helices IIIS5, IIIS6 und IVS6 keine konservierten und wenige homologe Aminosäuren finden, während in den anderen Helices jeweils ein bis zwei konservierte und bis zu vier homologe Aminosäuren vorkommen (s. Tabelle 4.3). Die resultierende Unsicherheit macht eine Zuordnung schwierig. Die konservierten und homologen Aminosäuren dienen als Ankerpunkte für die Erstellung der initialen Kanalmodelle. Nimmt man Informationen anderer Quellen, z.B. Informationen der Liganden zu Hilfe, ist es möglich, für das Struktur-Alignment vom erhaltenen MSA abzuweichen. Auf dieser Grundlage wurde das endgültige Modell erstellt. Da nur Ca²⁺-Kanäle vom L-Typ DHP-sensitiv sind, bestätigt dieses Ergebnis außerdem die Besonderheit dieses Bereichs.

Bereich (je 50 Aminosäuren)	konservierte Aminosäuren		homologe Aminosäuren	
	KcsA	Q13936	KcsA	Q13936
IS5	L35	L274	V34 L41	L273 I260
IS6	F114	F408	V94 F103 L105 L110	L388 L397 L401 L404
IIS5	L36	L658	L35 I38 L40 S44	L657 L670 I672 S666
IIS6			V94 F103 L105 F113	L736 L745 V747 L756
IIIS5			L40 Y45	I1066 F1071
IIIS6			I100	I1171
IVS5			L36 S44	I1415 A1423
IVS6			V99 L110 F114	L1510 I1523 F1527

Tabelle 4.3: Konservierte und homologe Aminosäuren zwischen KcsA und Q13936: Die Bereiche beinhalten je 50 Aminosäuren. Sequenzen, die als Brücke dienen, werden nicht gezeigt, gehen aber in die Bewertung „konserviert/homolog“ ein.

Lange Zeit war KcsA der einzige Zugang zur Struktur von Ionenkanälen. Zwar konnten grundsätzliche Mechanismen der Ionentransduktion mit ihrer Hilfe aufgeklärt werden, doch war nicht geklärt, ob diese Struktur der offenen oder geschlossenen Konformation entspricht. Die großen, strukturellen Unterschiede zwischen offener, Ionen-leitender und geschlossener, inaktiver Konformation zeigen sich an der Kristallstruktur MthK (s. Abschnitt 1.3.2). Da diese der offenen Konformation entspricht und die DHP bevorzugt an die offene Konformation binden, wurde die MthK-Sequenz dem MSA hinzugefügt. Tabelle 4.4 zeigt die gefundenen homologen und konservierten Aminosäuren. Sowohl KcsA als auch MthK geben ausschließlich Rückschlüsse auf den Aufbau der Pore. Bei Modellen auf der Grundlage von KcsA und MthK fehlt ein Teil der Bindungstasche, da diese nach „hinten“ zur Membran offen ist. Der native Kanal muss an dieser Stelle sowohl weitere Helices (S1-S4) als auch eine Membran vorweisen. Die Bindungsstelle ist zur Membranseite abgeschlossen, auch wenn keine Aminosäuren, die mit DHPs interagieren, in Mutationsstudien gefunden wurden. S1-S4-Bereiche können mit den Templaten KcsA und MthK nicht modelliert werden. Würde man eine Moleküldynamiksimulation (MDS) mit Modellen auf dieser Grundlage durchführen wollen, müsste der Ligand durch eine Rückhalte-Kraft festgehalten werden. Diese fixiert Atome oder Atomgruppen an ihren aktuellen Koordinaten, erlaubt dabei aber eine eingeschränkte Beweglichkeit des Moleküls. Dadurch ist die Interaktionsmöglichkeit des Liganden mit dem Rezeptor eingeschränkt.

Bereich (je 50 Aminosäuren)	konserviert			homolog		
	KcsA	MthK	Q13936	KcsA	MthK	Q13936
IS5				L24	V18	I262
				L35	V30	L274
IS6	F114	F98	F408	F103	F87	I397
				L105	V89	L399
				L110	L94	L404
IIS5	L36	L26	L658	L35	L25	L657
IIS6				F103	F88	L745
				L105	V90	V747
				F114	L98	L756
IIIS5				I38	I32	M1062
IIIS6				L90	L71	I1162
				I99	I81	I1171
IVS5				L35	L26	L1414
				L36	L27	I1415
				I38	L29	M1417
IVS6				V97	V81	L1514
				L105	V89	L1523
				L110	L94	I1528
				F114	L98	F1532

Tabelle 4.4: Homologe und konservierte Aminosäuren im Alignment von KcsA, MthK und Q13936

KcsA und MthK zeigen sowohl untereinander als auch zu anderen K⁺-Kanälen eine sehr geringe Homologie. Daher werden, wenn man beide ins MSA einbezieht, weniger konservierte Aminosäuren gefunden als wenn man MthK und KcsA einzeln dieser Prozedur unterzieht. Doch auch in diesem Alignment finden sich konservierte Aminosäuren in Repeat I und II, jedoch nicht in III und IV.

Für das Alignment mit KvAP wurde die Vorgehensweise etwas modifiziert. Als die Kristallstruktur dieses Kanals veröffentlicht wurde, waren die Arbeiten über das Selektivitätsfenster bereits abgeschlossen. Daher wurde darauf verzichtet, ein MSA für alle transmembranären Helices zu erstellen. Nur Helices, die an die DHP-Bindungsstelle angrenzen, wurden berücksichtigt. Außerdem wurden die Segmente S1-S6 von Repeat III und IV in jeweils einem MSA zusammengefasst betrachtet. Abbildung 4.3 zeigt das MSA für KvAP.

```

S1
tr|Q9YDF8|-----EHLVELGVSYAALLSVIVVVVEYTMQLSG-----
sp|P08510|CIKS_DROME--RKVWLLFEYPSSQAARVVAIISVVFVILLSIVIFCLETLPFKHY-KVNT--
sp|Q09470|CIK1_HUMAN--RQVWLLFEYPSSGPARVIAIVSVMVILLISIVFCLETLPKDD-KDFTG--
sp|P15386|CIK2_MOUSE-----LFEYPSSGPARIAIVSVMVILLISIVFCLETLPFRDENEDMHGGV
sp|Q95167|KCB2_CANFA-----DLLEKPNSSVAAKILAIVSNLFLVLSIALSLNTLPELQEMDEFQGFNDN
sp|P22462|KNC2_RAT-----WALFEDPYSSRAARFIAFALFFLVLSITTFLETHEAFNIVKNTKTEPVI
sp|P97445|IIICCAA_MOUSE--STTNPLRRLCHYIINLRYFEMCILMVIAMSSIALAAEDPVQENAPRNNV--
sp|P97445|IVCCAA_MOUSE-----QSFQYRMQFVVSPPFEYTIMAMIALNTIVLMMKFYASVAYENALRVFN-
sp|P15381|IIICCAC_RABIT--NNRFRLOCHRIVNDTIFTNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSPRNHILFY--
sp|P15381|IVCCAC_RABIT--RYIPKNOHQYKVVVNVSTYFEYLMFVLI LLNTICLAMOHYGQSCLFKIA-----
sp|O55017|IIICCAE_MOUSE--CLSPTNLLRRFCHYIVTMRYPFEMVILVVALSSIALAAEDPVRTDSFRNN-----
sp|O55017|IVCCAB_MOUSE-----QSFQYKTFVVSPPFEYFIMAMIALNTVVLMMKFYDAPYEYELMLKCLN-
sp|O95180|IIICCAH_HUMAN--NRFRVSCQKVIHTKMPDHVVLVFIPLNCVTIALERPDIIDPGSTERVFLSV-
sp|O95180|IVCCAH_HUMAN--ADYSPTRRSIHSLSCTSHYLDLFIITFIIICVNVITMSMEHYNQPKSLDEALK--
sp|Q01815|IIICCAC_MOUSE--NNRFRLOCHRIVNDTIFTNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSPRNHILGN--
sp|Q01815|IVCCAC_MOUSE-----NQHQYKVVVNVSTYFEYLMFVLI LLNTICLAMOHYGQSCFKIAMNLLN-
sp|Q13936|IIICCAE_HUMAN--NNRFRLOCHRIVNDTIFTNLILFFILLSSISLAAEDPVQHTSPRNHILFY--
sp|Q13936|IVCCAC_HUMAN-----NQHQYKVVVNVSTYFEYLMFVLI LLNTICLAMOHYGQSCFKIAMNLLN-

S2
tr|Q9YDF8|-----LVRLYLVDLILVILWADYAYRAYKS-----
sp|P08510|CIKS_DROME----EVPDITDPPFLIETLCIIWFTELTVRFLACPNKLNFCRD----
sp|Q09470|CIK1_HUMAN----IYNSNIETDPPFIVETLCIIWFSEFELVVRFFACPSKTDFF-----
sp|P15386|CIK2_MOUSE--GYQQSTSFDTDPFFIVETLCIIWFSEFELVVRFFACPSKAGF-----
sp|Q95167|KCB2_CANFA--MDEFQGFNDNPQLAHVEAVCNAWFTMEYLLRFLSSPNKWK-----
sp|P22462|KNC2_RAT----IETDPALTYVEGVCVWFTEFELVVRIVFSPNKLEFIKNLL--
sp|P97445|CCAA_MOUSEIII-----RNNVLRVFDYVFTGVFTFEMVIK MIDLGLVLHQGAYFRDL
sp|P97445|CCAA_MOUSEIIV-----AYENALRVFNIVFTSLFSLECVLKVMAFGILNLYFRDAWNI--
sp|P15381|CCAC_RABITIII-----TSFRNHILFYFDIVFTTIFTIETALKMTAYGAF LHKGSFC--
sp|P15381|CCAC_RABITIV-----CLFKIAMNLLMMLFTGLFTVEMILKLIAPKPKGYFSDPWNV-
sp|O55017|CCAB_MOUSEIII-----SFRNNALKYMDYIFTGVFTFEMVIK MIDLGLLHHPGAYFRD-
sp|O55017|CCAB_MOUSEIIV-----YDAPYEYELMLKCLNIVFTSMFSMECILKIIAFGVLNLYFRD--
sp|O95180|CCAH_HUMANIII-----GSTERVFLSVSNYIFTAIF-AEMMVKVALGLLSGEHAYLQS-
sp|O95180|CCAH_HUMANIIV-----SLDEALKYCNVYFTIVFVFEAALKLVAFGRFRFFKDRWNQL
sp|Q01815|CCAC_MOUSEIII-----TSFRNHILGNADYVFTSIFLLEIILKMTAYGAF LHKGSFCR--
sp|Q01815|CCAC_MOUSEIIV-----YGQSCLFKIAMNLLMMLFTGLFTVEMILKLIAPKPKGYFSD-----
sp|Q13936|CCAC_HUMANIII-----HTSFRNHILFYFDIVFTTIFTIETALKILGNADYVFTSIFTL--
sp|Q13936|CCAC_HUMANIIV-----YGQSCLFKIAMNLLMMLFTGLFTVEMILKLIAPKPKGYFSDP----

S3
tr|Q9YDF8|-----GDPAGYVKKTYEIPALVPAAGLLALIEGH----LAGL----
sp|P08510|CIKS_DROME-----CPNKNLFCRDVMNVIDIIAIIIPYFITLATV-VAEEDTLNL-
sp|Q09470|CIK1_HUMAN-----FACPSKTDFFKNI MNFIDIVAIIPYFITLGTE-IAEQEGNQ--
sp|P15386|CIK2_MOUSE----FFACPSKAGFFTNIMNII DIVAIIPYFITLGTE-LAEKPED---
sp|Q95167|KCB2_CANFA-----SPNKWKFFKGPLNVIDLLAILPYYVTIFLT-ESNKSVLQFQ-
sp|P22462|KNC2_RAT-----NKLEFIKNLLNIIDFVAIIPFYLEVGLSGLSSKA AKDVLG
sp|P97445|CCAA_MOUSEIII--DLGLVLHQGAYFRDLWNILDFIVVSGALVAFAPT---GNSKGGK--
sp|P97445|CCAA_MOUSEIIV--MAFGILNLYFRDAWNI DFVTVLGSITDILVT-EFGNNFINL--
sp|P15381|CCAC_RABITIII-----GAF LHKGSFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQ-SS-AINVVK--
sp|P15381|CCAC_RABITIV--MILKLIAPKPKGYFSDPWNVDFLIVIGSIIDVILS-ETNP-----
sp|O55017|CCAB_MOUSEIII-----LLLHHPGAYFRDLWNILDFIVVSGALVAFAPS-SFMGSGKGGK--
sp|O55017|CCAB_MOUSEIIV-----IAFGVLNLYFRDAWNVDFVTVLGSITDILVT-EIANNFINL--
sp|O95180|CCAH_HUMANIII-----GLLSGEHAYLQSSWNLLDGLLVLVSLVDIVVAMASAGGAK----
sp|O95180|CCAH_HUMANIIV-----FGRFRFFKDRWNQLDLAIVLLSLMGITL EEEIEMSALPIN-
sp|Q01815|CCAC_MOUSEIII-----GAF LHKGSFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQ-SS-AINVVK--
sp|Q01815|CCAC_MOUSEIIV-----IAFKPKGYFSDPWNVDFLIVIGSIIDVILS-ETNPAHTQ--
sp|Q13936|CCAC_HUMANIII-----GAF LHKGSFCRNYFNILDLLVSVSLISFGIQ-SS-AINVVK--
sp|Q13936|CCAC_HUMANIIV-----IAFKPKGYFSDPWNVDFLIVIGSIIDVILS-ETNHYFCDA--

```

Abbildung 4.2: : MSA der KvAP-Segmente (von oben nach unten: S1, S2, S3)

```

S4
tr|Q9YDF8|-----GLFRLVRLRLRFLRILLIISRG-----
sp|P08510|CIKS_DROME-----SSNQAMSLAILRVIRLVRVFRIFKLSRHSKGLQILGRTLK--
sp|Q09470|CIK1_HUMAN-----KGEQATSLAILRVIRLVRVFRIFKLSRHSKGLQILGQTLK--
sp|P15386|CIK2_MOUSE---AQQGQQAMSLAILRVIRLVRVFRIFKLSRHSKGLQILGQTL--
sp|Q95167|KCB2_CANFA-----LQFQNVRRVQVIFRIMRILRLIKLARHSTGLQSLGFTLRR-
sp|P22462|KNC2_RAT-----SSKAAKDVLFGLRVVFRVLRILRIFKLRHFVGLRVLGHGTL--
sp|P97445|CCAA_MOUSEEIII-----NSKGGKDINTIKSLRVLRVLRPLKTIKRLPKLKA VDCVNV-
sp|P97445|CCAA_MOUSEEIV-----TDILVTEFGNMFNINLSFLRLFRARARLKLRLRQGYTRILL-----
sp|P15381|CCAC_RABITIII-----LISFGIQSSAINVVKILRVLRVLRPLRRAINRAKGLKHVVQ-----
sp|P15381|CCAC_RABITIV-----NAEENSRSISITFFRLFRVMRLVKLLSRGEGIRTLWTFIK-
sp|O55017|CCAB_MOUSEEIII-----GSKGKDINTIKSLRVLRVLRPLKTIKRLPKLKA VDCVNV-
sp|O55017|CCAB_MOUSEEIV-----TEIANNFINLSFLRLFRARARLKLRLRQGYTRILLWTFVQ-
sp|O95180|CCAH_HUMANIII-----AGGAKILGVLRLVLRLLRTRLRVLRVISRAPGLKLVVETLIS-
sp|O95180|CCAH_HUMANIV-----ALPINPTIIRIMEVLRIRARVLRKLLKMATGMRALLDVTVQ-
sp|Q01815|CCAC_MOUSEEIII-----LISFGIQSSAINVVKILRVLRVLRPLRRAINRAKGLKHVVQ-----
sp|Q01815|CCAC_MOUSEEIV-----SAEENSRSISITFFRLFRVMRLVKLLSRGEGIRTLWTFIK-
sp|Q13936|CCAC_HUMANIII-----LISFGIQSSAINVVKILRVLRVLRPLRRAINRAKGLKHVVQ-----
sp|Q13936|CCAC_HUMANIV-----PSMNAEENSRSISITFFRLFRVMRLVKLLSRGEGIRTLWTFIK-
S5
tr|Q9YDF8|-----SKFLSATADAADKIRFYHFLGAVMLT VLYGAFIYIVE-----
sp|Q54397|KCSA_STRCO-----GSALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAQAQLI-----
sp|O27564|MTHK-----LKV PATRILLV LLA V I I Y G T A G F H F I E G E S W T V S L Y W T F V-----
sp|P08510|CIKS_DROME-----GLQILGRTLKASMRLEGLLIFLFFLFIGVILFSSAVYFAEAGSENSFFKSIIP-
sp|Q09470|CIK1_HUMAN-----GLQILGQTLKASMRLEGLLIFLFFLFIGVILFSSAVYFAEAEAEESHFSSIP-
sp|P15386|CIK2_MOUSE-----SKGLQILGQTLKASMRLEGLLIFLFFLFIGVILFSSAVYFAEADERDQFSP-
sp|Q95167|KCB2_CANFA-----LQSLGFTLRSSVALLIVMLFFIYAVIGMQVFFSSLVFFAEKADADATKFTSIPA-
sp|P22462|KNC2_RAT-----LGHTLRAS TNEFLLLIIFLALGVLI FATMIYYAERVGAQPN D P S A S E H T Q
sp|P97445|CCAA_MOUSEEIII-----DCVNVSLKNNVNI L V Y M L F M F I F A V V A V Q F F K G K F F H C T D E S K E F E R D C-----
sp|P97445|CCAA_MOUSEEIV-----IRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLF F I Y A I I G M Q V F G N I G D E D E D S D-----
sp|P15381|CCAC_RABITIII-----CVFVAIRTI GNIVIVT T L L Q F M F A C I G V Q L F K G K L Y T C S D S S K Q T E A E C K-----
sp|P15381|CCAC_RABITIV-----WTFIKSFQALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDTTEINRNNNFQ-----
sp|O55017|CCAB_MOUSEEIII-----LKA V F D C V N V S L K N V L N I L V Y M L F M F I F A V I A V Q L F K G K F F Y C T D E S K E-----
sp|O55017|CCAB_MOUSEEIV-----WTFVQSFKALPYVCLLIAMLF F I Y A I I G M Q V F G N I A L D D D T S I N R H N N F R-----
sp|O95180|CCAH_HUMANIII-----LKL V V E T L I S S L R P I G N I V L I C C A F F I I F G I L G V Q L F K G K F Y V C E G P D T R-----
sp|O95180|CCAH_HUMANIV-----TVVQALPQVGNLGLLFMLLFFIYALGVLELFGRLECCSEDNPCGELSRHAT-----
sp|Q01815|CCAC_MOUSEEIII-----KHVVQC V F V A I R T I G N I V I V T T L L Q F M F A C I G V Q L F K G K L Y T C S D S S K Q T-----
sp|Q01815|CCAC_MOUSEEIV-----WTFIKSFQALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDTTEINRNNNFQ-----
sp|Q13936|CCAC_HUMANIII-----KHVVQC V F V A I R T I G N I V I V T T L L Q F M F A C I G V Q L F K G K L Y T C S D S S K Q T-----
sp|Q13936|CCAC_HUMANIV-----TLLWTFIKSFQALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDTTEINRNN-
S6
tr|Q9YDF8|-----ATPIGKVI G I A V M L T G I S A L T L L I G T V S N M F Q K I L V-----
sp|Q54397|KCSA_STRCO-----LAGSYLAVLAERGAQAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRL-
sp|O27564|MTHK-----GYGDYSP-STPLGMYFTVTLIVLGI GTF A V A V E R L L E F L I N R E Q M K-----
sp|P08510|CIKS_DROME-----TTVGYGDMTP-VGWGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNFYFHRETD-----
sp|Q09470|CIK1_HUMAN-----TTVGYGDMYP-VTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNFYFHRETE-----
sp|P15386|CIK2_MOUSE-----SMTTVGYGDMVP-TTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNFYFHRE-----
sp|Q95167|KCB2_CANFA-----TVGYGDIYP-KTLLGKSVGGLCCIAAGVLTIALPVPVIVSNFNFYFHRE-----
sp|P22462|KNC2_RAT-----GDMYP-QTWSGMLV G A L C A L A G V L T I A M P V P V I V N N F G M Y S L A M A K Q K L P
sp|P97445|CCAA_MOUSEEIII-----GPSPGGRMMSIFVYVYFVVF P F F F V N I F V A L I I I T F Q E Q G D K M M E Y S L-----
sp|P97445|CCAA_MOUSEEIV-----LTADCGNEFAYFYFVSFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNF E Y L T R D S S I L G P H-----
sp|P15381|CCAC_RABITIII-----DKGPIYNYRVEISIFFIYIIIIAF F M M N I F V G F I V T F Q E Q G E Q E Y K N C-----
sp|P15381|CCAC_RABITIV-----TEGETPCGSSFAVYFISFYMLCAFLIINLFVAVIMDNFDYLTRDWSILG-
sp|O55017|CCAB_MOUSEEIII-----TYEQGSPSGFRMELSFYVYVYFVVF P F F F V N I F V A L I I I T F Q E Q G D K V M-----
sp|O55017|CCAB_MOUSEEIV-----CDPHANASECGSDPAYFYFVSFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNF E Y L T R D S S-----
sp|O95180|CCAH_HUMANIII-----QQPQNHNPWMLLYFISFLLIVSFFVLMFVGVVNFHRCRQHQEAEAEA-
sp|Q01815|CCAC_MOUSEEIII-----DKGPIYNYRVEISIFFIYIIIIAF F M M N I F V G F I V T F Q E Q G E Q E Y K N C-----
sp|Q01815|CCAC_MOUSEEIV-----TEGETPCGSSFAVYFISFYMLCAFLIINLFVAVIMDNFDYLTRDWSILG-
sp|Q13936|CCAC_HUMANIII-----DKGPIYNYRVEISIFFIYIIIIAF F M M N I F V G F I V T F Q E Q G E Q E Y K N C-----
sp|Q13936|CCAC_HUMANIV-----SNSTEGETPCGSSFAVYFISFYMLCAFLIINLFVAVIMDNFDYLTRDWS-

```

Abbildung 4.3: MSA der KvAP-Segmente (von oben nach unten: S4, S5, S6); die oberen drei Sequenzen entsprechen KvAP, KcsA und KvAP. Die folgenden vier entstammen spannungsabhängigen K^+ -Kanal-Typen (Repeats I – IV Homotetramer), die restlichen Repeats III und IV aus diversen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle.

Bereich	KvAP	Q13936 Repeat III	Q13936 Repeat IV
IIIS1	L50	L912	L1251
	E58	E920	Q1258
IIIS2	L71	L933	M1271
	D75	D937	N1275
	I77	V939	L1277
	L82	F944	F1282
	D85	E947	E1285
	R89	K951	K1289
IIIS3	Y99	F984	Y1298
	I107	L992	F1306
IIIS4	R133*	R1018*	R1377*
	R136*	R1021*	R1380*
	R139*	R1024*	R1383*
IVS5	F167	M1062	I1421
IVS6	L239	I1180	L1518

Tabelle 4.5: Homologe AS im MSA von KvAP und Q13936, konservierte Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet

Die hierbei gefundenen homologen Aminosäuren zeigt Tabelle 4.5. Konservierte Aminosäuren sind in diesem MSA ausschließlich in den S4-Segmenten zu finden. Es handelt sich hierbei um Arginine, die in allen spannungsgesteuerten Ionenkanälen vorliegen [9]. Man vermutet, dass sie an der Rezeption von Spannungsänderungen in Membranen durch das Aktionspotential beteiligt sind. Hierdurch wird die Bewegung der S4-Helices zur Membranoberfläche ausgelöst und der Kanal geöffnet. In den Segmenten S1, S2 und S3 finden sich mehrere Aminosäuren hoher Homologie. Der Austausch von Glutamat gegen Aspartat (S1, S2), Leucin gegen Isoleucin oder Valin (S2,S3) Arginin gegen Lysin (S2) und Tyrosin gegen Phenylalanin (S3)

zwischen diversen im MSA verwendeten K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen zeigt Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften. Ein aus diesem MSA resultierendes Struktur-Alignment ist dadurch abgesichert. Die Segmente S5 und S6 zeigen auch hier nur jeweils eine homologe Aminosäure. Es bestätigt, dass der Bereich der DHP-Bindungsstelle ungewöhnlich ist. Da keine verlässlichen Daten für diesen Bereich aus dem Alignment zu entnehmen sind, muss das Struktur-Alignment mit weiteren Daten überprüft werden.

4.3 Struktur-Alignment

Mit Hilfe des MSA wurden die Koordinaten des Templates auf die Sequenz Q13936 übertragen. Als erstes wurde ein Modell auf der Basis von KcsA erstellt. Auch andere Arbeitsgruppen schlugen diesen Weg ein [93]. Mit der Veröffentlichung von MthK wurden neue Modelle auf dieser Basis erstellt und untersucht. Die erst kürzlich veröffentlichte Struktur des KvAP, der von der Funktionalität her die größte Ähnlichkeit mit spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen aufweist, wurde schließlich für den Bau des endgültigen Modells verwendet. Wenn nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, beziehen sich die im Lauf der folgenden Ausführungen gegebenen Angaben auf die nach KvAP erstellten Modelle.

4.3.1 Aufbau des Modells

Zunächst muss überlegt werden, wie sich die Repeats um die Pore zusammenfügen. Die vier Helixbündel können sich im Uhrzeigersinn oder entgegen dem Uhrzeigersinn anordnen. Da es sich bei den K^+ -Kanälen um Homotetramere handelt, deren vier Repeats absolut identisch sind, kann daraus kein Rückschluss gezogen werden. Striessnig et al. [40] postulieren eine Anordnung im Uhrzeigersinn. Dass dies sinnvoll ist, wird durch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen am KcsA und KvAP bestätigt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Struktur-Alignments aufgrund des mit ClustalW erhaltenen MSA durchgeführt. Die Monomere des Templates wurden nummeriert und je eine Orientierung im Uhrzeigersinn und entgegen dem Uhrzeigersinn generiert.

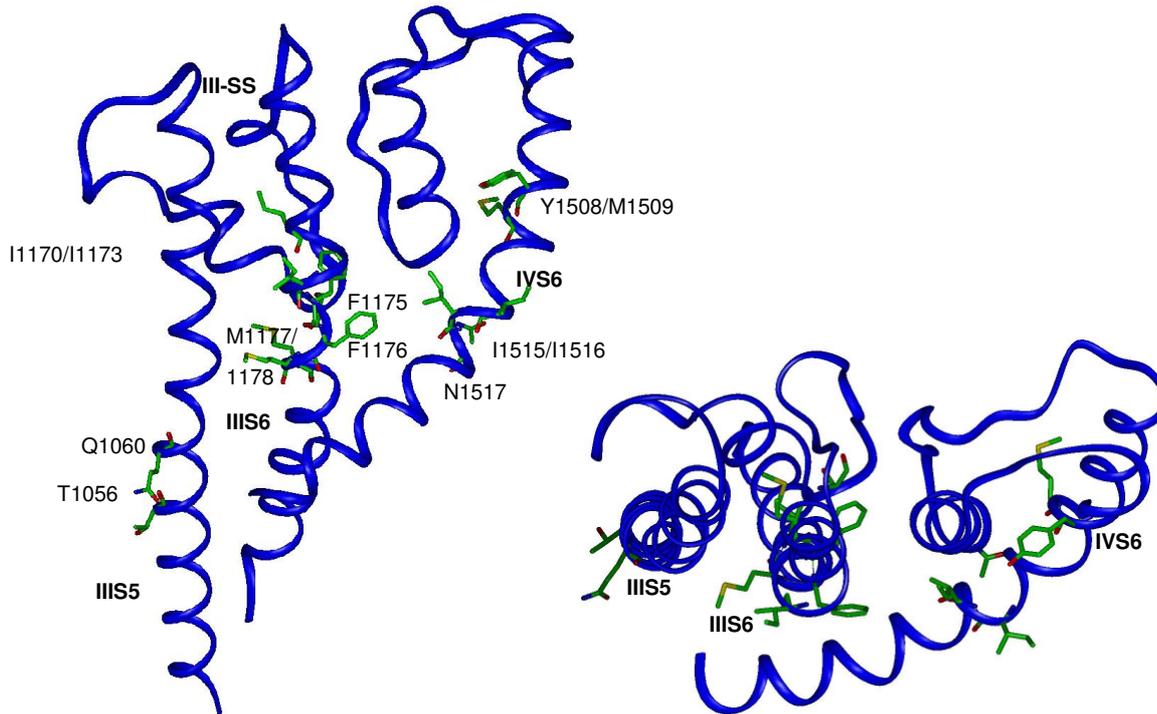


Abbildung 4.4: DHP-Bindungsstelle bei Anordnung der Repeats entgegen dem Uhrzeigersinn, links von außen, d.h. von der Membranseite, die Pore befindet sich hinter den Helices; rechts von oben

Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5 zeigen die DHP-Bindungsstelle der offenen Konformation nach dem Templat KvAP (vgl. Abschnitt 1.3.2). Bei einer Anordnung der Repeats entgegen dem Uhrzeigersinn können die an der Ligandenbindung beteiligten Aminosäuren nicht so angeordnet werden, dass sie eine gemeinsame Bindungsstelle bilden. Auch eine Änderung des Struktur-Alignments wird nicht zur Verbesserung des Modells führen, da die drei Helices keinen gemeinsamen Zwischenraum besitzen, der gleichzeitig Segment III-SS berücksichtigt.

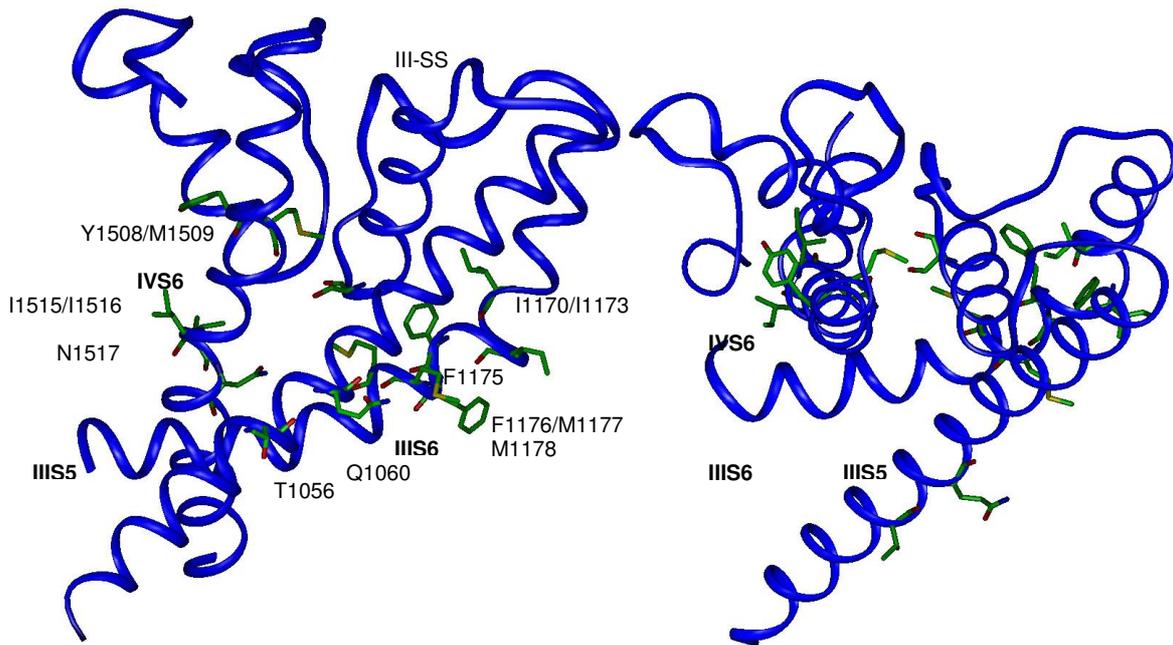


Abbildung 4.5: DHP-Bindungsstelle bei Anordnung der Repeats im Uhrzeigersinn, links von außen, rechts von oben

Dagegen zeigt Abbildung 4.5, dass die DHP-sensitiven Aminosäuren bei einer Anordnung der Repeats im Uhrzeigersinn einander näher sind. Es findet sich zwischen den Helices ein Bereich von ca. 16 Å Durchmesser, der von den Bereichen III-S5, III-S6 und IV-S6 sowie III-SS umgeben ist. Mit dem zuerst durchgeführten MSA nach ClustalW sind sie zwar nicht zueinander orientiert, durch eine Änderung des Alignments kann diese Orientierung jedoch herbeigeführt werden. Für diese Arbeit wurde folglich von einer Anordnung der Repeats im Uhrzeigersinn ausgegangen. Auch für spannungsgesteuerte Na⁺-Kanäle hat sich diese Anordnung durchgesetzt [14].

4.3.1.1 Selektivitätsfenster

Für die Ca²⁺-Selektivität sind die vier Glutamate E363, E706, E1135 und E1464 verantwortlich. Da strukturelle Angaben fehlten, gingen frühere Arbeiten davon aus, dass die Ca²⁺-Ionen koordinativ durch die Carboxylat-Gruppen dieser Glutamate gebunden werden [59]. Es ist jedoch schwer vorstellbar, dass eine derartig starke ionische Wechselwirkung die schnelle Ionenbewegung erlaubt, die in der Natur gemessen wird. Auch haben Na⁺- und K⁺-Kanäle nicht notwendigerweise vier geladene Aminosäuren, die das Selektivitätsfenster bilden.

Die Kristallstruktur des KcsA-Kanals hat gezeigt, dass das durch die Carbonyl-Gruppen des Proteinerückgrates entstehende Dipolmoment ausreichend ist, die K^+ -Ionen nach dem Verlust ihrer Hydrathülle zu stabilisieren und dabei eine hinreichend hohe Ionenflussrate zu gewährleisten. Im Folgenden wird dargestellt, dass diese Anordnung auf den Ca^{2+} -Kanal übertragbar ist.

Untersucht man die Cambridge Structural Database auf das Vorliegen von Ca^{2+} /Carbonyl-Komplexen, so lassen sich 22 Komplexe finden (2 Beispiele werden in Abbildung 4.6 gezeigt).

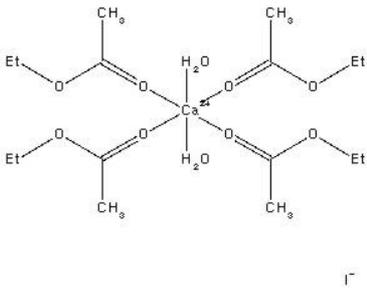
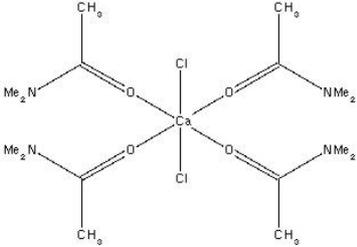
CSD-Code	Strukturformel
MAYKAY	
ZOWKIF	

Abbildung 4.6: CSD-Codes und Strukturformeln von gefundenen Ca^{2+} /Carbonyl-Komplexen, nach [22], [48]

Auch in Proteinen findet man Ca^{2+} -Carbonyl-Komplexe. Im WWW-Interface des Programms Relibase [30] lässt sich das gewünschte Strukturelement eingeben, auf welches dann die Protein Database [37] untersucht wird. In der Natur finden sich durchaus Proteine, die Ca^{2+} -Ionen mit vier Carboxylat-Gruppen binden, in diesen befindet sich das Calcium nicht im aktiven Zentrum, es dient vielmehr dem Erhalt der Tertiärstruktur. Viel häufiger ist jedoch eine Mischform, die

Carbonyl-Gruppen und ein bis zwei Carboxyl-Gruppen kombiniert, aber auch Komplexe, die ausschließlich aus Carbonyl-Gruppen bestehen, wurden gefunden (Tabelle 4.6). Demnach ist es nicht ausgeschlossen, dass -analog zu K^+ -Kanälen- auch das Selektivitätsfenster von Ca^{2+} -Kanälen gebildet wird.

Name des Proteins	PDB-Code	Bindungsmodus der Ca^{2+} -Ionen
humane Phospholipase A_2	1KV0	a) 2 Carboxyl- + 2 Carbonyl-Gruppen b) 4 Carbonyl-Gruppen c) 2 Protein-Carbonyl- + 1 Liganden-Carboxyl-Gruppe d) 3 Carbonyl-Gruppen
Solubilin (Hydrolase)	1A2Q	a) 2 Carboxyl - und 4 Carbonyl - Gruppe b) 3 Carbonyl-Gruppen
Cytochrom C Nitrit- Reduktase	1GU6	a) 1 Carboxyl- und 1 Carbonyl-Gruppe b) 1 Carboxyl- und 1 Carbonyl-Gruppe

Tabelle 4.6: Ergebnis der Relibase-Suche nach Ca^{2+} /Carbonyl-Komplexen in Proteinen

Die K^+ -Selektivität wird durch vier Glycine gesteuert, durch deren Austausch der Kanal unter Beibehaltung der restlichen Sequenz in die Na^+ - oder Ca^{2+} -Selektivität überführt werden kann. Diese Glycine sind immer eingebettet in die Sequenz TVGYG, diese wird also viermal in jedem K-Kanal gefunden. Die Tyrosine sind wichtig, da sie mit Tryptophanen der kurzen Loop-Helix parallel zu liegen kommen. Dadurch kommt es zu einer aromatischen Wechselwirkung, die die Aminosäuren in ihrer Position fixiert. Das Selektivitätsfenster ist also von einem aromatischen Ring aus Tyrosinen und Tryptophanen umgeben, der für die Stabilität des Loops und für die Größe des Selektivitätsfensters verantwortlich ist [18].

In Ca^{2+} -Kanälen lässt sich eine ähnliche Sequenz finden (Tabelle 4.7). In den verschiedenen Ca^{2+} -Kanal-Typen findet sich das Muster TXEXW, nur der T-Typ weicht in Repeat III von diesem Schema konservativ ab. Veränderungen in

Repeat III führen, wie bereits ausgeführt zwar zur Schwächung der Ca^{2+} -Selektivität, jedoch nicht zu ihrem Verlust, wie in den anderen Repeats. Da eine vom K^+ -Kanal abweichende asymmetrische Anordnung der Pore und des Selektivitätsfensters diskutiert wird [16], sind Abweichungen in diesem Bereich am ehesten vertretbar. Hierauf wird im Verlauf dieser Arbeit bei der Überarbeitung der DHP-Bindungsstelle weiter eingegangen (s. Abschnitt 4.5.1.1).

Erstellt man auf dieser Grundlage ein Modell, zeigen die Carboxylat-Gruppen der Glutamate in Richtung der SS1-Helix, während die Carbonyl-Gruppen des Protein-Rückgrates eine Position einnehmen, die eine Interaktion mit den Ca^{2+} -Ionen erlaubt. Wie oben beschrieben, wird in K^+ -Kanälen der Durchmesser des Selektivitätsfensters durch aromatische Wechselwirkungen zwischen Tyrosinen und Tryptophanen reguliert. Ca^{2+} -Kanäle haben keinen aromatischen Ring. Sollen die Glutamate dem „Tyrosin-Ring“ in der Funktion der Porenweitenregulierung entsprechen, müssen passende Partner des „Tryptophan-Ringes“ gefunden werden. Dazu wird das Modell mit dem Programm WHATIF [88] auf Salz- und Wasserstoffbrücken untersucht. Tabelle 4.8 zeigt die gefundenen Interaktionspartner. WHATIF ist ein Interface, das im World Wide Web zu Verfügung steht [38].

Kanaltyp/ Swissprot-Bez.	Repeat-Nr.	Sequenz-Abschnitt	
K-Kanal alle Typen	I	TVGYG	
	II	TVGYG	
	III	TVGYG	
	IV	TVGYG	
L-Typ Q13936	Ca-Kanal	I	TMEGW
		II	TGEDW
		III	TFEGW
		IV	TGEAW
P/Q-Typ O00555	Ca-Kanal	I	TMEGW
		II	TGEDW
		III	TGEGW
		IV	TGEAW
N-Typ O55017	Ca-Kanal	I	TMEGW
		II	TGEDW
		III	TGEGW
		IV	TGEAW
R-Typ Q02343	Ca-Kanal	I	TMEGW
		II	TGEDW
		III	TGEGW
		IV	TGEAW
T-Typ O95180	Ca-Kanal	I	TLEGW
		II	TQEDW
		III	SKDGW
		IV	TGDNW

Tabelle 4.7: Sequenzabschnitte der Porenumgebung der vier Repaets in den verschiedenen Ca²⁺-Kanal-Typen und der K-Kanäle im Vergleich

Repeat	Aminosäuren von Q13936	Interaktion
I	Glu 363 ↔ Gln 358	Wasserstoffbrücke
II	Glu 706 ↔ Gln 701	Wasserstoffbrücke
III	Glu 1135 ↔ Thr 1129	Wasserstoffbrücke
IV	Glu 1464 ↔ Arg 1459	Salzbrücke

Tabelle 4.8: Mit WHATIF bestimmte Interaktionspartner und Interaktionstypen

Es wird für jedes Glutamat ein Interaktionspartner gefunden. Die Repeats I-III zeigen Wasserstoffbrücken, Repeat IV eine Salzbrücke. Dadurch kann die dreidimensionale Struktur des Loops fixiert werden. Eine größere Annäherung der Protein-Rückgrate, die zur Verkleinerung des Selektivitätsfensters führen würde, wird verhindert. Aber auch Ionen mit größerem Radius als Ca^{2+} können nicht in das Selektivitätsfenster eindringen. Sie müssten dazu das Protein-Rückgrat nach außen drängen, was durch die voluminösen Glutamat-Seitenketten nicht zugelassen wird. Abbildung 4.7 zeigt das Selektivitätsfenster von der extrazellulären Seite. In der Mitte ist ein Ca^{2+} -Ion eingebettet.

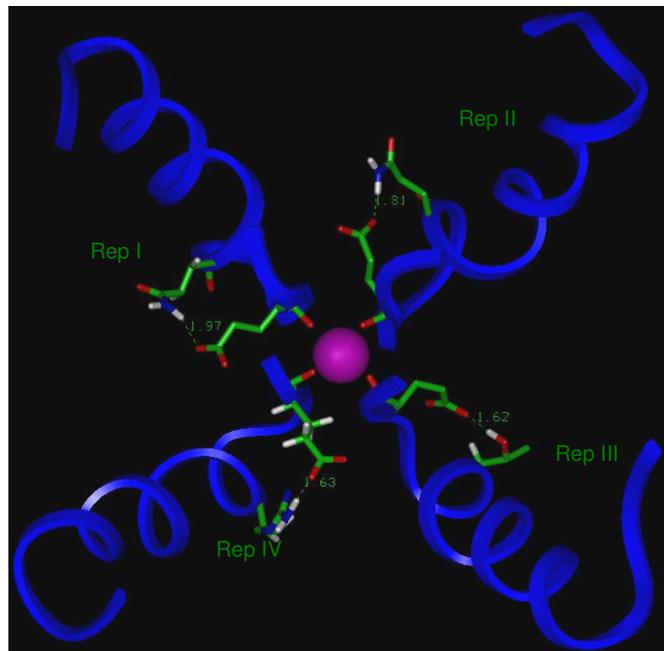


Abbildung 4.7: Pore von oben; in der Mitte ist ein Ca^{2+} -Ion dargestellt, umgeben von den Carbonyl-Gruppen der Glu 363, 706, 1135 und 1464, deren Seitenketten mit Aminosäuren der SS-Helix Wasserstoff- bzw. Salzbrücken ausbilden

4.3.1.2 DHP-Bindungsstelle

Es sind durch konstruktive und destruktive Mutationsstudien 14 Aminosäuren bekannt, welche für die DHP-Bindung wichtig sind. Im konstruktiven Ansatz wird ein nicht DHP-sensitiver Ca^{2+} -Kanal, z.B. ein P/Q-Typ, durch Mutationen so verändert, dass Aminosäuren des L-Typs eingeführt werden. Im Ergebnis sieht man, welche Aminosäuren für die DHP-Sensitivität notwendig sind [80] (s. Tabelle 4.5). Diese Aminosäuren befinden sich alle in den Helices IIS5, IIS6 und IVS6 sowie im SS-Bereich des Repeats III. Es wurde gefunden, dass in den S6-Helices drei bis vier nebeneinander liegende Aminosäuren auf die Ligandenbindung Einfluss nehmen. Da eine Helixwindung aus 3,6 Aminosäuren besteht, können nicht alle vier gleichzeitig direkte Interaktionen mit dem Liganden eingehen. Es muss also gewichtet werden, welche Aminosäure die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion zeigt. Während die Aminosäuren des destruktiven Ansatzes in allen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal-Typen gefunden werden, sind die des konstruktiven Ansatzes nur im L-Typ- Ca^{2+} -Kanal zu finden. Da nur der L-Typ DHPs akzeptiert, ist das Zusammenspiel dieser beiden Gruppen wichtig. Auch tragen einzelne Aminosäuren unterschiedlich stark zur Liganden-Affinität bei. Die Mutation der Aminosäuren I1170, I1173, M1178 und N1117 verringert die Affinität um das fünffache. Dagegen führt eine Mutation von F1175, F1176, M1177; Y1508, M1509 und I1516 nur zur Halbierung der Affinität [85]. Diese Aminosäuren beeinflussen zum einen die Bindung, zum anderen die Inaktivierung [31]. Ihr Einfluss kann durch das hier vorgestellte Modell abgeschätzt werden, genauen Aufschluss kann nur eine Kristallstruktur eines Ca^{2+} -Kanals geben, die z. Zt. nicht zur Verfügung steht.

In Tabelle 1.2 sind bereits die an der DHP-Bindung beteiligten Aminosäuren vorgestellt worden. Zwei Aminosäuren zeigen Besonderheiten. Die Mutation von T1056 in IIS5 hat nur bei Einsatz von raumfüllenden Substituenten wie Tyrosin oder Phenylalanin einen Affinitätsverlust der DHPs zur Folge. Daraus kann man schließen, dass T1056 nicht direkt an der Bindung beteiligt, aber in Richtung der Bindungsstelle orientiert ist, da voluminöse Substituenten den Liganden verdrängen. Wird S1114 durch andere Aminosäuren mit

Wasserstoffbrücken-Donator-Funktion wie Threonin ersetzt, ist kein Affinitätsverlust zu messen, dies geschieht jedoch beim Einfügen von Aminosäuren wie Leucin. Auch werden Agonisten stärker durch S1114 beeinflusst. Da die Agonisten sich von den Antagonisten nur an der Backbordseite durch den Ersatz des Esters gegen eine Nitro-Funktion unterscheiden, ist anzunehmen, dass eben diese Gruppe in Richtung S1114 orientiert ist. Die Helices IIS2 und IVS1 zeigen keine direkten Interaktionen, schließen jedoch die Bindungsstelle zur Membran-Seite ab.

4.4 Optimierung des Modells auf die DHP-Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Modelle auf der Basis der unterschiedlichen K⁺-Kanal-Template von KcsA, MthK und KvAP erstellt (s. Abschnitt 1.3.2). Das nach den Vorgaben des MSA erstellte Struktur-Alignment eignet sich gut für den Aufbau des Selektivitätsfensters. Der Bereich, der die DHP-Bindungsstelle wiedergeben soll, zeigt bei den drei Modellen jedoch kaum Möglichkeiten für die in Tabelle 1.2 genannten Aminosäuren, mit den Liganden in Beziehung zu treten. Abbildung 4.8 zeigt beispielhaft das nach den Vorgaben des MSA mit dem Templat KvAP erstellte Modell (KvAP-C; C=ClustalW), Abbildung 4.9 das zugehörige Alignment.

In Abbildung 4.8 sieht man die Helices IIS5, IIS6 und IVS6 und einen Teil des P-Loops in Repeat III (III-SS). Es ist zu erkennen, dass nur wenige Aminosäuren in die Mitte der Segmente zeigen, wo sich die Bindungsstelle befinden muss. Einzig M1178, N1517 und S1114 zeigen eine entsprechende Geometrie. T1056 sollte ebenfalls in die Bindungstasche zeigen, da sonst eine Verdrängung des Liganden aus der Bindungsstelle, wie sie in Mutationsstudien beobachtet wird, nicht möglich ist (vgl. Abschnitt 4.3.1.2). Ebenso wenig können Q1060 eine Wasserstoff-Brücke und I1760, I1173, I1515 und I1516 van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen. Diese Aminosäuren zeigen alle eine Orientierung, in der sie vom Raum zwischen den Helices, der das DHP aufnehmen kann, wegzeigen. Das Struktur-Alignment ist also nicht geeignet,

ein Modell zu erhalten, dass die gewünschten Kontakte zwischen Rezeptor und Ligand beschreibt.

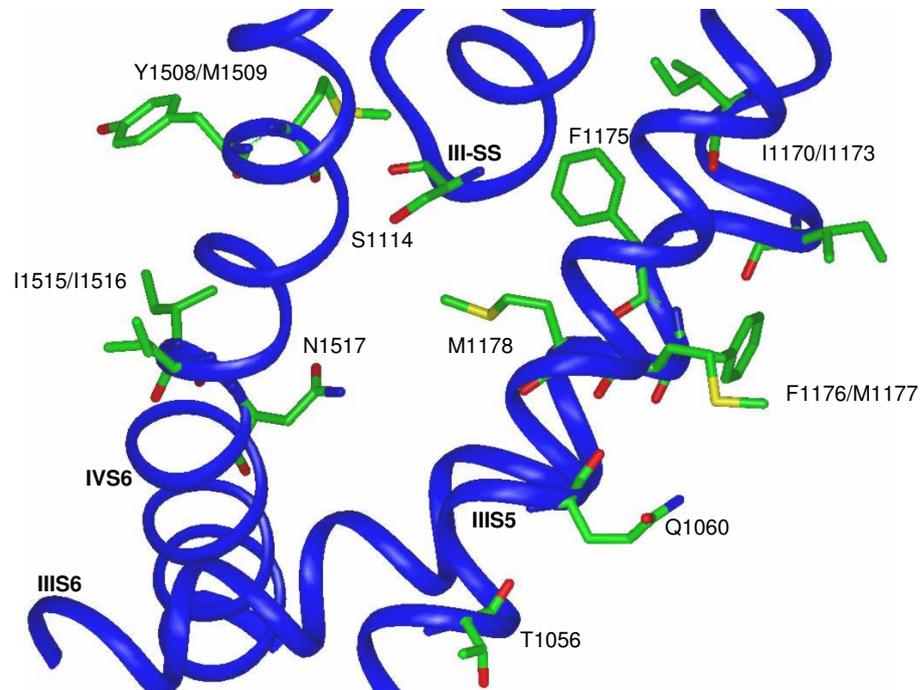


Abbildung 4.8: Modell KvAP-C von KvAP und Q13936 mit Blick von außen auf die DHP-Bindungsstelle. Dargestellt sind die Helices IIIS5, IIIS6 und IVS6 sowie III-SS. Helices IIIS2 und IVS1 sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt, da sie sich „vor“ der Bindungsstelle befinden.

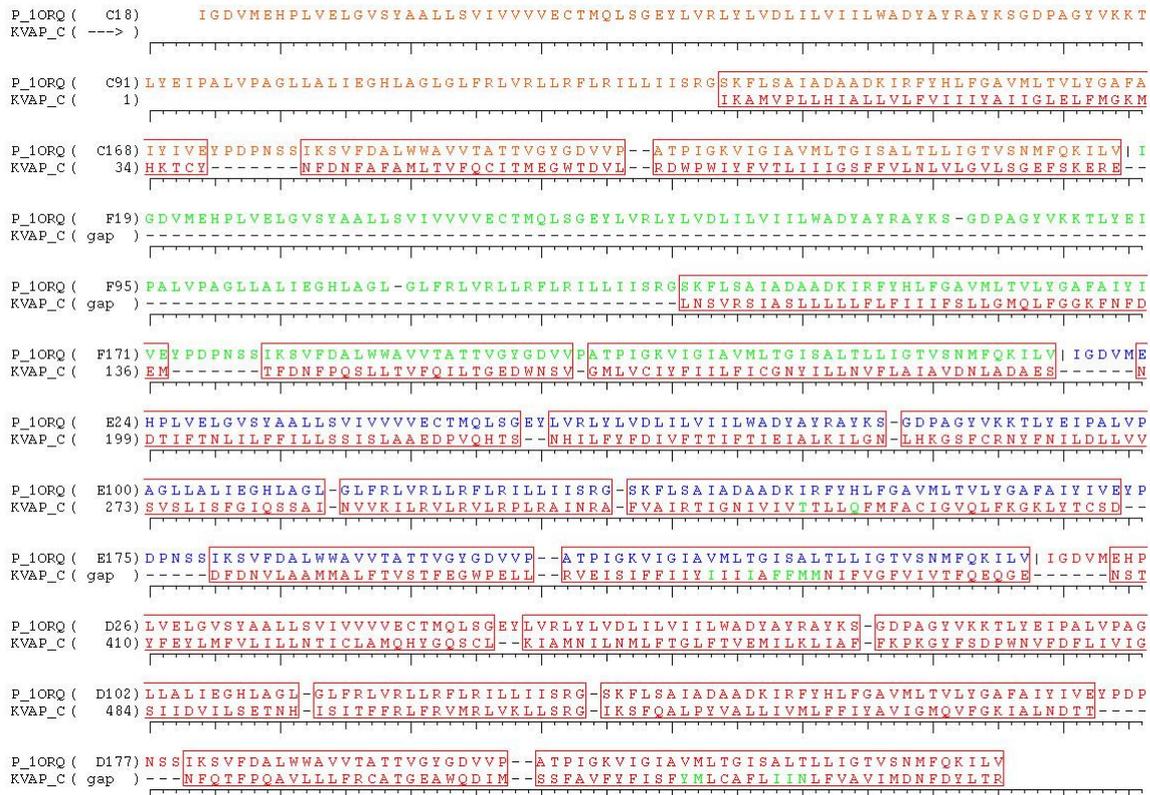


Abbildung 4.9: Alignment von KvAP (P_1ORQ) mit den Segmentsequenzen von Q13936 (KvAP_C), Repeat I ist orange, II grün, III blau, IV rot dargestellt. In Repeat I sind die Segmente IS5, P-Loop, IS6, in Repeat II ebenfalls IS5, P-Loop, IS6, in den Repeats III und IV alle Segmente ins Alignment einbezogen worden. Das entspricht der gesamten Pore, der Bindungsstelle und allen Helices in Repeats III und IV. Die grün dargestellten Aminosäuren in Sequenz KvAP_C sind die an der DHP-Bindung beteiligten Aminosäuren.

Zur Anpassung des Modells hat man mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann man unter Beibehaltung des Alignments die Koordinaten des Templates durch Drehen der Helix um die Helix-Achse verändern. Auch ist es möglich, eine andere Grundlage für das Alignment zu wählen, z.B. die Sequenzen der DNA-Basen der Proteine (s. Abschnitt 4.4.1). Schließlich besteht die Möglichkeit, Sequenzen manuell gegeneinander zu verschieben.

Die erste Variante ist problematisch, da sie nur bei idealen Helices anwendbar ist und eine Veränderung der Vorlage die Unsicherheit erhöht. K⁺-Kanäle zeigen keine idealen, gestreckten Helices. Sie sind vielmehr umeinander gewunden. Eine Drehung der Helix führt zu einer drastischen und nicht vertretbaren Veränderung der Struktur. Abbildung 4.10 zeigt den Effekt des

Drehens einer Helix um ihre Achse. Die in sich gebogene Helix trennt sich durch die Drehung um 180° vom Bündel. Auch bei geringerer Drehung ist dies bereits zu sehen. Diese Veränderung ist also nicht vorteilhaft, da sie zwar die Orientierung der Aminosäuren zur Bindungsstelle herbeiführen kann, diese aber zu weit entfernt, um mit den Liganden Wechselwirkungen einzugehen.

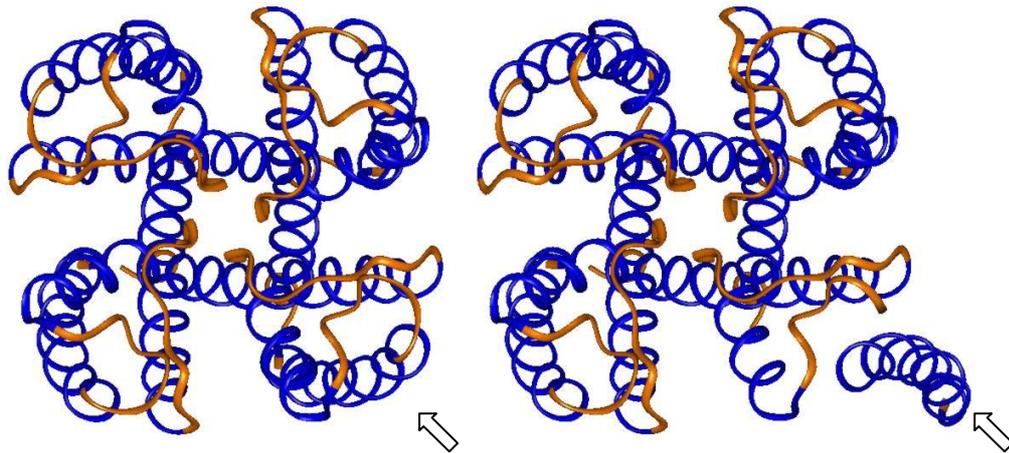


Abbildung 4.10: Effekt des Drehens einer Helix um 180° (Pfeil) am Beispiel von KcsA

4.4.1 Gen-Alignment

Punktmutationen des Genoms können einen wichtigen Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz und damit auf die Eigenschaften eines Proteins nehmen. Ändert sich die Aminosäure-Sequenz, verändern sich die physikochemischen Eigenschaften des Proteins. Wie in Abschnitt 3.1.2.2 ausgeführt, kann die Mutation einer DNA-Base zur Expressierung einer Aminosäure mit anderen physikochemischen Eigenschaften als denen der ursprünglichen Aminosäure führen. Während bei der DNA nur die Basen-Identität betrachtet wird, werden die physikochemischen Eigenschaften natürlich auch, neben der Aminosäure-Identität, bei der Beurteilung der Protein-Homologie berücksichtigt. Es ist also möglich, dass die zu Aminosäure-Sequenzen geringer Homologie gehörenden Gen-Sequenzen bzgl. ihrer Codons eine höhere Homologie aufweisen. Zwei Drittel der Sequenz stimmen überein, auch wenn unterschiedliche Aminosäuren durch das Codon und seine Mutation exprimiert werden.

In Abbildung 4.12 ist ein Vergleich von vier Modellen dargestellt. Die linke Seite zeigt die auf KcsA beruhenden Modelle KcsA-C und KcsA-G. Auf der rechten Seite sind die auf MthK beruhenden Modelle MthK-C und MthK-G zu sehen. Das blaue Band repräsentiert das Proteinrückgrat. Die DHP-sensitiven Aminosäuren sind in rot dargestellt, wenn ihre Position sich aus dem Gen-Alignment ergibt. Die Position der gelben Aminosäuren beruht auf dem ClustalW-MSA der Protein-Sequenzen.

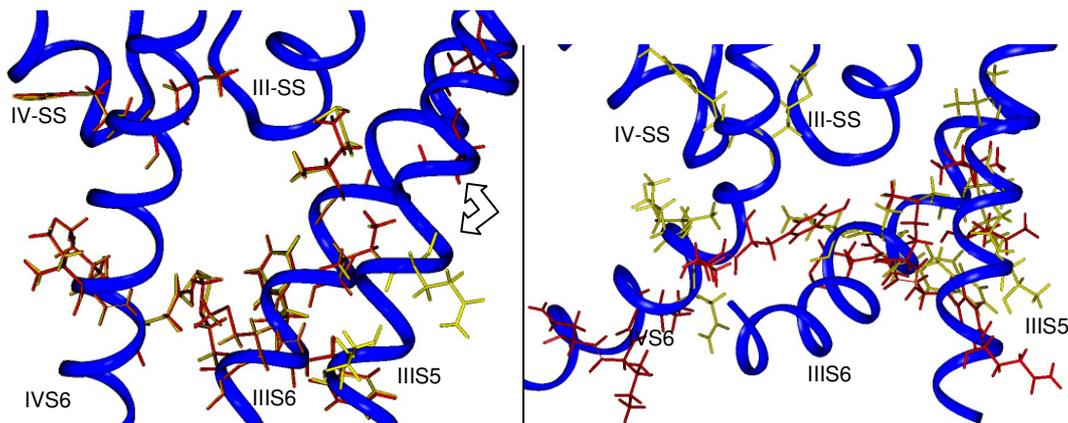


Abbildung 4.12: Überlagerung der Strukturen erhalten nach dem MSA der Gen- (rot) und der Aminosäure-Sequenz (gelb)
 Links: Modell KcsA-G überlagert mit KcsA-C
 Rechts: Modell MthK-G überlagert mit MthK-C

Im Modell KcsA-G des geschlossenen Kanals (Abbildung 4.12 links) ergeben sich kaum Änderungen zum Modell KcsA-C. Helices IIIS6 und IVS6 ergeben das gleiche strukturelle Alignment, die Aminosäuren sind überlagert. Allein Helix IIIS5 zeigt einen Unterschied. Hier ist die Sequenz des Gen-Alignments 2,5 Windungen gen N-Terminus verschoben (Doppelpfeil). Aber auch in dieser Geometrie kann nicht erklärt werden, wie Q1066 eine Wasserstoffbrücke zum Liganden ausbildet oder eine Substitution von T1060 den Liganden aus der Bindungsstelle verdrängen kann. Im Modell MthK-G des offenen Kanals (im Bild rechts) sind zwischen beiden Methoden größere Unterschiede zu sehen. Im Gen-Alignment sind zwar mehr der beteiligten Aminosäuren zur Bindungsstelle orientiert, sie sind jedoch in ihrer Lage relativ zueinander zu weit voneinander entfernt, als dass eine gemeinsame Interaktion mit dem Liganden möglich wäre. Durch das Alignment ergibt sich auch eine Anordnung von Helix IIIS5, in der

T1056 nicht mehr zum TM-Bereich gehört. Da diese Aminosäure Einfluss auf die Bindung nimmt, kann ein Modell, das sie nicht berücksichtigt, nicht als vernünftig angesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Alignment der Gen-Sequenzen das MSA der Aminosäuren unterstützt. KcsA-C und KcsA-G zeigen nur geringe Unterschiede. MthK-C und MthK-G zeigen Unterschiede im Bereich von ein bis zwei Aminosäuren. Segment IIS5 ist in Vergleichen der offenen und der geschlossenen Konformation das Segment, das die größten Differenzen aufweist.

Beide Alignment-Methoden zeigen, dass Homologie-Methoden zwar ein Modell liefern können. Im Fall von Ca^{2+} -Kanälen müssen diese Modelle aber modifiziert werden, um die experimentell gefundenen Interaktionen mit DHPs wiedergeben zu können.

4.4.2 Modelle auf der Grundlage der Kristallstruktur des K^+ -Kanals KvAP

Da das strukturelle Alignment nach ClustalW keine sinnvolle Bindungsstelle liefert, wird das Alignment geändert.

Dabei muss entschieden werden, in welchem Rahmen das geschehen darf und welche Veränderungen sinnvoll sind. Um zu prüfen, ob Interaktionen möglich sind, können die Orientierung und die Abstände subjektiv betrachtet werden. Besser ist es jedoch ein objektives Kriterium zu verwenden. Docking-Programme, die Liganden nach ihren Eigenschaften in die Bindungstasche einbringen, können hier helfen.

Im Vergleich der offenen und geschlossenen Konformation des Ca^{2+} -Kanals (vgl. Abschnitt 4.4.6) diente das Programm AutoDock zum Abschätzen der Position und Lage des Liganden. Im Fokus standen der Platzbedarf und das Platzangebot des Liganden.

Näher untersucht werden sollen die Interaktionsmöglichkeiten der Liganden mit verschiedenen Aminosäuren. Außerdem fungieren die Docking-Ergebnisse als Ideengenerator für mögliche Startkonformationen einer Moleküldynamik-

simulation. Abbildung 4.13 gibt einen schematischen Überblick über die Vorgehensweise.

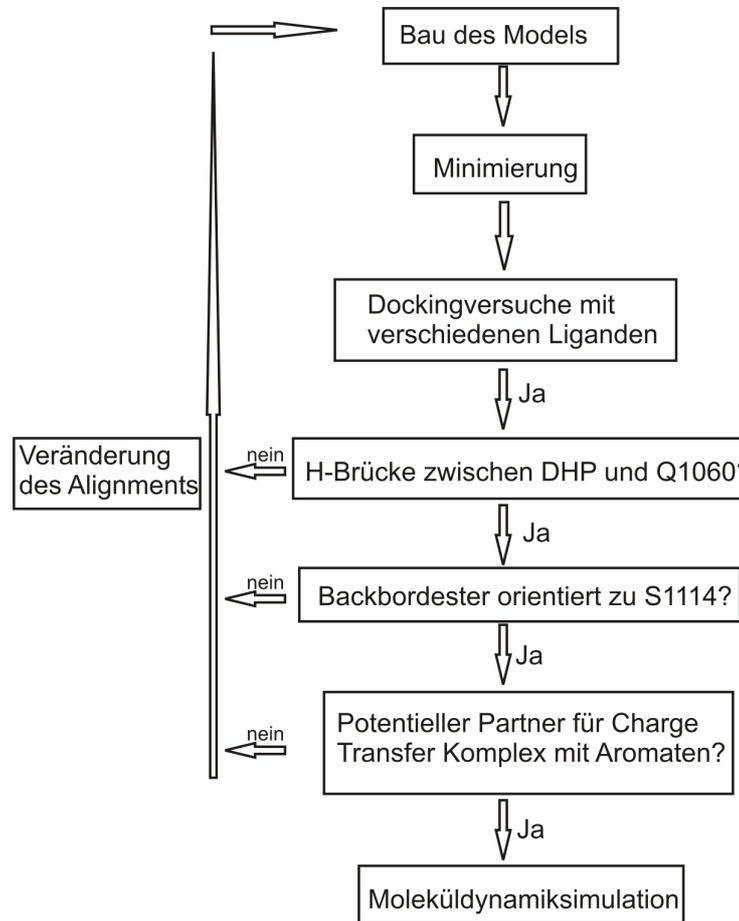


Abbildung 4.13: Vorgehensweise und Kriterien zur Überarbeitung des Modells

Durch das manuelle Verschieben der Sequenzen gegeneinander, werden die DHP-aktiven Aminosäuren zur Bindungsstelle ausgerichtet. Man erhält das Modell KvAP-A₁ (A₁=Alternative 1) mit dem in Abbildung 4.14 dargestellten Alignment. Beim Verschieben der Sequenzen muss darauf geachtet werden, dass die Seitenketten der wichtigen Aminosäuren die Möglichkeit bekommen, mit dem Liganden zu interagieren. Zusätzlich zum strukturellen Templat der Kristallstruktur des K⁺-Kanals wird also der Ligand als Templat für Interaktionen eingesetzt (→KvAP-A₁). Für das Docking wurde in diesen Modellen das Programm FlexX benutzt. Es ist, wie Abschnitt 3.3.2 erläutert, besser geeignet als AutoDock, um Interaktionen auszuwerten.

```

P_1ORQ ( F177) NSSIKSVFDALWVA VVTATTVGYGDVVPATPIGKVGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV|IGDVM EHP LVEL
KVAPA1 ( ----> )
P_1ORQ ( E30) GVSYAALLSVIVVVVECTMQLSGEYLVRLYLVDLILV IILWADYAYRAYKS--GDPAGYVKKTLYEIPALVPAGLLAL
KVAPA1 ( 228)  NHHLYFDIVFTTI FTIEIALKILGN?-----
P_1ORQ ( E106) IEGHLAGL-GLFRLVRLRLRFLRILLIISRG-SKFLSAIADAADKIRFYHLFGAVMLTVLYGAFAYIVE---YDPDN
KVAPA1 ( gap )  ?CVFVAIRTIGNIVIVTLLQPMFACIGVQLFRGKLYTC-----
P_1ORQ ( E178) SSIKSVFDALWVA VVTATTVGYGDVVP--ATPIGKVGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV|----IGDVM EHP
KVAPA1 ( gap )  --DFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELL--HTEDKGPINVRVEISIFFIIVIIIIA FFMNIFVG-----NS
P_1ORQ ( D25) PLVELGVSYAALLSVIVVVVECTMQLSGEYLVRLYLVDLILV IILWADYAYRAYKS--GDPAGYVKKTLYEIPALVPA
KVAPA1 ( 409)  TYFEYLMFVLLILLNTICLAMQH YGQSCL-----
P_1ORQ ( D101) GLLALIEGHLAGL-GLFRLVRLRLRFLRILLIISRG-SKFLSAIADAADKIRFYHLFGAVMLTVLYGAFAYIVE---
KVAPA1 ( gap )  --IKSFQALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDTT-----
P_1ORQ ( D173) YDPDNSSIKSVFDALWVA VVTATTVGYGDVVP--ATPIGKVGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV
KVAPA1 ( gap )  --NFQTFPQAVLLLRFCATGEAWQDIM--FAVVFYFISFYMLCAFLIINL FVAVIMDNFDYLTRDW?|?|?|

```

Abbildung 4.14: Alignment von KvAP (P_01RQ) und Q13936 (KvAP-A1), dieses Alignment liefert das Ca²⁺-Modell KvAP-A₁ (Abbildung 4.17), grün: die mit DHPs interagierenden Aminosäuren

Da das aus diesem Alignment resultierende Modell bei den Dockingversuchen zeigt, dass die Interaktion mit IIS6 nicht optimal ist, wurde in diesem Segment eine weitere Änderung durchgeführt. Die Verschiebung von IIS6 um drei Aminosäuren gen N-Terminus bringt M1177 dichter an den Liganden (Modell KvAP-A₂).

```

P_1OPQ ( F178) SSIKSVFDALWVA VVTATTVGYGDVVPATPIGKVGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV|IGDVM EHP LVEL
KVAPA1 ( ----> )
KVAPA2 ( ----> )
P_1OPQ ( E31) VSYAALLSVIVVVVECTMQLSGEYLVRLYLVDLILV IILWADYAYRAYKS--GDPAGYVKKTLYEIPALVPAGLLALI
KVAPA1 ( 228)  NHHLYFDIVFTTI FTIEIALKILGN?-----
KVAPA2 ( 1)  NHHLYFDIVFTTI FTIEIALKILGN-----
P_1OPQ ( E107) EGHLAGL-GLFRLVRLRLRFLRILLIISRG-SKFLSAIADAADKIRFYHLFGAVMLTVLYGAFAYIVE---YDPDN
KVAPA1 ( gap )  -----
KVAPA2 ( gap )  -----
P_1OPQ ( E179) SIKSVFDALWVA VVTATTVGYGDVVP--ATPIGKVGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV|----IGDVM EHP
KVAPA1 ( gap )  --DFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELL--HTEDKGPINVRVEISIFFIIVIIIIA FFMNIFVG-----NST
KVAPA2 ( gap )  --DFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELL--DKGPIYNRVEISIFFIIVIIIIA FFMNIFVGFV-----NST
P_1OPQ ( D26) LVELGVSYAALLSVIVVVVECTMQLSGEYLVRLYLVDLILV IILWADYAYRAYKS--GDPAGYVKKTLYEIPALVPAG
KVAPA1 ( 410)  YFEYLMFVLLILLNTICLAMQH YGQSCL-----
KVAPA2 ( 129)  YFEYLMFVLLILLNTICLAMQH YGQSCL-----
P_1OPQ ( D102) LLALIEGHLAGL-GLFRLVRLRLRFLRILLIISRG-SKFLSAIADAADKIRFYHLFGAVMLTVLYGAFAYIVE---Y
KVAPA1 ( gap )  -----
KVAPA2 ( gap )  -----
P_1OPQ ( D174) PDPNSSIKSVFDALWVA VVTATTVGYGDVVP--ATPIGKVGIAVMLTGISALTLLIGTVSNMFQKILV
KVAPA1 ( gap )  --NFQTFPQAVLLLRFCATGEAWQDIM--FAVVFYFISFYMLCAFLIINL FVAVIMDNFDYLTRDW?|?|?|
KVAPA2 ( gap )  --NFQTFPQAVLLLRFCATGEAWQDIM--FAVVFYFISFYMLCAFLIINL FVAVIMDNFDYLTRDW

```

Abbildung 4.15: Änderung des Alignments von KvAP-A₁ nach KvAP-A₂ durch Verschieben von IIS6 um 3 Aminosäuren gen N-Terminus (Pfeil)

4.4.3 Docken der Liganden

Das manuelle Verschieben der Sequenz ergibt die in Abbildung 4.17 dargestellte räumliche Anordnung (Modell KvAP-A₁).

Für das aktive Zentrum als Ziel des Dockings wurden alle 14 Aminosäuren der Bindungsstelle ausgewählt. Vor dem Docken der Liganden wurde das Modell - mit einem Liganden - vorbereitend erst mit Steepest Descent, dann mit Conjugate Gradients im Programm FDiscover [1] voroptimiert, um ungünstige Kontakte zu beseitigen. Durch das Docken in eine minimierte Struktur kann schnell abgeschätzt werden, welche Kontakte möglich sind und welche bei größerer Flexibilität des Proteins während einer Moleküldynamiksimulation entstehen können.

Wird das unbesetzte Protein minimiert und dann die Liganden eingedockt, so nehmen Seitenketten der Aminosäuren häufig den Raum in der Bindungsstelle ein. Es ist dann schwieriger für das Docking-Programm, Platz für den Liganden zu finden. In der Folge findet man keine sinnvollen Ergebnisse. Dieses Problem könnte umgangen werden, wenn Docking-Programme das Zielprotein flexibel betrachten würden und die Bindungsstelle dem Liganden anpassen würden. Die derzeitigen Programme berücksichtigen jedoch nur den Liganden als flexibel. Dies soll sich mit dem Programm FlexE, welches sich in der Entwicklung befindet, ändern. Es stand für diese Arbeit jedoch noch nicht zur Verfügung.

Es hat sich im Verlauf dieser Arbeit als vorteilhaft herausgestellt, das Protein vor dem Docken mit einem Liganden (hier: S-Isradipin) zu minimieren. Der Ligand liegt dabei so, dass die NH-Funktion zu Q1060 orientiert ist. Nach der Minimierung wird der Ligand entfernt und der Ligandensatz in die nun leere Bindungstasche gedockt. Mit dieser Vorgehensweise werden sinnvolle Dockingergebnisse gefunden.

Für die Docking-Versuche an den Ca²⁺-Kanal-Modellen KvAP-A₁ und KvAP-A₂ wurde zusätzlich die Filterfunktion des „Pharm“-Moduls von FlexX verwendet.

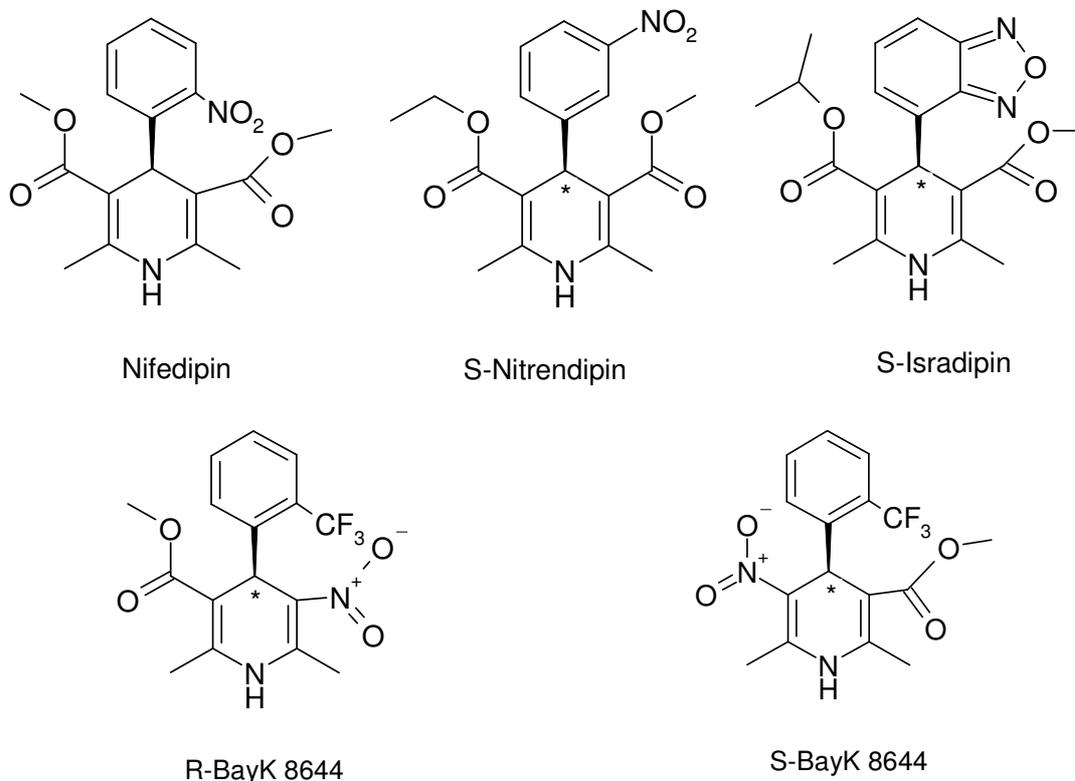


Abbildung 4.16: Zum Docking benutzte Liganden:

Antagonisten: Nifedipin, S-Nitrendipin, S-Isradipin, R-BayK8644

Agonist: S-BayK8644

Als Liganden wurden S-Isradipin als wirksamste Verbindung, Nifedipin und S-Nitrendipin als Vertreter eines nicht chiralen und eines chiralen DHPs sowie das Agonist/Antagonisten-Paar S- und R-BayK8644 gewählt (s. Abbildung 4.16).

Abbildung 4.17 zeigt die Überlagerung der besten Docking-Ergebnisse für das Modell KvAP-A₁, Abbildung 4.18 für das Modell KvAP-A₂.

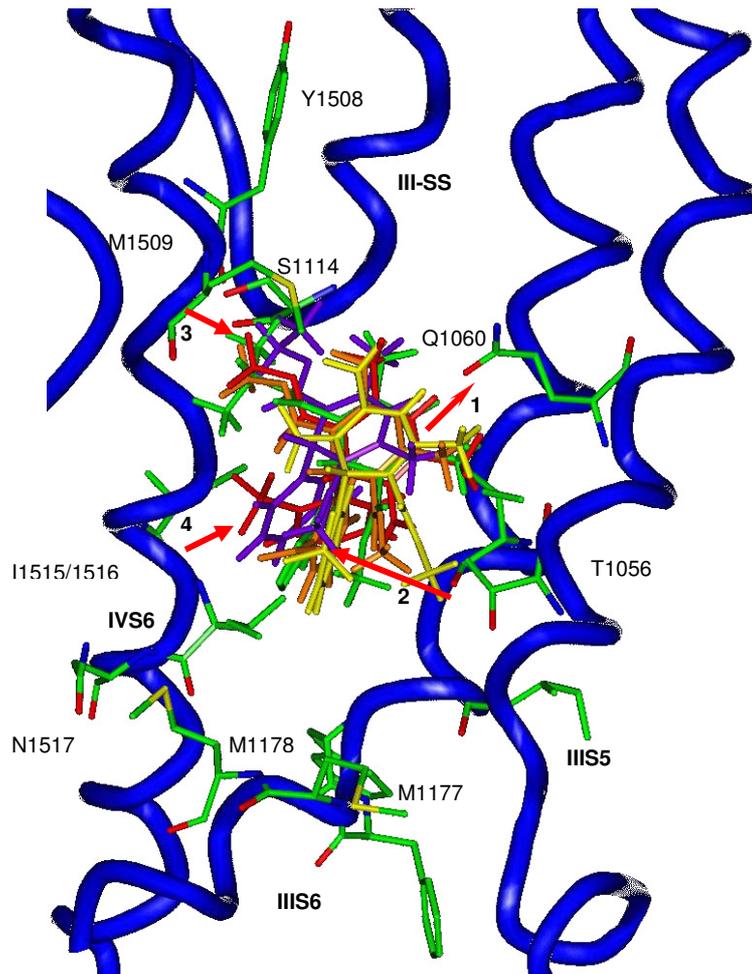


Abbildung 4.17: Bindungsstelle des Modells KvAP-A₁ mit gedockten DHPs (FlexX)

Das Protein-Rückgrat wird als blaues Band (*ribbon*) dargestellt, für die Aminosäuren gilt: Sauerstoffatome sind rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb, Kohlenstoff grün. Für weitere Erklärungen, s. Text.

Im Modell KvAP-A₁ wird die Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Funktion des DHP-Ringes und Q1060 (Pfeil 1 in Abbildung 4.17) von FlexX bevorzugt gefunden. Auch T1056 wird als potentieller Partner für eine Wasserstoffbrücke zum Ester der Steuerbordseite gefunden (Pfeil 2), während der Backbordester in S1114 (Pfeil 3) einen möglichen Wasserstoffbrücken-Donator findet. T1056 ist in einer Position, in der eine Mutation zu Tyrosin oder Phenylalanin durch ihre voluminösen Seitenketten die DHPs verdrängen. Der Aryl-Rest der DHPs könnte in van-der-Waals-Wechselwirkungen mit I1515 oder I1516 treten (Pfeil 4). Allerdings steht kein geeigneter Partner für einen Charge-Transfer-

Effekt zur Verfügung. M1177 und M1178 sind zu weit von dem Liganden entfernt.

Wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben wird die IIS6-Helix um 3-4 AS, also eine Helixwindung gegen C-Terminus verschoben. Die bereits gefundenen Interaktionsmöglichkeiten bleiben bestehen und durch den geringeren Abstand wird eine zusätzliche Interaktionsmöglichkeit zwischen einem der Methionine und dem DHP geschaffen. Es musste bei der Erstellung des Modells entschieden werden, ob M1177 oder M1178 die Aufgabe des Charge-Transfer-Partners zugewiesen werden sollte. Die Entscheidung fiel auf M1177, da hierdurch I1170 und I1173 eine Position erhielten, die eine Orientierung zum Liganden zulässt. Das Verschieben um drei Aminosäuren ist ausreichend, M1177 befindet sich dann in ausreichender Nähe und Orientierung (→Modell KvAP-A₂, Abbildung 4.18).

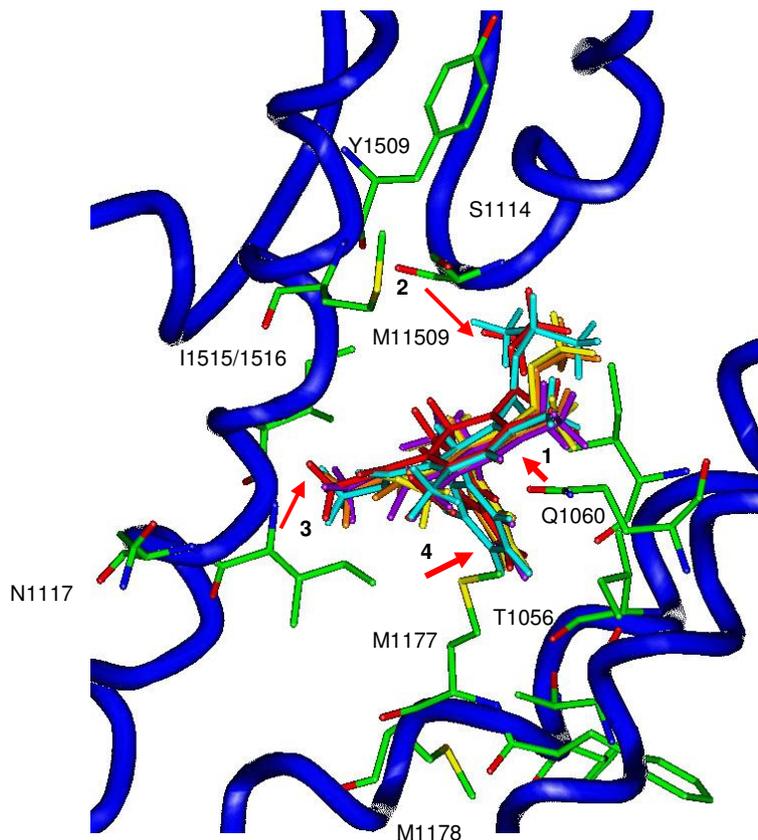


Abbildung 4.18: Modell KvAP-A₂ mit gedockten DHPs

Abbildung 4.18 zeigt das Docking-Ergebnis. Ein leichter Unterschied in der Lage der Liganden ergibt sich durch den etwas geringer gewordenen Platz. Alle

für KvAP-A₁ beschriebenen Interaktionen können in KvAP-A₂ wieder gefunden werden. Die Wasserstoffbrücke der DHP-NH-Funktion zu Q1060 ist vorhanden (Pfeil 1 in Abbildung 4.18). Der Backbordester ist in Richtung S1114 orientiert (Pfeil 2). Außerdem erkennt das Programm van-der-Waals-Wechselwirkungen der Steuerbordester-Methylgruppe mit I1516 (Pfeil 3), sowie eine Interaktion des Aromaten mit M1177 (Pfeil 4). In diesem Modell werden Interaktionen der Liganden mit den drei beteiligten Helices gefunden. Essentielle Interaktionen mit bestimmten Aminosäuren werden durch das Programm erkannt bzw. sind durch die räumliche Orientierung der Liganden in der statischen Bindungstasche möglich.

4.4.4 Vergleich mit dem vorliegenden Pharmakophor

Der Pharmakophor einer Arzneistoff-Gruppe macht Aussagen über die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppen [11]. Sind die interagierenden Aminosäuren aus experimentellen Untersuchungen (z.B. Mutationsexperimenten) bekannt, jedoch nicht die Struktur des Rezeptors, so ist es sinnvoll, die Eigenschaften des Pharmakophors mit Hilfe der identifizierten Aminosäuren als Pseudorezeptor darzustellen. Ein durch Homologie-Modellierung entwickeltes Rezeptor-Modell sollte demnach Ähnlichkeit mit dem Pseudorezeptor aufweisen.

Im Pseudorezeptor nach Schleifer [75] werden zwei Zustände der Bindungsstelle diskutiert, der offene/inaktive und der Ruhezustand. In beiden Zuständen liegt der aromatische DHP-Substituent in einer Tasche, die aus zwei Tyrosinen und einem Phenylalanin gebildet wird, außerdem hat er Kontakt zu einem Methionin. Aus Experimenten weiß man außerdem, dass DHPs mit Elektronen-ziehenden Substituenten am Aromaten eine höhere Affinität aufweisen als unsubstituierte. Daher wird die Möglichkeit eines Charge-Transfer-Effektes diskutiert, bei dem Elektronen auf das DHP übertragen werden. Als geeigneter Partner kann die Aminosäure Methionin fungieren. Auch andere elektronenreiche Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin) wären denkbar. Eine andere wichtige Struktur-Wirkungsbeziehung betrifft die

NH-Funktion am N1 des Dihydropyridinrings. Ersetzt man den Wasserstoff am Stickstoff z.B. durch eine Methylgruppe, so ist keine Wirkung mehr messbar. Die Fähigkeit zur Bildung einer Wasserstoffbrücke ist also an dieser Stelle essentiell. Eine passende Aminosäure als Akzeptor wäre z.B. das Glutamin, dessen Carbonyl-Gruppe eine Wasserstoffbrücke akzeptieren kann. Am Steuerbordester findet man ein Threonin, welches eine Wasserstoffbrücke zur Estergruppe ausbildet. Nach oben abgeschlossen wird der Pseudorezeptor durch ein Tyrosin, welches parallel zum Dihydropyridinring angeordnet ist (Abbildung 4.19).

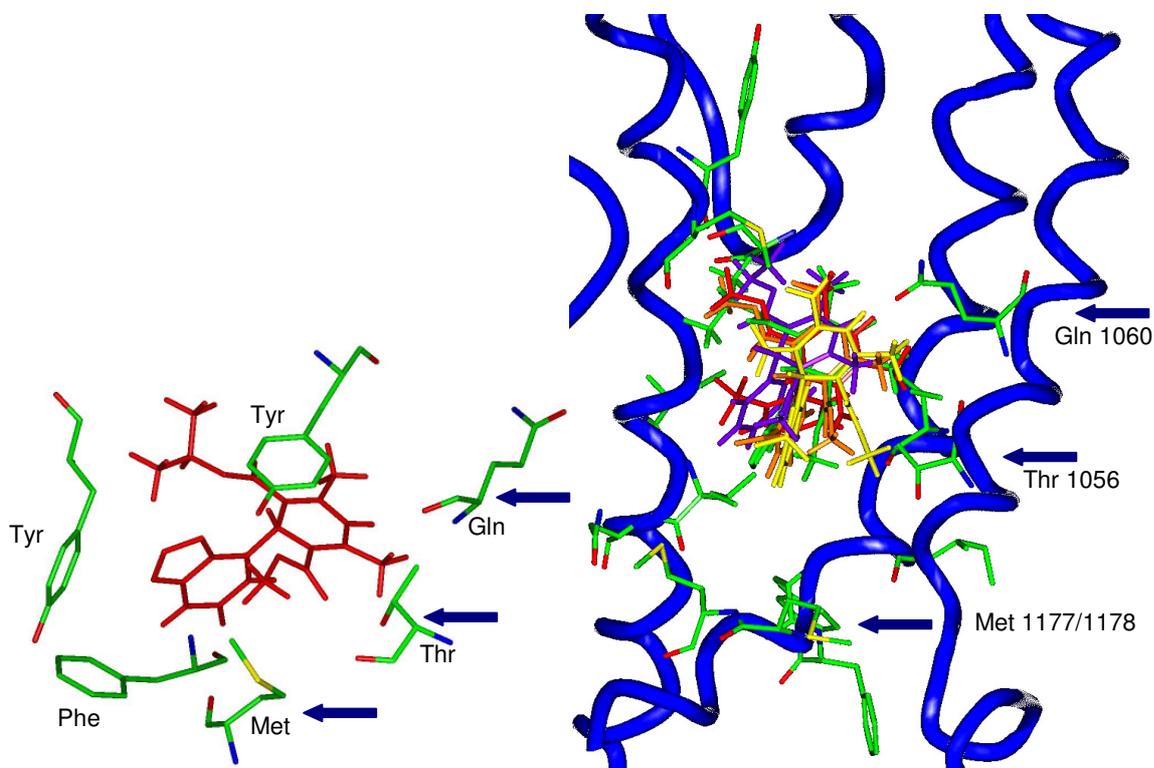


Abbildung 4.19: Pseudorezeptor-Modell [75] mit S-Isradipin (rot) im Vergleich mit KvAP-A₁

Der Unterschied zwischen Ruhe- und offenem/inaktivem Zustand im Modell nach Schleifer besteht in der zusätzlichen Beteiligung eines Threonins, welches mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Backbordesters eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen kann. Zu beachten ist, dass in dem hier dargestellten Pseudorezeptormodell die Carbonyl-Gruppe des Proteinrückgrates für die Wasserstoffbrücke zur Verfügung steht, während in KvAP-A₁ und KvAP-A₂ die Amid-Funktion der Seitenkette diese Funktion erfüllt. Generell muss

berücksichtigt werden, dass für den Pseudorezeptor nur die vorhandene Funktionalität wichtig ist, also die Fähigkeit der Wasserstoffbrückenbildung. Dies kann bei einem Glutamin sowohl über die Seitenkette als auch das über Proteinrückgrat geschehen. Die Experimente zeigen, dass die DHPs nicht mit dem Proteinrückgrat, sondern mit der Seitenkette interagieren.

Im Homologie-Rezeptor-Modell sollten an vergleichbaren Positionen entsprechende Aminosäuren oder solche mit ähnlichen, funktionellen Eigenschaften gefunden werden.

Der Vergleich des Pseudorezeptors mit KvAP-A₁ (Abbildung 4.19) zeigt, dass sich Q1060 in passender Position befindet, um als Wasserstoffbrücken-Akzeptor agieren zu können. T1056 ist ebenso in der Lage, die im Pseudorezeptor vorgesehene Interaktion mit dem Steuerbordester einzugehen. Allerdings können die Methionine aus Helix IIIS6 keine Interaktion mit dem aromatischen Rest eingehen, M1178 ist zwar zum Aromaten hin orientiert, aber zu weit entfernt, um den postulierten Charge-Transfer zu ermöglichen. An der Backbordseite findet sich kein Threonin, dafür S1114 im III-SS, welches eine homologe Aminosäure mit vergleichbaren Eigenschaften ist. Oberhalb des Dihydropyridinrings ist Y1509, das zunächst keine parallele Lage einnimmt. Dies könnte während einer MDS mit flexiblen Seitenketten in Rahmen eines *induced fit* jedoch geschehen.

Im Modell KvAP-A₂ (Abbildung 4.18 und Abbildung 4.20) bleiben fast alle für KvAP-A₁ beschriebenen Wechselwirkungs-Möglichkeiten erhalten. Q1060, Y1509 und S1114 bleiben an ihren Positionen. M1177 nimmt eine Position ein, die es erlaubt, mit dem Aromaten in Charge-Transfer-Interaktionen einzutreten. Es befindet sich zwischen T1056 und dem Liganden. T1056 kann nicht mehr als Wasserstoffbrücken-Donor agieren. Experimentell ist allerdings inzwischen gesichert, dass T1056 keine direkte Interaktion mit den DHPs eingeht [40]. Wird es jedoch durch große, raumfüllende Aminosäuren wie Tyrosin ersetzt, kommt es zu einem Wirkverlust der DHPs. Es kann sich hierbei nicht um den Verlust eines Wasserstoffbrücken-Donors handeln, diese Funktion könnte das Tyrosin erfüllen. Offensichtlich verdrängt der voluminöse Substituent den Liganden aus

der Bindungstasche. Dies kann im Modell nachvollzogen werden, denn die Tyrosin-Seitenkette zwingt die Methionin-Seitenkette in eine andere Position und lässt weniger Platz in der Bindungstasche (Abbildung 4.20).

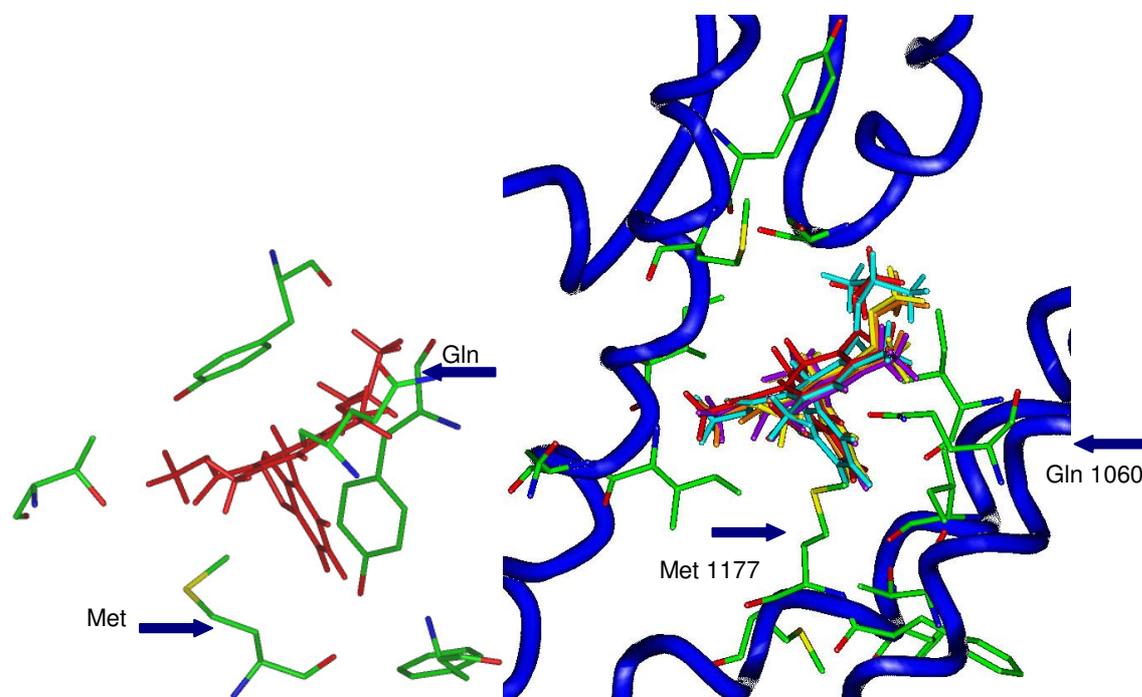


Abbildung 4.20: Vergleich des Pseudorezeptors mit KvAP-A₂

Es ist zu bedenken, dass in dem Liganden-basierten Pharmakophor und deshalb auch in den Pseudorezeptor keine Informationen über die wirkliche Struktur des Rezeptors eingehen. Ein Pseudorezeptor repräsentiert ein optimiertes Interaktionsmuster, das nicht direkt auf ein Rezeptor-basiertes Modell übertragen werden kann. Doch ist eine Superpositionierung des Pseudorezeptors mit dem entwickelten Rezeptor-Modell für Q1060, S1114 und M1177 möglich.

4.4.5 Docken eines DHPs mit größerem Rest auf der Backbordseite

Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen zeigen, dass die C2- und C6-Methylgruppen des Dihydropyridinrings Ausgangspunkte für eine molekulare Erweiterung sind (s. Abschnitt 1.5.2). Als Vertreter eines solchen

„erweiterten“ DHPs wurde S-Amlodipin (Norvasc[®]) in die Bindungstasche gedockt, um zu prüfen, ob der erhöhte Raumbedarf mit dem Rezeptor-Modell vereinbar ist. S-Amlodipin ist auf der Backbordseite mit einer Aminoethoxygruppe und einem Propylester erweitert. Es ist eine schwache Base ($pK_S=8,6$). Bei physiologischem pH-Wert liegt die Aminogruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit protoniert vor. Untersuchungen an DHPs mit quaternären, also dauerhaft geladenen, Stickstoffen haben gezeigt, dass eine geladene Gruppe nicht in die Membran eindringen kann [5]. Daher wurde die unprotonierte Form für das Docking verwendet.

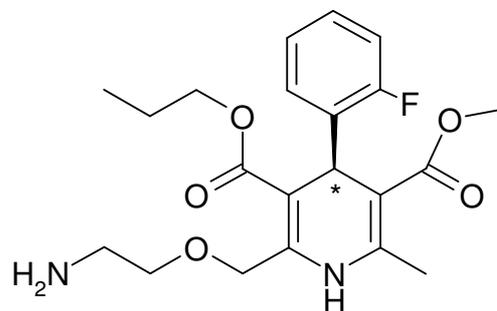


Abbildung 4.21: S-Amlodipin

Auch dieses sterisch aufwändige DHP wird von FlexX an der gleichen Stelle wie die anderen DHPs positioniert. Die Aminogruppe geht sogar eine zusätzliche Interaktion in Form einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrates von Q1060 ein. Abbildung 4.22 zeigt die Lage des gedockten S-Amlodipins im Vergleich zur Position des S-Isradipins. Auch in diesem Punkt ist das Modell also mit dem Pharmakophor kongruent.

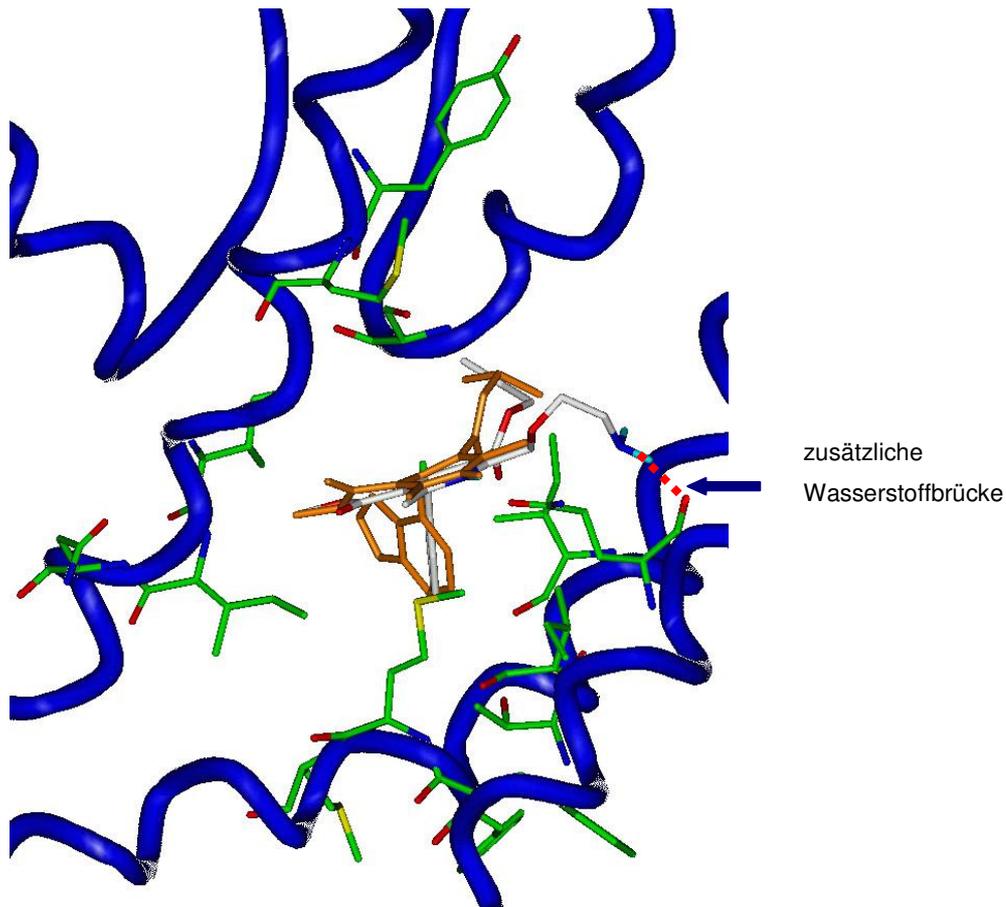


Abbildung 4.22: Docking von S-Amlodipin (weiß=C, Cyan=H, Rot=O, Blau=N) in KvAP-A₂; zum Vergleich ist S-Isradipin (orange) dargestellt.

4.4.6 Vergleich von Modellen der DHP-Bindungsstelle am offenen und geschlossenen Kanal

Wie in Abschnitt 1.3.2 erläutert, unterscheiden sich die Template KcsA und MthK im Bereich der Pore beträchtlich, während das Selektivitätsfenster sehr ähnlich ist (Abbildung 4.23). Es ist bekannt, dass DHP-Antagonisten eine höhere Affinität zum aktivierten, d.h. offenen, Kanal haben.

Um diese Bevorzugung zu untersuchen, wurden Modelle nach den Templates KcsA (geschlossener Kanal) und MthK (offener Kanal) erstellt. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben, liefert das auf ClustalW beruhende MSA keine sinnvolle DHP-Bindungsstelle. Daher wurden die Sequenzen des jeweiligen Templates und von der Ca²⁺-Kanal-Sequenz Q13936 abweichend vom ClustalW-MSA

gegeneinander verschoben. Dies ist nötig, um die an der DHP-Bindung beteiligten Aminosäuren so auszurichten, dass eine Interaktion mit dem Liganden möglich ist. In die Modelle KcsA-A (A=Alternative) und MthK-A wurden verschiedene DHP-Liganden mittels des Programms AutoDock eingedockt.

Die Docking-Ergebnisse zeigen, dass es schwierig ist, Liganden in die geschlossene Konformation einzupassen. Betrachtet man die van-der-Waals-Oberfläche des Proteins, so kann man erkennen, dass die Liganden keinen Platz in der Bindungsstelle haben und unterschiedliche Geometrien einnehmen (Abbildung 4.24).

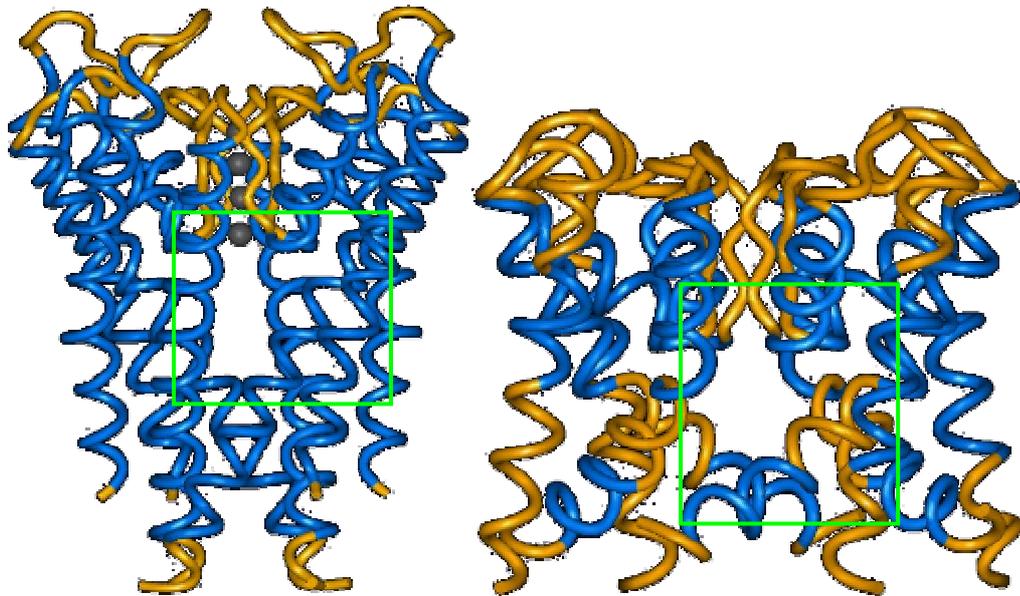


Abbildung 4.23: Offene Konformation von KcsA (Links) und MthK (rechts); die Markierung zeigt den Ausschnitt, der in Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25 dargestellt ist

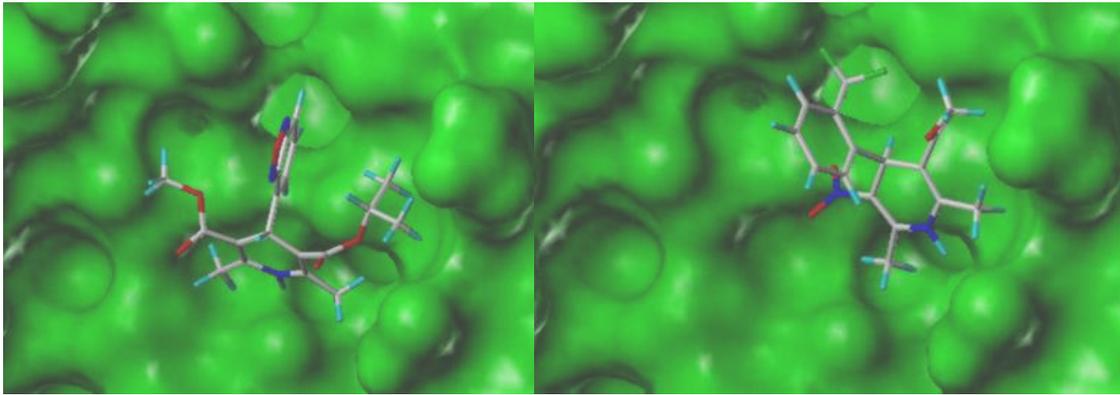


Abbildung 4.24: Unterschiedliche Docking-Ergebnisse von S-Isradipin (links) und S-BayK 8644 in KcsA-A

Im Modell der offenen Konformation zeigt die Oberfläche eine große, zweilappige Höhle, die DHPs aufnehmen kann. Alle Liganden werden beim Docken direkt überlagert. Allerdings werden zwei bevorzugte Positionen gefunden (Abbildung 4.25).

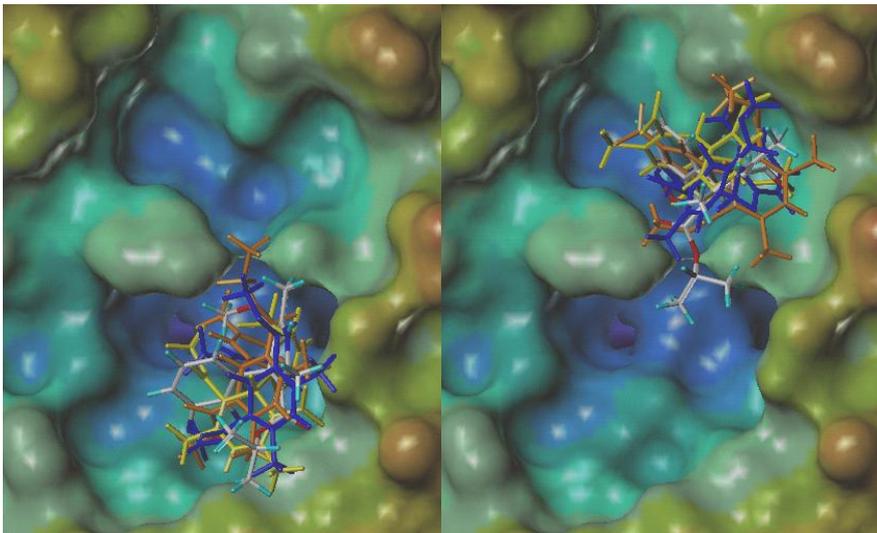


Abbildung 4.25: Docking-Ergebnisse (AutoDock) am offenen Ca^{2+} -Kanal beruhend auf dem Templat MthK. Es gibt zwei bevorzugte Positionierungen. Auf der Oberfläche ist das lipophile Potential dargestellt. Der tiefblaue Bereich stellt die hydrophile Pore dar.

Die obere, sich auf Höhe der III-SS-Region befindende Tasche (in Abbildung 4.25 rechts) ist energetisch bevorzugt. Die untere, auf Höhe der Kavität, zeigt jedoch einen Durchgang in Richtung Pore, der für DHPs mit verlängerter Seitenkette am Backbordester geeignet ist. Auch lässt sich diese

Bindungsstelle besser mit dem Pharmakophor nach Schleifer [75] (s. Abschnitt 1.5.1) überlagern.

Diese Ergebnisse zeigen, warum der offene Kanal-Modus bevorzugt wird. Der Platzbedarf der DHPs ist größer als der Raum, der in der geschlossenen Konformation zur Verfügung steht.

Aus anderen Arbeiten, die sich ausschließlich mit dem geschlossenen Ca^{2+} -Kanal beschäftigt haben, ist bekannt, dass der interhelikal zur Verfügung stehende Raum der geschlossenen Konformation für ein DHP sehr eng ist. Zhorov et al. [93] schlagen vor, dass die Bindungsstelle sich nicht zwischen den S5- und S6-Helices befindet, sondern im Bereich der wassergefüllten Kavität. Es wird ein Wirkmechanismus postuliert, bei dem die DHPs nicht in die Inaktivierung eingreifen, sondern den Kanal durch ihre räumliche Lage blockieren. Dies deckt sich jedoch nicht mit den experimentellen Daten. Lipkind et al. [54] lösen das Problem durch das Auseinanderziehen der Helices, sie weichen also drastisch von der Vorlage ab. Dem Liganden wird so Platz verschafft, doch für die Segmente der Repeats I und II ist die Interaktion untereinander erschwert. Beide Lösungen sind unbefriedigend. Wie oben gezeigt, lassen sich diese Probleme mit einem offenen Ca^{2+} -Kanal vermeiden.

4.5 Moleküldynamiksimulationen (MDS)

Obwohl alle im Pseudorezeptor beschriebenen Interaktionen zwischen den Liganden und den Aminosäuren des Pseudorezeptors im Prinzip möglich sind, liegen einige der Bindungspartner zu weit entfernt, als dass alle geforderten Interaktionen gleichzeitig eintreffen könnten. Dazu muss aber in Betracht gezogen werden, dass bei der Modellierung die Flexibilität des Proteins nicht berücksichtigt wurde. Nachdem durch die Dockingversuche die Güte des Modells abgeschätzt werden kann, ist es notwendig, das Verhalten von Ligand und Protein in einer MDS zu untersuchen. Hierzu wurde das optimierte Modell KvAP-A₂ mit den Protein-Rückgratkoordinaten der Helices IIIS2, IIIS5, IIIS6, IVS1, IVS5 und IVS6 sowie III-SS und IV-SS benutzt. Die Enden der Helices

werden in ihrer Position fixiert. Dadurch wird berücksichtigt, dass sich im realen Protein an dieser Stelle Loop-Bereiche und weitere TM-Helices anschließen, die die Beweglichkeit eingrenzen. Es erleichtert auch einen eventuellen Ausbau des Modells. Abbildung 4.26 zeigt das Modell mit dem Liganden S-Isradipin. Die Bindungsstelle wird durch IIIS6 und IVS6 sowie III-SS und IV-SS zur Pore abgegrenzt, nach unten und zur Seite durch IIIS5 und IVS5 und nach außen durch IIIS2 und IVS1.

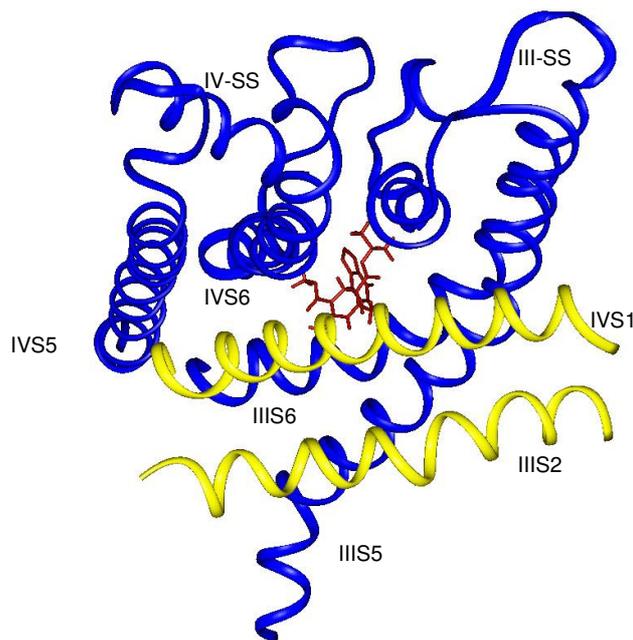


Abbildung 4.26: Die Helices der Bindungsstelle mit dem Liganden S-Isradipin in der Aufsicht; Helices IIIS2 und IVS1 sind gelb. Alle anderen Helices sind dunkelblau.

Bei Ca^{2+} -Kanälen handelt es sich um sehr große, in Membranen eingebettete Systeme, für die eine MDS des kompletten Proteins ein entsprechendes Quantum an Rechenkapazität benötigen würde. Da die Membran und die Repeats I und II keinen direkten Einfluss auf die DHP-Bindungsstelle haben, wurde in der MDS auf diese Strukturelemente verzichtet. Der stabilisierende Effekt der Membrenumgebung entfällt in diesem Falle allerdings ebenfalls, kann aber in der MDS durch ein sog. „*Tethering*“ ersetzt werden. Dabei wird auf die Atome des Rückgrates eine Rückhaltekraft gelegt, welche den Atomen ein gewisses Maß an Bewegungsfreiheit zubilligt, die Auflösung der Sekundärstruktur aber verhindert. Das Ausmaß der benötigten Rückhaltekraft wird mit einer „Loslassdynamik“ ermittelt. Hierbei wird zuerst eine sehr hohe

Kraftkonstante auf das Protein gelegt, welche schrittweise verringert wird. Am Verlauf des RMSD-Werts (root mean square deviation) kann die Stabilität der Sekundärstruktur verfolgt werden.

Zuerst wurden für die Kristallstrukturen von MthK und KcsA Loslassdynamiken bei 310K, d.h. Körpertemperatur, untersucht. Dabei zeigt sich, dass die offene Konformation der MthK-Kristallstruktur bei geringen Rückhaltekräften in eine Konformation ähnlich der geschlossenen von KcsA übergeht, bevor die Sekundärstrukturen gänzlich zerfallen. Es muss ein Kompromiss zwischen der Beweglichkeit des Modells und dem Erhalt der Sekundärstrukturen gefunden werden. Die Analyse der RMSD führt zur Festlegung einer Kraftkonstante von $300 \text{ kcal}/\text{Å}^2$ (Abbildung 4.27). Die Modelle KcsA-C, KcsA-G, MthK-C, MthK-G und KvAP-A₂ (zur Nomenklatur vgl. Anhang C) zeigen ein vergleichbares Verhalten. Durch die anfänglich hohe Kraftkonstante ist das Protein fixiert. Im Verlauf der Dynamiksimulation bewegt es sich mehr. Der RMSD-Wert von 0,6 ist im Diagramm mit einer Linie markiert, da ab hier der RMSD-Wert so stark ansteigt, dass das Protein nicht mehr als stabil angesehen werden kann (siehe auch [83]).

Nach diesen Vorarbeiten am Protein wurden die Liganden S-BayK 8644 bzw. S-Isradipin in die Bindungsstelle eingefügt, wobei die beim Docking erhaltene Konformation die Vorlage für die Startkonformation lieferte.

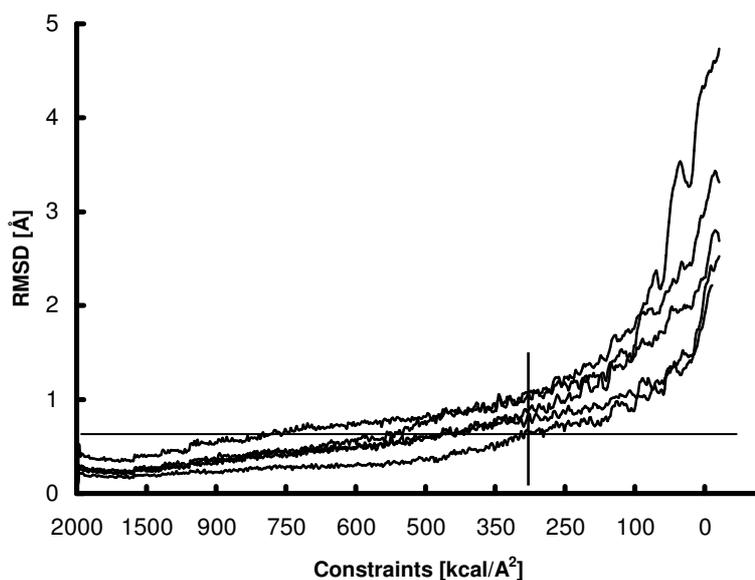


Abbildung 4.27: Verlauf der RMSD-Werte der Kristallstrukturen von KcsA, MthK, und der Modelle KcsA-C, KcsA-G, MthK-C, MthK-G und KvAP-A₂ in Abhängigkeit von der angelegten Kraftkonstanten

4.5.1 Moleküldynamiksimulationen des Agonisten

In der Literatur wird beschrieben, dass die Mutation des Serins S1114 im III-SS-Bereich Einfluss auf die Affinität von DHP-Agonisten zum L-Typ Ca²⁺-Kanal nimmt. Die Einführung eines Alanins an gleicher Position führt zum Verlust der agonistischen Wirkung. Wird dagegen eine Aminosäure mit Wasserstoffbrücken-Donorfunktion eingeführt, z.B. Threonin, führt dies nicht zum Wirkverlust. Um zu überprüfen, ob das erstellte Modell diese experimentellen Ergebnisse widerspiegeln kann, wurde der Agonist S-BayK 8644 in das jeweilige DHP-Bindungsstellen-Modell KvAP-A₂ eingebracht und eine Simulation über einen Zeitraum von 401ps bei 310K und einem Tethering von 300kcal/Å² durchgeführt. Die Nitro-Gruppe, welche in den DHP-Agonisten den Backbordester ersetzt, ist ein besserer Wasserstoffbrückenakzeptor als die sterisch gehinderte Carbonyl-Funktion des Esters. Diese muss nach den experimentellen Daten in cis-Konfiguration zur Doppelbindung der Dihydropyridinrings stehen. Damit zeigt sie von S1114 weg und steht nicht für eine

Wasserstoffbrücke zur Verfügung. Die Nitro-Gruppe besitzt zwei Sauerstoff-Atome, deren π -Elektronensystem delokalisiert ist. Ein Sauerstoffatom steht immer als Wasserstoffbrückenakzeptor zur Verfügung. Deshalb ist eigentlich zu erwarten, dass hier eine weitere Wasserstoffbrücke ausgebildet wird.

Die Simulation zeigt, dass das Modell nach 200 ps äquilibriert ist, die potentielle Energie verändert sich nicht mehr wesentlich (Abbildung 4.28).

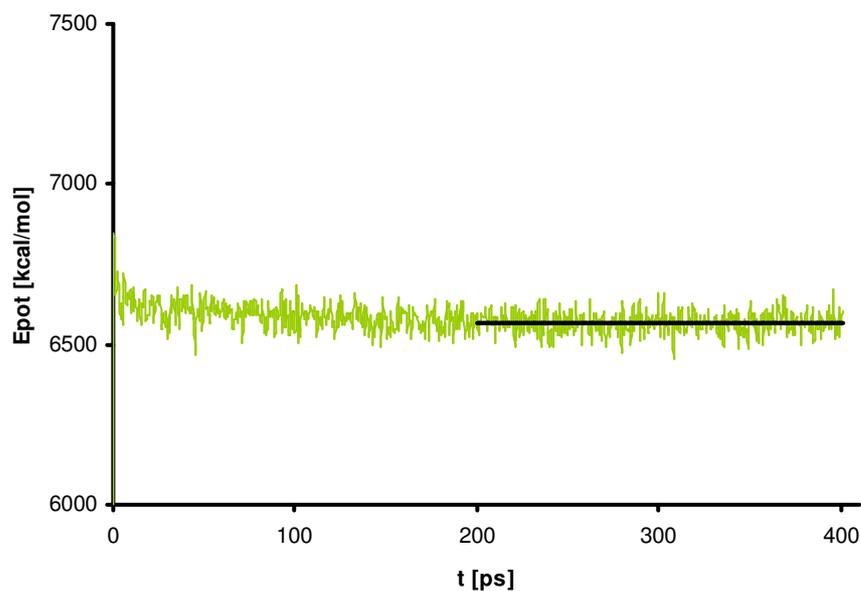


Abbildung 4.28: Verlauf der potentiellen Energie während der MDS des Wildtyps mit dem Liganden S-BayK 8644

Auch die RMSD-Werte des Protein-Rückgrates sind konstant im Bereich 0,6 (Abbildung 4.29).

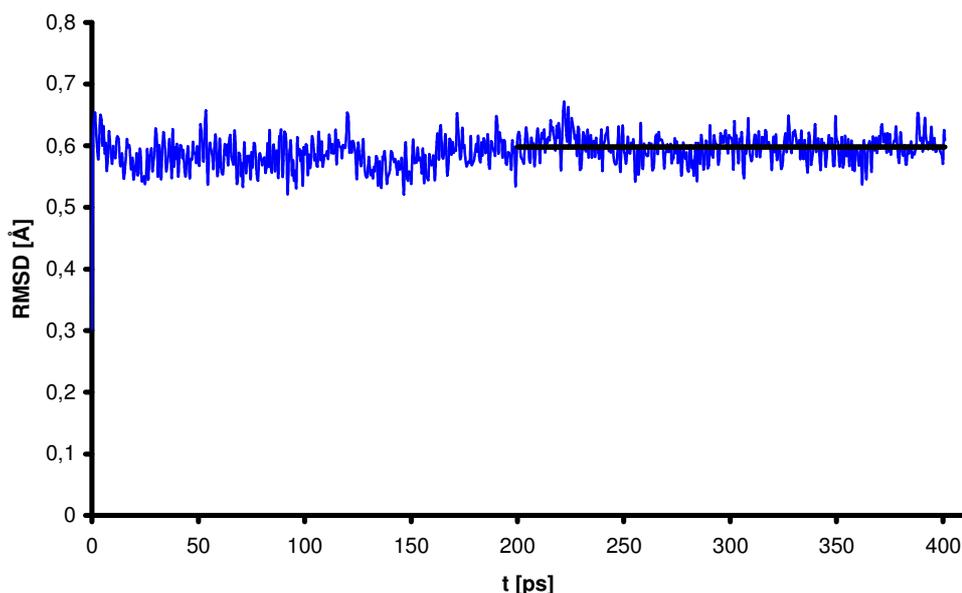


Abbildung 4.29: RMSD-Werte der MDS des Wildtyps mit S-BayK8644

Allerdings zeigt die Auswertung der während der MDS auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen nur die Ausbildung der Brücke zu Q1060 an, zu S1114 wird keine Interaktion gefunden. Der Abstand zwischen Nitro-Sauerstoff und Serin-Hydroxyl-Gruppe beträgt durchschnittlich 6,42 Å, so dass eine Wasserstoffbrücke nicht gebildet werden kann.

Es bleibt festzustellen, dass das Modell KvAP-A₂ das erweiterte Interaktionsmuster des Agonisten nicht wiedergeben kann. Im Folgenden wird untersucht, ob dies an der mangelnden Beweglichkeit des Proteins liegt oder an der Position des S1114.

4.5.1.1 Dynamik von KvAP-A₂ mit verminderter Rückhaltekraft

Zuerst soll durch Erhöhung der Flexibilität des Proteinmodells versucht werden, die Interaktion zwischen S-BayK 8644 und S1114 zu ermöglichen. Das Tethering, also die stabilisierende Rückhaltekraft auf dem Proteinerückgrat, wird von 300 kcal/Å² auf 200 kcal/Å² herabgesetzt. Damit wird ein Zerfall der Sekundärstruktur in Kauf genommen, dem Protein aber die Möglichkeit gegeben, sich intensiver zu bewegen, um eine Annäherung zwischen S1114

und dem Liganden zuzulassen. Diese MDS soll zur Beantwortung der Frage dienen, ob unter weniger restriktiven Bedingungen, wie sie in der Natur vermutlich herrschen, diese Interaktion möglich ist.

Der Verlauf der potentiellen Energie über die Simulationszeit von 500ps zeigt, dass das Modell nach 400ps äquilibriert ist (Abbildung 4.30).

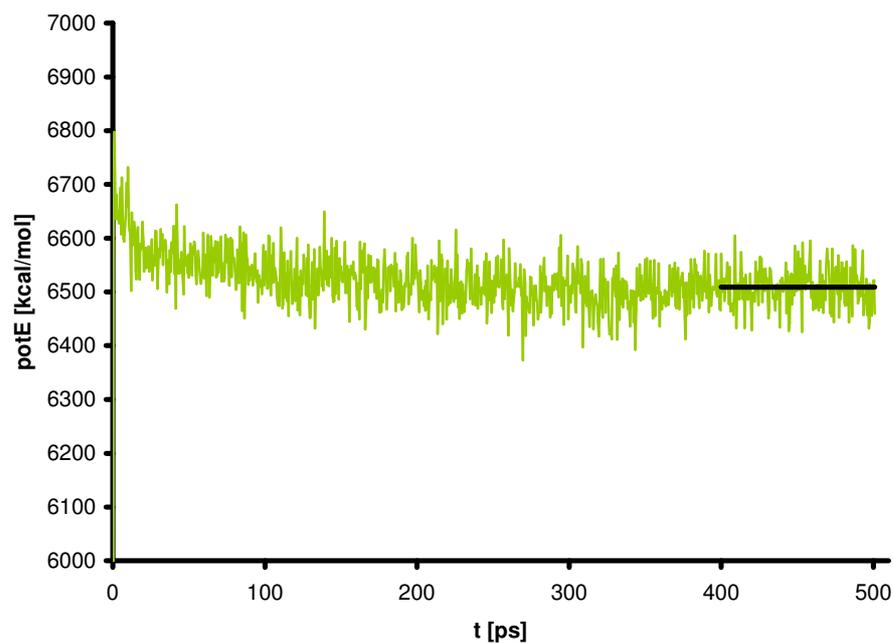


Abbildung 4.30: Verlauf der potentiellen Energie während einer Dynamik von 500 ps des Modells KvAP-A₂ (Wildtyp) mit dem Liganden S-BayK 8644. Der Energieverlauf zeigt, dass das Modell nach 400ps äquilibriert ist.

Die RMSD-Werte schwanken stärker als in den bisher betrachteten MDS, auf Grund der geringeren Rückhaltekraft. Nach einer Simulationsdauer von 400ps bewegen sie sich im Bereich 0,8 Å (Abbildung 4.31).

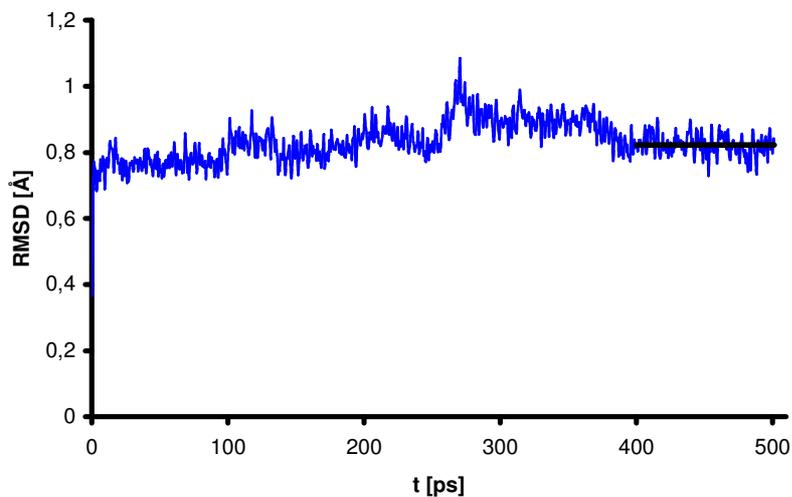


Abbildung 4.31: Verlauf der RMSD-Werte.

Der Abstand von M1177 zum aromatischen Rest der DHPs beträgt in der äquilibrierten Phase durchschnittlich 5,3 Å. Über diese Distanz kann keine Charge-Transfer-Interaktion stattfinden. Es findet sich keine Konformation, die für eine quantenmechanische Berechnung tauglich wäre.

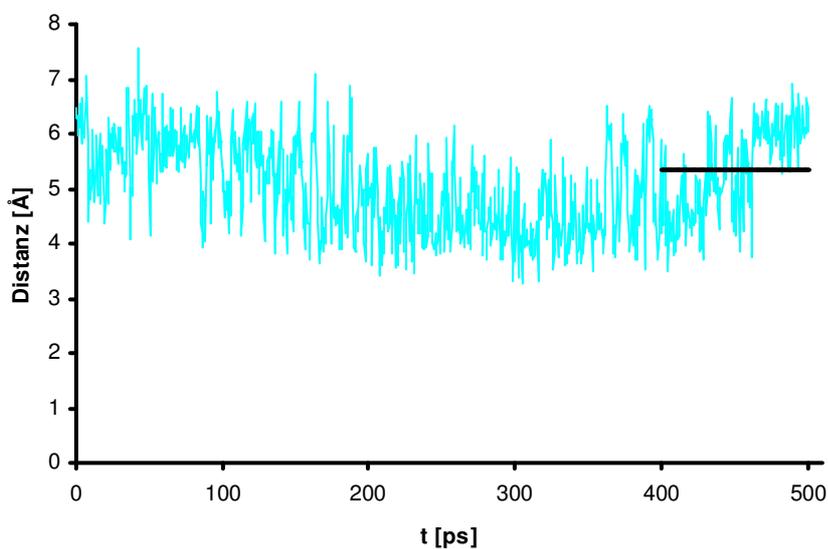


Abbildung 4.32: Abstand zwischen M1177 und dem DHP-Aromaten während der MDS, die Entfernung beträgt durchschnittlich 5,3 Å.

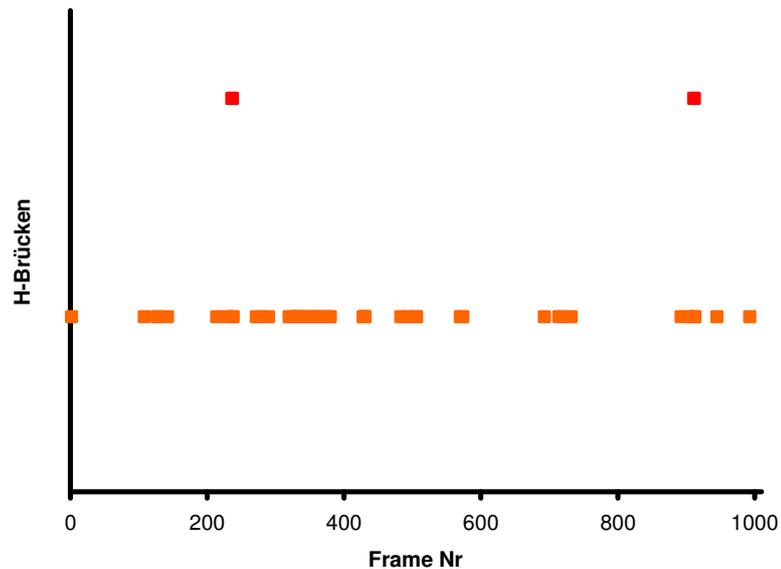


Abbildung 4.33: Vorkommen von Wasserstoffbrücken während der MDS, die untere Reihe (orange) zeigt alle Wasserstoffbrücken (Q1060 und S1114), die obere (rot) nur die zu S1114. In der äquilibrierten Phase (Frame Nr 800 bis 1000) kommt es kurz zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke.

Die Betrachtung der möglichen Wasserstoffbrücken zeigt bei 47,2% der Frames das Vorkommen einer Wasserstoffbrücke. Wieder sieht man eine eindeutige Bevorzugung der Wasserstoffbrücke zur Q1060. Doch wird in dieser Dynamik die Wasserstoffbrücke zu S1114 während der äquilibrierten Phase auch gefunden. Sie tritt allerdings nur sehr sporadisch auf.

4.5.1.2 Änderung des Modells im Bereich III-SS

In diesem Abschnitt wird untersucht, ob eine Veränderung des Modells im Bereich III-SS den Kontakt zwischen der Backbordseite von S-BayK 8644 und S1114 ermöglicht. Wie bereits erwähnt (s. Abschnitte 4.3.1.1 und 1.3.3), wird eine asymmetrische Anordnung der vier Repeats diskutiert. Auch zeigen Mutationen in Repeat III, zu dem S1114 gehört, nur eine Schwächung der Ca^{2+} -Selektivität, aber keinen Verlust derselben. Ca^{2+} -Kanäle vom T-Typ weichen in ihrer Sequenz vom Schema TXEXW ohne Verlust ihrer Ca^{2+} -Spezifität ab (Abschnitt 4.3.1.1). Daher ist es vertretbar, das Alignment an

dieser Stelle zu ändern, um S1114 räumlich dichter an den Liganden heran zu bringen.

Die Sequenz wird im Bereich III-SS um eine Aminosäure gen N-Terminus verschoben. Wie in Abbildung 4.34 zu sehen ist, wird im resultierenden Modell KvAP-A₃ die frühere Position des S1114 von T1115 eingenommen.

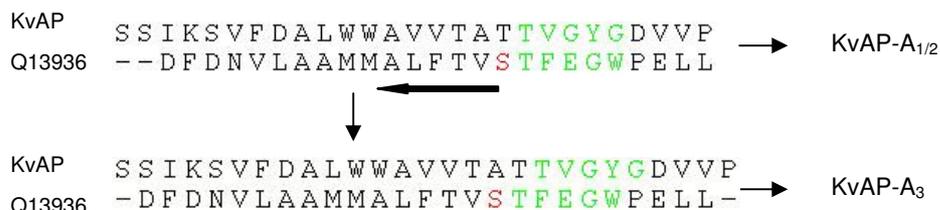


Abbildung 4.34: Änderung des Alignments im Bereich III-SS

4.5.1.3 Docken und Dynamiksimulation des Agonisten in Modell KvAP-A₃

Um eine Startkonformation zu erhalten, wurde der bereits für KvAP-A₁ und KvAP-A₂ verwendete Ligandensatz auch in KvAP-A₃ gedockt. Dies erwies sich jedoch als problematisch. Für Nifedipin und R-BayK 8644 werden von FlexX keine Lösungen gefunden. S-Isradipin, S-Nitrendipin und S-BayK 8644 werden nicht überlagert. Für S-BayK 8644 und S-Nitrendipin wird zwar der Kontakt zu S1114 gefunden, jedoch keiner zu den restlichen beteiligten Aminosäuren. Die Seitenkette von F1116 ist in die Bindungsstelle orientiert und engt den Raum so ein, dass für die Liganden nur ein sehr beschränkter Raum zur Verfügung steht.

Da für S-BayK 8644 eine Lösung gefunden wird, kann diese als Startstruktur einer Dynamiksimulation verwendet werden. Wie Abbildung 4.35 und Abbildung 4.36 zeigen, ist das Modell nach 500 ps MDS noch nicht äquilibriert, so dass die Simulationsdauer verlängert wurde. Im Bereich zwischen 600 und 1000 ps verändern sich potentielle Energie und RMSD nur noch wenig.

Die Auswertung der gebildeten Wasserstoffbrücken zeigt, dass ausschließlich und nur kurzfristig eine Interaktion zwischen der Backbord-Nitrofunktion von S-BayK 8644 und T1115 gefunden wird. Räumlich ist dies die Position, in der sich bei KvAP-A₁ und KvAP-A₂ S1114 befindet.

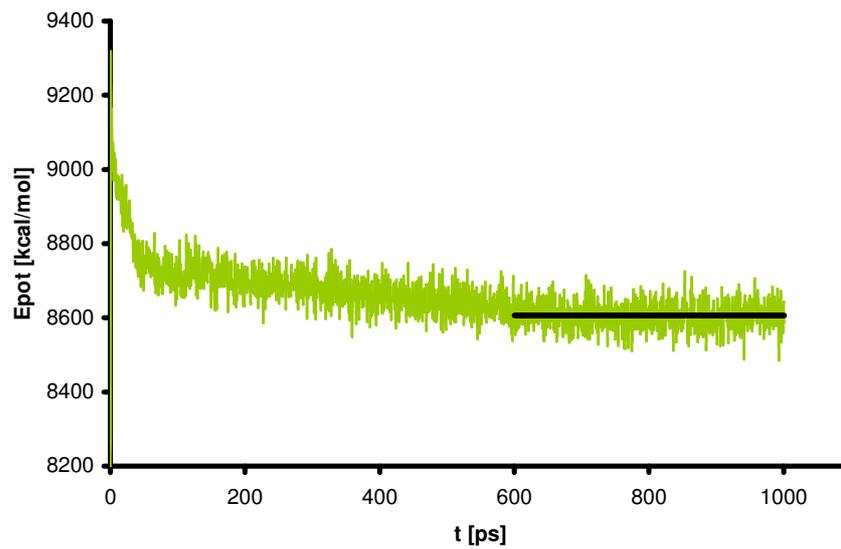


Abbildung 4.35: Verlauf der potentiellen Energie der MDS von KvAP-A₃ über 1000 ps, die durchschnittliche Energie in der äquilibrierten Phase ist gekennzeichnet

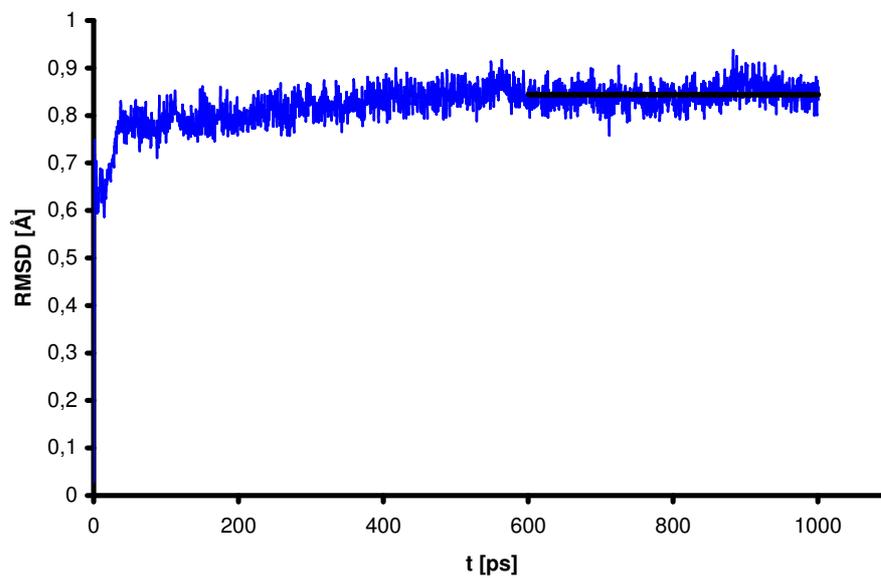


Abbildung 4.36: RMSD-Werte des Proteinrückgrats von KvAP-A₃

Die Mutation S1114T erhält die agonistische Wirkung. Dies spricht dafür, dass S1114 in seiner alten Position in KvAP-A₂ günstiger positioniert ist.

Die geringfügige Veränderung des Alignments hat keine Verbesserung des Modells bewirkt. KvAP-A₃ ist ungünstiger, da F1116 mit seiner raumfüllenden Seitenkette die Bindungsstelle stört. Dies macht das Docken schwierig und schränkt die Interaktionsmöglichkeiten mit anderen wichtigen Partner auch während der MDS ein. Das Modell KvAP-A₂ ist wie in den Dockingversuchen und den bisher vorgestellten MDS gezeigt günstiger als KvAP-A₃.

4.5.2 Moleküldynamiksimulationen des Antagonisten

Im Folgenden werden die MDS des Modells KvAP-A₂ mit dem Antagonisten S-Isradipin erläutert. Da für alle Liganden die gleichen Positionen im Docking gefunden wurden, kann der aktivste Ligand als repräsentativ angesehen werden (sog. *most active analogue approach*). Der Protein-Ligand-Komplex wurde bei 310K über 400 ps simuliert, wobei 150 ps benötigt wurden, um das System zu äquilibrieren. Abbildung 4.37 und Abbildung 4.38 zeigen den Verlauf der potentiellen Energie und der RMSD-Werte.

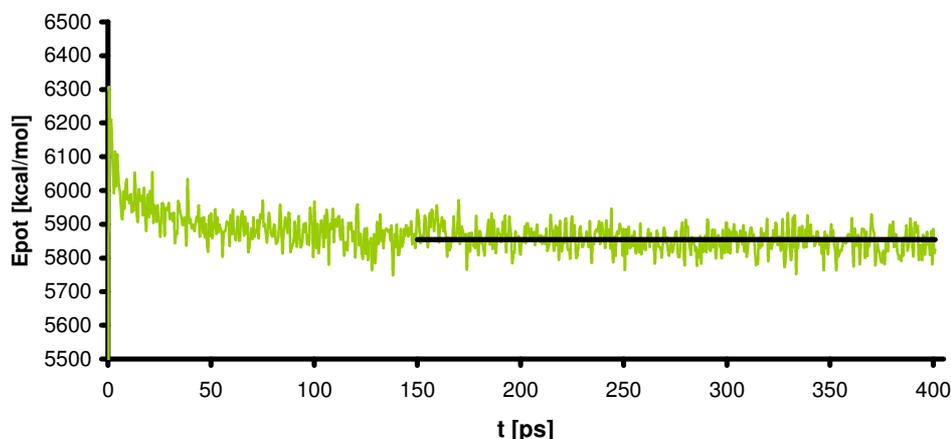


Abbildung 4.37: Verlauf der potentiellen Energie. Die Linie zeigt den Mittelwert während der äquilibrierten Phase.

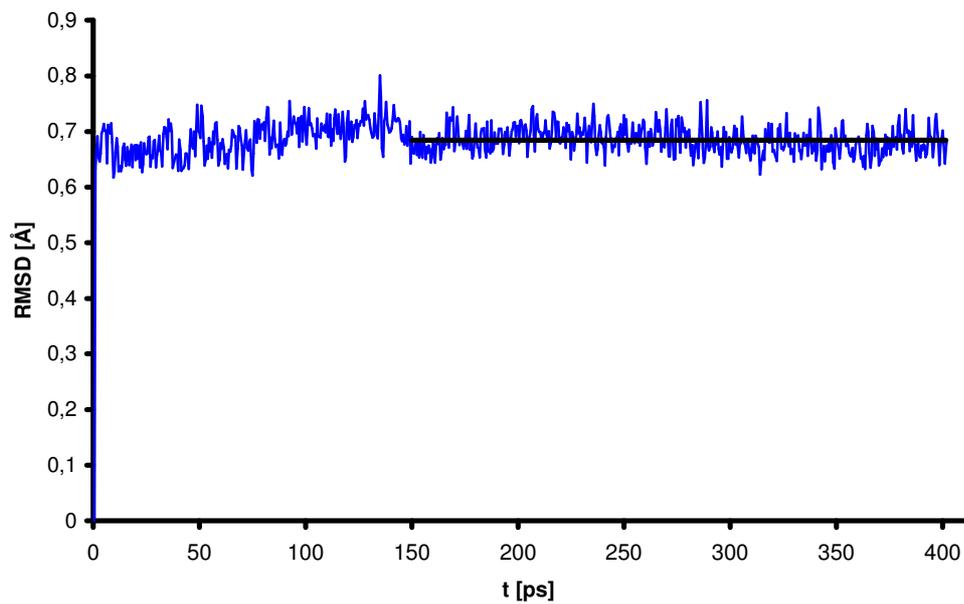


Abbildung 4.38: Verlauf der RMSD, gekennzeichnet ist der Mittelwert der RMSD in der äquilibrierten Phase

Je ps wurden zwei Frames gespeichert. Zur Ermittlung einer repräsentativen Struktur wurden alle Frames der äquilibrierten Phase gesammelt und mit Hilfe des Programms NMRClust klassifiziert. Abbildung 4.39 zeigt den als repräsentativ ermittelten Frame nach der Energieminimierung.

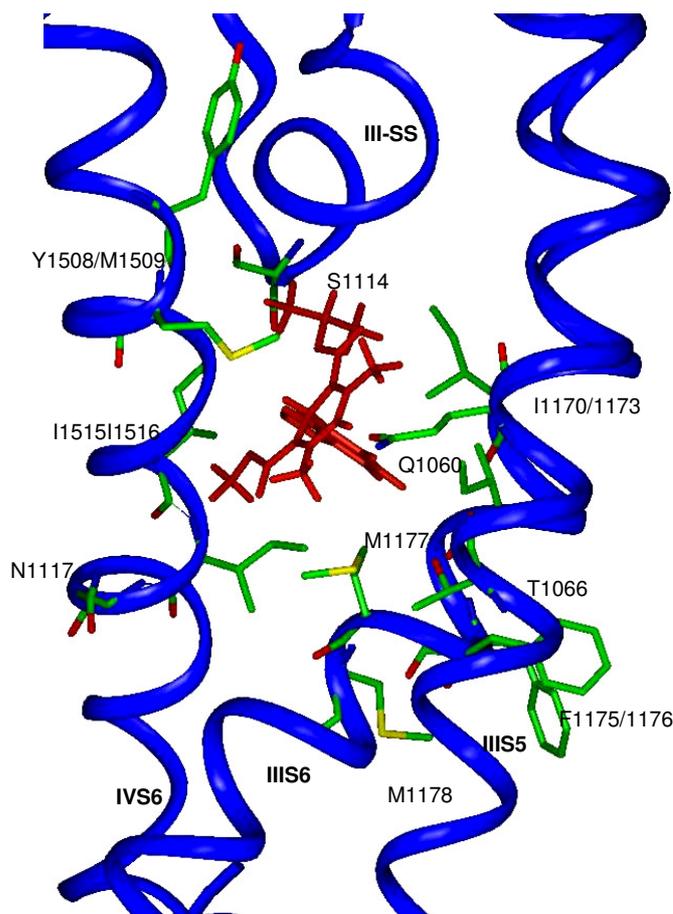


Abbildung 4.39: Repräsentative Struktur des Modells aus der Dynamik mit S-Isradipin als Ligand

S-Isradipin verändert seine Lage während der MDS kaum. Der Backbordester befindet sich in der Nähe von S1114, der Steuerbordester zwischen I1515 und I1516, mit denen die Methylgruppe van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen kann. Die NH-Funktion des Dihydropyridinrings geht in 95,5% der Frames eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe von Q1060 ein, die während der MDS erhalten bleibt. Abbildung 4.40 zeigt das Vorkommen von Wasserstoffbrücken während der gesamten MDS. Demnach scheint die postulierte Wasserstoffbrücke der NH-Funktion der wichtigste Kontakt. Außerdem wird eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Liganden und S1114 gefunden. Sie tritt jedoch nur sehr selten auf, da sich hierfür die Bindung zu Q1060 lösen und die Estercarbonyl-Gruppe in die nicht bevorzugte trans-Stellung wechseln muss (s. Abschnitt 1.5.1).

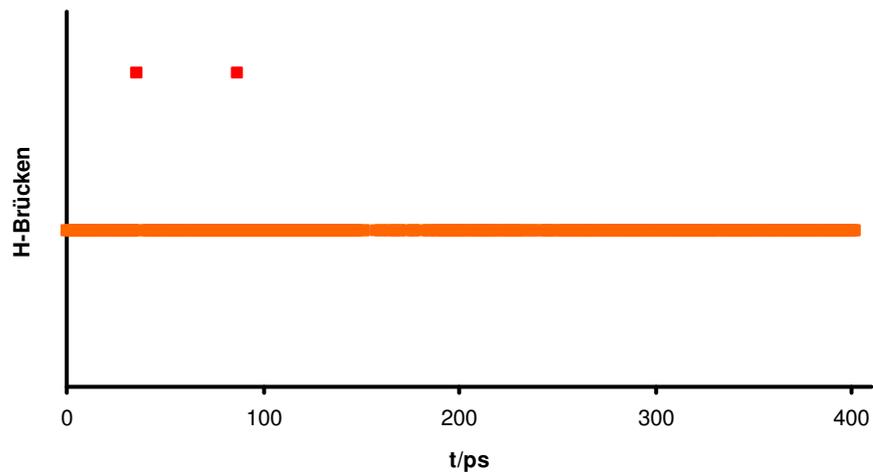


Abbildung 4.40: Vorkommen von H-Brücken während der MDS, die orange Linie zeigt alle vorkommenden Wasserstoffbrücken zu Q1060 und S1114, die roten die zu S1114

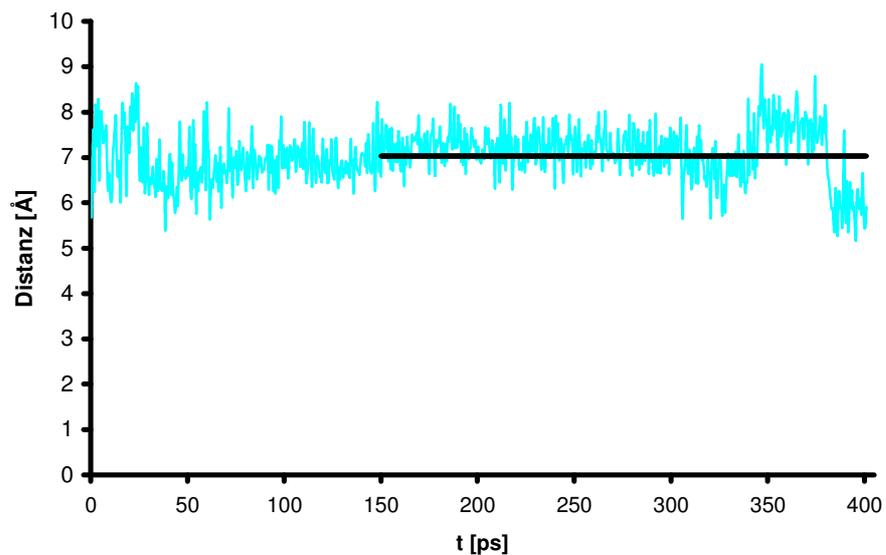


Abbildung 4.41: Abstand von M1117 zum DHP-Aromaten; gekennzeichnet ist der mittlere Abstand des äquilibrierten Modells (7,03Å)

Der Abstand zu M1117 ist zu groß, als dass ein Charge-Transfer-Komplex ausgebildet werden könnte. Wie man in Abbildung 4.41 sieht, verringert sich der Abstand in den letzten 20 ps. Es kommt in der Seitenkette von M1117 zu Rotationen um die C-C- bzw. C-S-Bindung. Durch diese richtet sich das Methionin zum Liganden aus. Auch wenn über diese Entfernung kein Charge-Transfer-Effekt stattfinden kann, so ist eine Tendenz zur Annäherung

erkennbar. Mit längerer Simulationsdauer und geringeren Rückhaltekräften wäre es vielleicht möglich eine Annäherung zu erreichen. Ohne die Membrenumgebung ist das Protein allerdings bei geringeren Rückhaltekräften zu instabil. Kraftfelder besitzen keine Terme, um CT-Wechselwirkungen berücksichtigen zu können. Daher wundert es nicht, dass die Partner sich nicht annähern. Diese Wechselwirkung wird daher in Abschnitt 4.6 mit anderen Methoden untersucht.

4.5.3 Qualität des Modells

In einem Protein nehmen die ϕ - und ψ -Winkel bestimmte Werte ein, die für die jeweilige Sekundärstruktur typisch sind. Werden die ϕ - und ψ -Werte gegeneinander aufgetragen erhält man deren Verteilung in einem sog. Ramachandran-Plot. In diesem gibt es favorisierte und erlaubte Bereiche, die auf α -Helices und β -Faltblätter hinweisen, und nicht erlaubte Regionen. Aminosäuren, die sich hier aufhalten, zeigen ungewöhnliche Winkel und sollten überprüft werden. Häufig gehören diese Aminosäuren zu Loop-Bereichen. Obwohl diese Winkel energetisch ungünstig sind, sind sie strukturell notwendig, um die Funktionalität des Proteins zu gewährleisten. In Kristallen wird meist nicht die günstigste Konformation eines Moleküls gefunden, sondern eine leicht verzogene. Dies beruht auf der Packung im Kristall. Durch die unphysiologisch dichte Packung kommt es zu Verzerrungen in den Bindungslängen und -winkeln. Diese lassen sich durch Minimierung z.B. mit dem Algorithmus Steepest Descent beseitigen. Abbildung 4.42 zeigt den Ramachandran-Plot der minimierten Kristallstruktur von KvAP (PDB-Code 1ORQ). Es wurde nur das Homomer berücksichtigt, nicht der assoziierte Antikörper, da dieser physiologisch nicht vorliegt, sondern nur zur Kristallisation als Stabilisierung benötigt wurde.

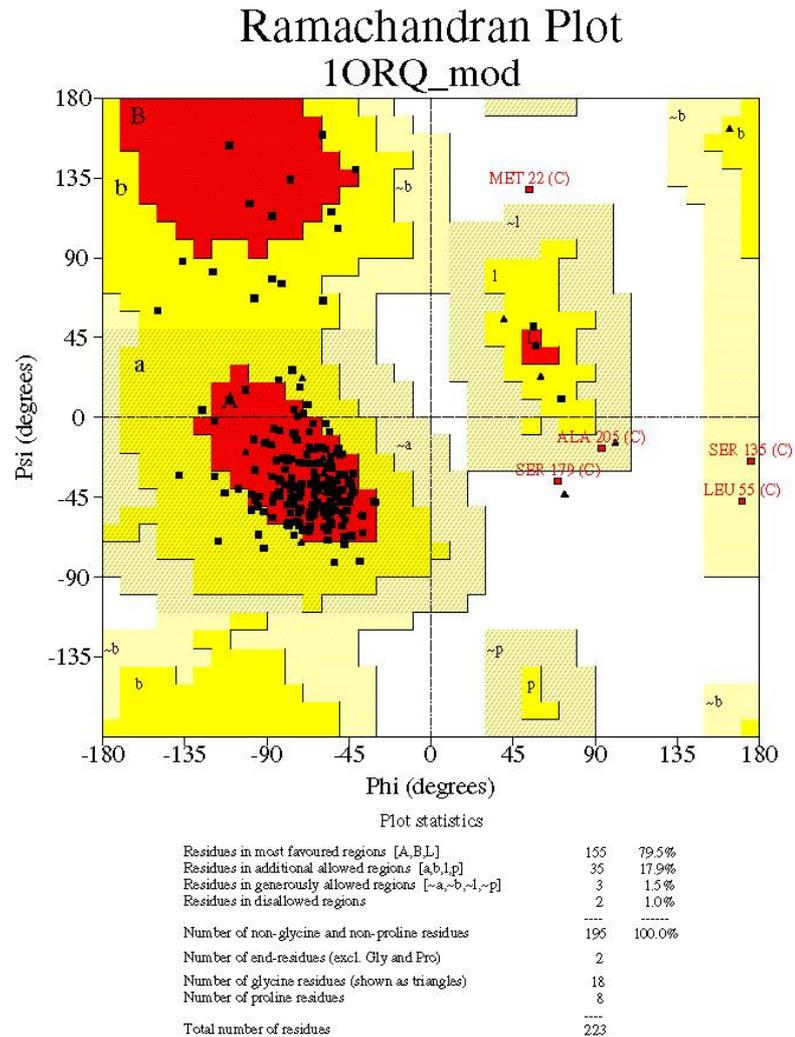


Abbildung 4.42: Ramachandran-Plot eines Monomers von KvAP (PDB-Code 1ORQ) aus der Protein Data Base

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 4.43 den Ramachandran-Plot der ermittelten repräsentativen Struktur von KvAP-A₂ aus der MDS. Da das Modell geometrisch optimiert wurde, befinden sich wegen der in der MDS zugelassenen Flexibilität mehr Aminosäuren in den am meisten favorisierten Regionen als in der Kristallstruktur des Templates. Allerdings hat auch die Zahl der Aminosäuren in den nicht erlaubten Bereichen zugenommen. Während KvAP zwei aufweist sind es im Modell KvAP-A₂ deren sechs. Diese befinden sich an den N-terminalen Enden der S6-Helices bzw. am Selektivitätsfenster. Hier ist die Funktionalität wichtig und es wird eine ungünstige Konformation in Kauf genommen. Die Helix-Enden dagegen gehen in die hier nicht modellierten Loops über. Zur Stabilisierung sind die Helix-Enden fixiert, Interaktionen mit

Loop-Aminosäuren können jedoch nicht berücksichtigt werden. So kann es in diesen Bereichen zu einer ungewöhnlichen Geometrie kommen, die jedoch die Qualität des Modells nicht negativ beeinflusst.

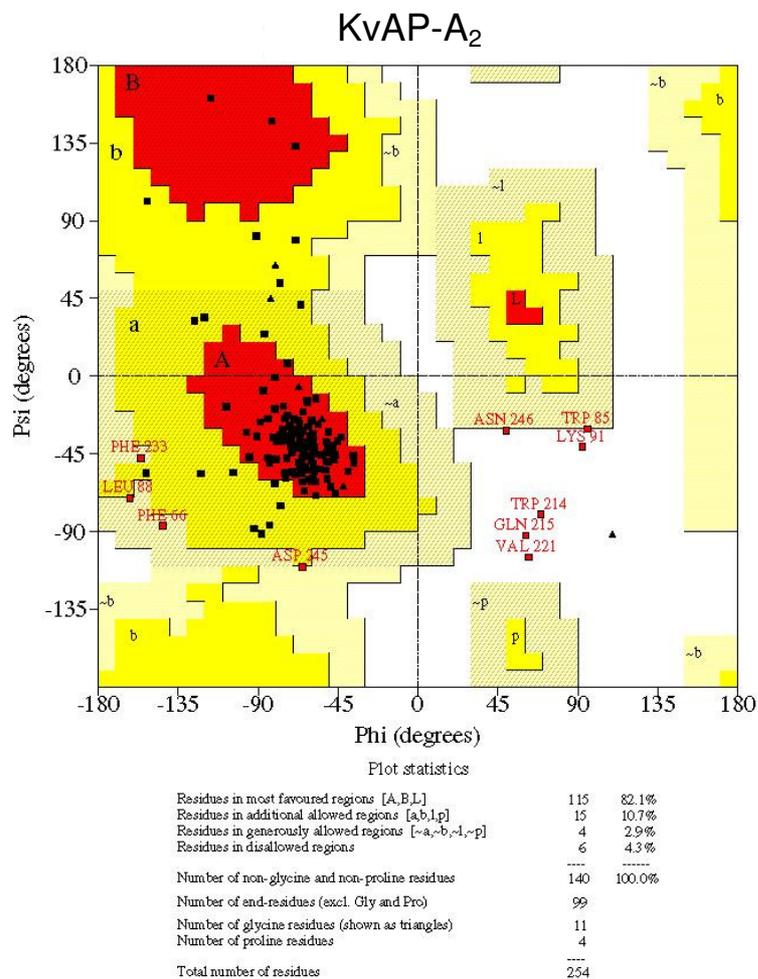


Abbildung 4.43: Ramachandran-Plot des repräsentativen Frames aus der Dynamiksimulation von KvAP-A₂

4.6 Untersuchung der Möglichkeit eines Charge-Transfer-Komplexes

Substituenten mit einem –I- oder –M-Effekt erhöhen die Affinität der Dihydropyridine. Sie verringern die Elektronendichte am Aryl-Substituenten. Kraftfeldmethoden können diese Unterschiede nicht erklären. Eine potentielle Aminosäure als Partner eines Charge-Transfer-Effekts ist z.B. Methionin. Auf Grund der sich aus dem Alignment ergebenden räumlichen Anordnung der Aminosäuren ist die Aminosäure M1177 ein geeigneter Partner. Während der MDS orientiert sich die Seitenkette allerdings nicht zum Liganden. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da Kraftfelder derartige elektronischen Effekte nicht beschreiben können.

In der im Biopolymer-Modul des Programms Insight2000 [41] implementierten Rotamer-Bibliothek nach Ponder und Richards [67] findet sich jedoch eine energetisch und geometrisch günstige Konformation der Seitenkette von M1177, die einen Ladungsübergang erlauben würde. Mit dieser können quantenmechanische Rechnungen durchgeführt werden, die Aufschluss über die Lage von HOMO's und LUMO's im Wechselwirkungskomplex geben. Für diese Untersuchung wurde die semiempirische Methode AM1 gewählt. Sie enthält zusätzliche Parameter für die Elektron-Elektron-Attraktion, die eine bessere Wiedergabe der Charge-Transfer-Wechselwirkung ermöglichen. Es wurden der Ligand S-Isradipin und M1177 in die Rechnung einbezogen. Die Amino- und die Carbonsäure-Funktion wurden mit „Caps“, d.h. mit einer Acetyl- bzw. einer Methylamino-Gruppe versehen. Hierdurch wird das Proteinrückgrat imitiert. D.h. Effekte auf die Seitenkette sind dem natürlichen Zustand ähnlicher als bei der freien Aminosäure.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.44 dargestellt. Es findet sich ein HOMO auf der Seitenkette von M1177 und ein LUMO auf dem Aromaten des DHPs, die so angeordnet sind, dass ein Elektronentransfer stattfinden kann. Ein Übergang ist dann möglich, wenn die Energiedifferenz zwischen dem HOMO des Donators und dem LUMO des Akzeptors niedriger ist als die Energiedifferenz zu einem LUMO des Donators.

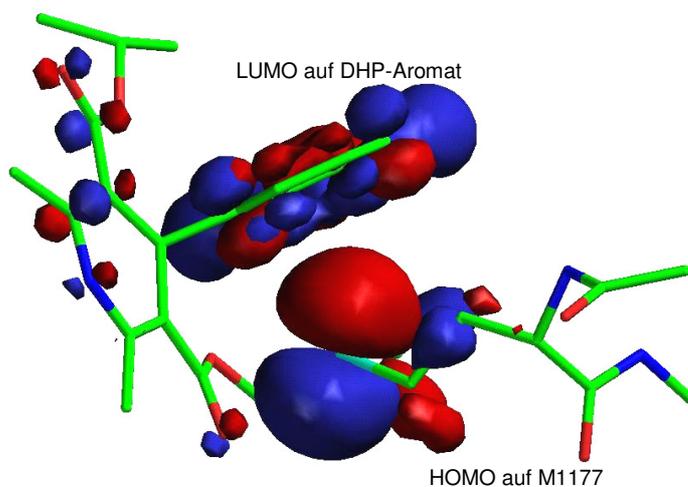


Abbildung 4.44: HOMO und LUMO, die für einen Charge-Transfer-Komplex zur Verfügung stehen

Da sich Orbitale mit entsprechender Geometrie im Abstand von ca. 3,3 Å gegenüber stehen, ist ein Ladungsübergang möglich.

	$\Delta E(\text{HOMO/LUMO})$
Methionin (Donator)	9,42 eV
Methionin/S-Isradipin-Komplex	7,16 eV

Tabelle 4.9: HOMO/LUMO-Energiedifferenzen innerhalb des Donators und des Komplexes

Tabelle 4.9 zeigt die Energiedifferenzen zwischen dem intramolekularen HOMO und LUMO von Methionin, sowie zwischen dem HOMO und LUMO des Methionin-S-Isradipin-Komplexes. Der Energie-Unterschied zwischen HOMO und LUMO des Donators ist geringer als zwischen HOMO des Donators und LUMO des Akzeptors. Dadurch ist der intermolekulare Ladungsübergang bevorzugt. Kritisch muss der Betrag des Energie-Unterschiedes betrachtet werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es sich bei diesem Komplex um ein artifizielles System handelt. Die Proteinumgebung fehlt. Bindungen des Methionins zu anderen Aminosäuren werden durch die Caps angedeutet. Ein eventueller Einfluss von benachbarten Aminosäureresten kann nicht ausgeschlossen werden.

5 Diskussion

5 Diskussion

Um das beschriebene Modell zu erstellen, erwies es sich als notwendig und zweckmäßig verschiedene Methoden zu kombinieren. Die Methoden des Protein-Homologie-Modellings wurden ergänzt durch die genauen Pharmakophor-Vorstellungen der DHPs. Docking-Methoden wurden benutzt, um die Lage der Liganden in der Bindungsstelle zu bestimmen und mögliche Interaktionen abzuschätzen. So wurde das Modell auf die DHP-Liganden optimiert. Außerdem ließen sich Startgeometrien für Moleküldynamiksimulationen generieren. Mit diesen wurde schließlich die Interaktion von Liganden mit einem flexiblen Rezeptor untersucht. Um eine CT-Wechselwirkung, welche nicht in einer MDS wiedergegeben werden kann, zu betrachten, kamen schließlich auch quantenmechanische Methoden zum Einsatz. So war es möglich, die vorhandenen Kenntnisse über DHPs und ihre Interaktionen mit dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal einzubringen. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte, die zum Bau des Modells beigetragen haben, kritisch betrachtet.

5.1 Bau der Modelle

Der Fortschritt des Kenntnisstandes über die dreidimensionale Struktur von Ionenkanälen hat zur Weiterentwicklung des Modells beigetragen. Zu Beginn der Arbeit stand ausschließlich die Röntgenkristallstruktur des entfernt verwandten pH-gesteuerten K^+ -Kanals KcsA zur Verfügung. Zwar gilt die Entstehung der Ionenkanäle durch Genduplikation und somit die Verwandtschaft zwischen Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen als gesichert, aber auf Grund der geringen Homologie ist ein Sequenz-Alignment sehr unsicher. Die Kristallstruktur des Ca^{2+} -gesteuerten K^+ -Kanals MthK zeigte, dass die Unterschiede zwischen geschlossenem und offenem Kanal größer sind als angenommen. Ein Vergleich der auf den Templaten KcsA bzw. MthK resultierenden Modelle erklärt die höhere Präferenz der DHPs für den offenen/aktiven (Antagonisten) bzw. offen/inaktiven Zustand (Agonisten). Durch das Aufschwingen der Porenhelices erweitert sich der zur Verfügung stehende Raum und der Ligand kann sich besser zwischen den Helices einfügen.

Die Röntgenkristallstruktur des spannungsgesteuerten K⁺-Kanals KvAP schließlich zeigte, dass die Struktur eines spannungsgesteuerten Kanals von der bisherigen Vorstellung abweicht. Bisher ging man davon aus, dass die sechs Helices eines Repeats als Helixbündel vorliegen mit S5 und S6 als Porenbildner, S1-S3 als Abschluss zur Membran und mit dem relativ hydrophilen, spannungsmessenden S4-Segment in der Mitte der übrigen Helices. In dieser Position hätte S4 mit den DHPs interagieren können. Man hat jedoch keine Aminosäuren in IIS4 identifizieren können, die für die DHP-Bindung wichtig ist. Die Kristallstruktur hat gezeigt, dass eine Interaktion des Liganden mit der spannungsmessenden Helix S4 nicht möglich ist, da diese nicht parallel zu den anderen Segmenten liegt, sondern in die Membran zeigt. Sie ermöglichte die Vervollständigung der Bindungsstelle, da nun die Lage aller Helices eines spannungsgesteuerten Kanals bekannt ist.

Steht nur eine Kristallstruktur zur Verfügung, kann logischerweise nur diese als Templat genommen werden. Stehen mehrere zur Verfügung, muss entschieden werden, ob sie kombiniert werden können oder ob man sich für ein Templat entscheiden muss. Die drei Kristallstrukturen KcsA, MthK und KvAP, die für Ionenkanäle als Template zur Verfügung stehen, unterscheiden sich beträchtlich. KcsA liegt als invertiertes Tipi vor, was der geschlossenen Konformation eines Ionenkanals entspricht. MthK und KcsA sind im Bereich des Selektivitätsfensters superpositionierbar, im Bereich der wassergefüllten Kavität sind die Helices von MthK nach außen geschwungen, die Kavität ist zum Cytoplasma erweitert. Dies entspricht der offenen Konformation eines Ionenkanals. Eine vergleichende Analyse zeigt, dass erst durch das Auseinanderweichen dieser Helices im Kavitätsbereich genügend Platz für die DHPs geschaffen und dadurch die Interaktion ermöglicht wird. Dies deckt sich mit den experimentellen Daten, nach denen DHPs bevorzugt an offene, aktivierte Kanäle binden. Daraus folgt, dass MthK ein besseres Templat als KcsA ist. Die MthK-Struktur liegt im offenen Zustand vor.

KvAP ist der einzige spannungsgesteuerte Ionenkanal, dessen Kristallstruktur aufgeklärt ist. Auch diese Struktur ist im Bereich des Selektivitätsfensters mit dem entsprechenden Bereich von MthK und KcsA superpositionierbar. Im Bereich der Kavität entspricht die Struktur MthK. Die Helices sind nach außen geschwungen. Folglich handelt es sich um einen Kanal in der offenen Konformation. Die Homologie zum L-Typ Ca²⁺-Kanal ist mit knapp 20% doppelt so groß wie die von KcsA bzw. MthK zum L-Typ Ca²⁺-Kanal. Außerdem handelt es sich hierbei nicht um einen

Protonen- oder Ionen-gesteuerten Kanal wie KcsA bzw. MthK, sondern um einen spannungsgesteuerten Kanal. Während KcsA bzw. MthK nur die Segmente S5 und S6 und die P-Loops aufweisen, verfügt KvAP zusätzlich über die Segmente S1-S4. Die DHP-Bindungsstelle befindet sich zwar im Porenbereich, d.h. zwischen den Segmenten IIS5, IIS6 und IVS6, die Bindungsstelle wird aber, wie man in der KvAP-Kristallstruktur und im Modell KvAP-A₂ sehen kann, von den Segmenten IIS2 und IVS1 zur Membranseite abgeschlossen. Also ist die KvAP-Kristallstruktur sowohl von der Homologie, der Konformation, der Aktivierung als auch der Anzahl der Segmente je Repeat dem spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanal vom L-Typ am nächsten. Daher wurde das endgültige Modell nach KvAP als Vorlage erstellt.

Schon lange ist bekannt, dass die DHP-Bindungsstelle sich in einem transmembranären, helikalen Bereich befindet. Doch wo ist die Bindungsstelle genau lokalisiert? Ist sie mehr im C-terminalen Bereich der Helices, der sich zum Cytoplasma öffnet oder eher an der N-terminalen Seite? Bei Sequenzen von hoher Homologie ergibt sich diese Antwort aus dem MSA. In dieser Arbeit ist das MSA jedoch sehr unsicher. Um abzusichern, dass durch das MSA keine Sequenz-Bereiche als membranständig und helikal modelliert werden, die es von den physikochemischen Eigenschaften ihrer Primärstruktur gar nicht sein können, wurde die Sequenz des L-Typ Ca²⁺-Kanals Q13936 topologischen Untersuchungen unterzogen. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die benutzten Sequenzabschnitte lipophil sind und als Helices modelliert werden können.

Um das MSA weiter zu testen, wurden nicht nur die Aminosäure-Sequenzen sondern auch die entsprechenden Basen-Sequenzen der Gene in einem MSA untersucht. In den Bereichen IIS6 und IVS6 unterscheiden sich die resultierenden Strukturen KcsA-G und MthK-G nicht wesentlich von KcsA-C und MthK-C. In Segment IIS5 gibt es größere Unterschiede. Diese führen jedoch nicht dazu, dass T1056 und Q1060 in Bezug auf den Liganden besser positioniert vorliegen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bei einer Homologie von ca. 20% und dem Fehlen einer für die Protein-Familie typischen Architektur die Erstellung eines Modells allein mit Homologie-Methoden im Bereich der DHP-Bindungsstelle schwer möglich ist. Das so erstellte Modell KvAP-A₁ wurde als Grundlage genommen und aus diesem das endgültige Modell entwickelt.

5.2 Das Selektivitätsfenster

Im Bereich des Selektivitätsfensters ist ein Muster in den Sequenzen zu erkennen, dass ein zuverlässiges Alignment auf Grund der Homologie erlaubt. Während alle K^+ -Kanäle im Bereich des Selektivitätsfensters die Sequenz TVGYG aufweisen, zeigen die Ca^{2+} -Kanäle das Muster TXEXW. Nur der „low-voltage“ T-Typ weicht in Repeat III gering davon ab.

Das hier vorgestellte Modell weicht allerdings von den bisherigen Modellvorstellungen ab. Da experimentelle Untersuchungen die Beteiligung von Glutamaten zeigen, ging man bisher davon aus, dass die negativ geladenen Seitenketten in die Pore ragen und die Ca^{2+} -Ionen über eine ionische Bindung stabilisieren. Lipkind et al. [53] haben gezeigt, dass in einem Modell auf der Grundlage von KcsA vier Glutamat-Reste keinen Platz im Bereich der Selektivitätsfensters finden. Um dieses Problem zu lösen, haben die Autoren das Templat verändert. Die vier Repeats wurden auseinander gezogen, bis zwischen den Glutamat-Resten ein Ca^{2+} -Ion eingepasst werden konnte. Durch diese topologische Anordnung wird eine weitere Unsicherheit in das Modell eingebracht. Dieses Vorgehen nimmt auch Einfluss auf die DHP-Bindungsstelle, was in Abschnitt 5.3 diskutiert wird.

Wird ein zweiwertiges Ion von vier negativen Ladungen festhalten, ist es schwer vorstellbar, die im Experiment gemessenen hohen Ionen-Durchflussraten zu erhalten. Die Kristallstrukturen der K^+ -Kanäle zeigen, dass die Ionen nicht durch Ladungen, sondern durch die Dipolmomente der Helices und der Carbonyl-Gruppen des Proteinrückgrats stabilisiert werden. Die Seitenketten regulieren die Porenweite und damit die Selektivität. Die Untersuchung von organischen Ca^{2+} -Komplexen und die Identifizierung möglicher Interaktionspartner für die Glutamate der Ca^{2+} -Kanäle im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass auch Ca^{2+} -Ionen durch Komplexbildung mit Carbonyl-Gruppen in der Pore stabilisiert werden können. Die Glutamat-Reste gehen Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Salzbrücken mit Q358, Q701, T1129 und R1459 ein. So können sie den Loop stabilisieren und die Porenweite fixieren.

Auch die Interaktionsmöglichkeit von S1114 mit den DHPs wird durch das Alignment des Selektivitätsfensters beeinflusst. S1114 befindet sich im Loop III-SS und ist in einer Position, in der sie mit der Backbordseite des Liganden eine Wasserstoffbrücke eingehen kann. Wie sich beim Docken und in der MDS gezeigt hat, führt eine

Veränderung des Modells in diesem Bereich zu schlechteren Kontakten zwischen DHP und Rezeptor.

5.3 Die DHP-Bindungsstelle

Da K^+ -Kanäle Homotetramere sind, geben sie keine Auskunft darüber, ob die Repeats im oder entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind. Huber et al. haben gezeigt, dass eine Anordnung im Uhrzeigersinn eine sinnvolle DHP-Bindungsstelle formt [40]. Das Modell beruht auf KcsA. Auch die Modelle dieser Arbeit, beruhend auf MthK und KvAP, zeigen, dass eine Anordnung der Repeats im Uhrzeigersinn den DHP-bindenden Aminosäuren die Möglichkeit gibt, eine gemeinsame Bindungsstelle zu bilden.

Im postulierten Bereich der DHP-Bindungsstelle ist die Homologie so gering, dass Methoden des Homologie-Modellings und Vorhersagen der transmembranären Bereiche bzw. der Sekundärstrukturen keine Grundlage für ein sinnvoll Struktur-Alignment liefern können. Die experimentellen Daten können nicht erklärt werden. Ausgehend von einem auf ClustalW beruhenden MSA von K^+ - und Ca^{2+} -Kanälen wurde das Struktur-Alignment durch Verschieben der Aminosäure-Sequenzen gegeneinander verändert. So wurde den DHP-bindenden Aminosäuren eine Interaktion mit den Liganden ermöglicht. Um ein sinnvolles Modell erstellen zu können, musste also ein weiterer Anhaltspunkt in Form der recht fundierten Kenntnisse über die Bindung der DHPs benutzt werden. Somit wurden zwei Template verwendet: Die Kristallstruktur des K^+ -Kanals als Vorlage für die Koordinaten des Proteinrückgrates und das DHP-Pharmakophor-Modell zur Ausrichtung der Aminosäuren und zur Modifizierung des Alignments.

Natürlich wurden viele verschiedene Modelle erstellt. Diese wurden mit dem vorhandenen DHP-Pharmakophor-Modell überlagert, um die Lage der an der DHP-Bindung beteiligten Aminosäuren zu beurteilen. Zusätzlich wurde auch auf Docking-Methoden zurückgegriffen, um die Interaktionsmöglichkeiten der Liganden zu prüfen. So entstand schließlich das als KvAP- A_2 bezeichnete Modell.

5.3.1 Vergleich von Ca²⁺-Kanal-Modellen in der offenen und der geschlossenen Konformation

Es ist experimentell gesichert, dass DHPs eine höhere Affinität zur offenen Konformation der L-Typ Ca²⁺-Kanäle aufweisen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Docking-Untersuchungen an den Modellen KcsA-A und MthK-A auf Grundlage der Kristallstrukturen von KcsA bzw. MthK zeigen, dass es im Kanal mit geschlossener Konformation schwierig ist, eine gemeinsame Position der Liganden zu finden, da der Platz zwischen den Helices nicht ausreicht, um einen Liganden von der Größe eines DHPs aufzunehmen. Im Modell der offenen Konformation ist der Raum zwischen den Helices ausreichend. Das Modell weist zwei Höhlen auf, in die DHPs gedockt werden können. Überlagert man beide Bindungsstellen mit dem Pseudorezeptor-Pharmakophor, zeigt sich, dass eine zu bevorzugen ist. Dieser Vergleich hat klar gezeigt, warum DHPs an die offene, aktivierte Form binden.

Andere Autoren, die sich ausschließlich mit dem geschlossenen Ca²⁺-Kanal beschäftigt haben, kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass der interhelikal zur Verfügung stehende Raum der geschlossenen Konformation für ein DHP sehr eng ist. Zhorov et al. [93] schlagen vor, dass die Bindungsstelle sich nicht zwischen den S5- und S6-Helices befindet, sondern im Bereich der wassergefüllten Kavität. Es wird ein Wirkmechanismus postuliert, bei dem die DHPs nicht in die Inaktivierung eingreifen, sondern den Kanal durch ihre räumliche Lage, vergleichbar einem Stopfen, blockieren. Dies deckt sich jedoch nicht mit den experimentellen Daten. Wie kann so der Unterschied zwischen Agonisten und Antagonisten erklärt werden? Beide binden an der gleichen Stelle, beide liegen lt. dem Pharmakophor überlagert in der Bindungsstelle. Auch kann ein DHP, das sich in der Kavität aufhält keinen Kontakt zu Q1060 aufnehmen oder von T1056-Mutationen aus der Bindungsstelle verdrängt werden. Die IIS6-Helix befindet sich zwischen der Kavität und der IIS5-Helix, zu der Q1060 und T1056 gehören.

Lipkind et al. [54] lösen das Problem durch das Auseinanderziehen der Helices, sie weichen also drastisch von der Vorlage ab. Dem Liganden wird so Platz verschafft, doch für die Segmente der Repeats I und II ist die gegenseitige Interaktion erschwert. Beide Lösungen sind unbefriedigend. Wie gezeigt, lassen sich diese Probleme mit einem offenen Ca²⁺-Kanal vermeiden.

5.3.2 Docking-Ergebnisse

Die an der DHP-Bindung beteiligten Aminosäuren wurden manuell ausgerichtet, um sie in eine Position zu bringen, in der sie mit den Liganden Interaktionen eingehen können. Nun muss geprüft werden, ob die Interaktionen wirklich stabil sind. Dies kann in einer Moleküldynamiksimulation geschehen. Über einen längeren Simulationszeitraum wird die Bewegung der Moleküle verfolgt und Interaktionen ausgewertet. Dieses Verfahren ist jedoch zeitaufwändig. Jeder Ligand eines Satzes kann nur einzeln untersucht werden. Daher wurden für diese Arbeit Docking-Methoden zur Abschätzung des jeweiligen Modells verwendet. In kurzer Zeit kann so ein Ligandensatz in die Bindungsstelle eingepasst werden. Ein Modell wird dann als gut beurteilt, wenn die wichtigen Aminosäuren als Interaktionspartner gefunden werden. Der verwendete Datensatz besteht aus fünf Liganden, ist also eher klein. Doch geht es in dieser Arbeit nicht um den Bau eines Pharmakophors oder eine 3D-QSAR-Studie, sondern um die Betrachtung der Güte des Modells. Die fünf Liganden sind repräsentative Vertreter der Gruppe der DHPs. Nifedipin und S-Nitrendipin sind Beispiele für ein achirales und ein chirales DHP. S-Isradipin ist der stärkste wirksame Ligand. S-BayK 8644 und R-BayK 8644 stellen ein Agonist/Antagonisten-Paar dar, dass sich ausschließlich in der Konfiguration am C4-Atom unterscheidet.

Die durch das Docking getestete Optimierung des Modells resultierte in Modell KvAP-A₂. Hier werden Interaktionen mit den Aminosäuren Q1060 in Segment IIIS5, M1177 in Segment IIIS6 und I1516 in Segment IVS6 gefunden.

Die experimentell ermittelten Eigenschaften, die auch im Pseudorezeptor-Pharmakophor berücksichtigt worden sind, werden also gefunden. Zu diesen Eigenschaften gehören van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den DHP-Seitenketten und Isoleucinen, Charge-Transfer-Effekte zwischen dem Aryl-Rest der DHPs und dem Rezeptor sowie Wasserstoffbrückenbindungen der NH-Funktion des Dihydropyridinrings und des Backbordesters.

Das Modell ist auf die fünf Liganden des gedockten Datensatzes optimiert. Um das Modell zu testen, wurde ein weiteres DHP gedockt, das S-Amlodipin. Im S-Amlodipin ist die Methylgruppe der Backbordseite am C5 mit einer Aminoethoxy-Funktion und der Ester am C6 mit einer Propyl-Gruppe erweitert. Das Amin wurde unprotoniert gedockt, da geladene DHPs nicht in die Membran gelangen können. Auch dieses DHP wird mit den übrigen überlagert, es bildet sich eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen einem der Aminwasserstoffe der S-Amlodipin-

Seitenkette und dem Amid-Sauerstoff des Proteinrückgrates von Q1060. Damit wird gezeigt, dass im Modell KvAP-A₂ Platz für die im Pharmakophor gezeigte molekulare Erweiterung am C5 und C6 ist.

Anders sieht die Interaktion der Liganden mit dem Modell KvAP-A₃ aus. Dieses Modell unterscheidet sich von KvAP-A₂ nur im Bereich III-SS. Die Unterschiede in den Docking-Ergebnissen sind jedoch sehr drastisch. Es lassen sich nicht alle Liganden docken. Eine Interaktion mit S1114 in III-SS wird zwar gefunden, doch Wechselwirkungen mit den anderen Helices können nicht mehr wiedergegeben werden. Dies liegt daran, dass in KvAP-A₃ die Seitenkette von F1116 in die Bindungsstelle ragt und den zur Verfügung stehenden Raum einengt.

Somit hat sich in den Docking-Versuchen das Modell KvAP-A₂ als beste Lösung herausgestellt.

5.4 Moleküldynamiksimulationen

Schließlich wurde das Modell einer MDS unterzogen, um die Interaktionsmöglichkeiten zwischen Ligand und einem flexiblen Protein zu untersuchen. Während bei Modellen beruhend auf KcsA und MthK der Ligand durch einen Zwang in Form einer Rückhaltekraft in der Bindungsstelle festgehalten werden musste, genügt es beim Modell KvAP-A₂, das Proteinrückgrat mit einer Rückhaltekraft zu belegen. Der Ligand verbleibt ohne äußeren Zwang in der Bindungstasche. Dies liegt daran, dass KvAP Koordinaten für alle sechs in einem spannungsgesteuerten Kationen-Kanal vorhandenen Segmente zur Verfügung stellt. Es hat sich in dieser Kristallstruktur und dem daraus resultierenden Modell gezeigt, dass die Segmente IIIS2 und IVS1 die Bindungsstelle zur Membran abschließen. Als Liganden wurden der Antagonist S-Isradipin und der Agonist S-BayK 8644 in die Bindungsstelle eingebracht, wobei die Dockingergebnisse zu Grunde gelegt und als Startgeometrien genutzt wurden. Sowohl in Pharmakophor-Modellen als auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Docking-Studien liegen die DHPs überlagert vor, so dass davon ausgegangen werden kann, dass S-Isradipin repräsentativ für die Antagonisten und S-BayK 8644 entsprechend für die Agonisten in einer Dynamiksimulation reagiert.

Die MDS des Antagonisten bestätigt das Docking-Ergebnis, denn der Ligand verbleibt in ähnlicher Position. Kontakte zu den Aminosäuren der Bindungsstelle werden gefunden, das Modell ist stabil. Es muss nun untersucht werden, ob die

unterschiedliche Wirkung von Agonisten und Antagonisten aus dem Modell abgeleitet werden kann.

Daher wurde S-BayK 8644 einer MDS unterzogen. Der wesentliche Unterschied zwischen Agonisten und Antagonisten ist der Austausch des Backbordesters durch eine Nitro-Gruppe. Hierdurch ändern sich die Eigenschaften des DHPs dahingehend, dass das negative Potential des Aromaten an der Backbordseite nicht durch einen Alkyl-Rest abgeschirmt wird, wie es bei den Antagonisten der Fall ist. Die Nitro-Gruppe bringt zusätzlich ihr eigenes negatives Potential ein. Durch die Kombination verstärken sich die Felder des Aryl-Restes und der Nitro-Gruppe. Es kann erwartet werden, dass die Nitro-Gruppe eher in der Lage ist Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen als der hinter Dihydropyridinring und Alkyl-Rest versteckte Ester. Nach den Docking-Versuchen brachte auch die MDS einen Hinweis zu einer möglichen Veränderung des Modells. Die Beteiligung der Aminosäure S1114 an der agonistischen Wirkung ist experimentell erwiesen, konnte aber in der MDS des Modells KvAP-A₂ nicht gefunden werden. Durch Verschieben des Alignments gen N-Terminus sollte hier die Interaktionsmöglichkeit verbessert werden. Dies hat sich im Modell KvAP-A₃ nicht bestätigt. Die MDS zeigt, dass Modell KvAP-A₃ instabiler ist. Im Gegensatz zu KvAP-A₂ mit einer Äquilibrationszeit von 200ps und einer Gesamtsimulationsdauer von 401ps benötigt KvAP-A₃ zur Äquilibration 600ps bei einer Gesamtsimulationszeit von 1001ps. Die in vorherigen Modellen gefundenen Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor sind nicht reproduzierbar. Das Ziel war, herauszufinden, ob mit diesem Alignment der Unterschied zwischen Agonisten und Antagonisten bzgl. S1114 beschrieben werden kann. Dies war nicht möglich. Doch zeigt dieses Beispiel wie moleküldynamische Untersuchungen Anregungen zur Modifikation eines Modells geben können.

Als weitere Möglichkeit, dem Agonisten eine Interaktionsmöglichkeit mit S1114 zu geben, wurde die Rückhaltekraft des Proteinrückgrates im Modell KvAP-A₂ herabgesetzt. Dadurch ist das Modell natürlich instabiler. Es benötigt eine Äquilibrationszeit von 400ps bei einer Simulationszeit von 501ps. Damit ist es stabiler als KvAP-A₃. Ein Kontakt zu S1114 wird gefunden, aber nicht mit signifikanter Häufigkeit.

Die Entfernung zwischen S1114 und dem Agonisten lässt Raum für ein Wassermolekül (s. Abbildung 5.1) Dieses kann als Brücke zwischen Agonist und

S1114 fungieren. Da die MDS im Vakuum durchgeführt wurden, wurde eine solche Interaktion nicht berücksichtigt.

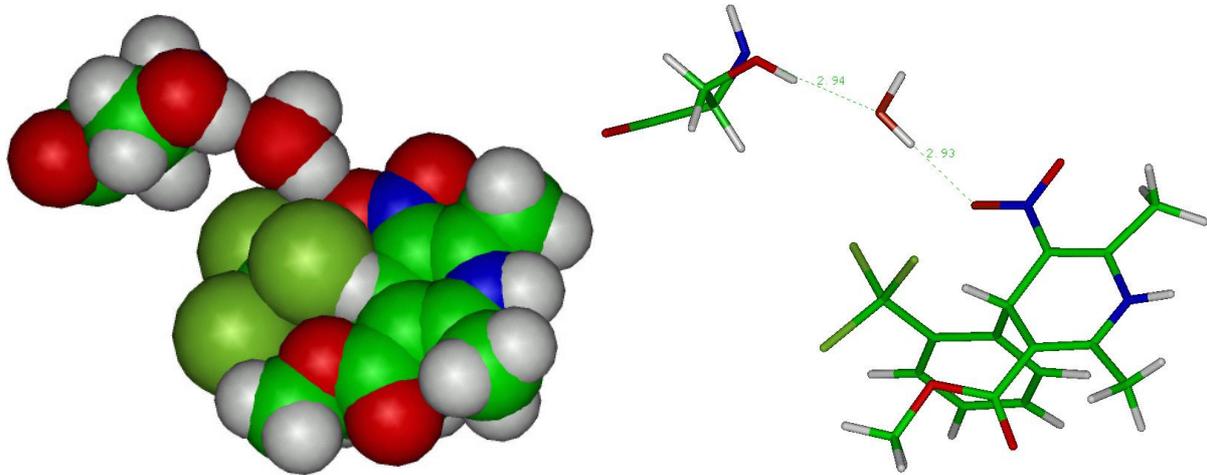


Abbildung 5.1: Wasser als Brücke zwischen S1114 und S-BayK 8644; links sind die Atomradien als CPK-Oberflächen dargestellt; rechts die Abstände zwischen Wasserstoff- und Sauerstoffatomen der beteiligten Partner.

An dieser Stelle müssen das Modell und die Simulationsbedingungen kritisch hinterfragt werden. Die hier vorgestellten Modelle stellen einen Ausschnitt des Kanals dar. Nur für diesen Bereich stehen die zusätzlichen Informationen eines Liganden zur Verfügung. Wie beim Bau des Modells diskutiert wurde, sind Zusatzinformationen notwendig, um ein sinnvolles Modell zu erstellen. Zusätzlich fehlt die Membrenumgebung, ebenso das wässrige Medium des Extrazellulärraums und des Cytoplasmas. Diese Umgebungsfaktoren üben einen stabilisierenden Einfluss auf die Struktur aus, der in den MDS durch die Rückhaltekraft des Proteinrückgrats ersetzt wird. Dadurch wird aber auch die Beweglichkeit des Proteins eingeschränkt. Wenn diese Beweglichkeit notwendig ist, um den Effekt eines Liganden zu erklären, kann sie unter diesen Simulationsbedingungen nicht gefunden werden. Die Simulation von KvAP-A₂ bei verminderter Rückhaltekraft zeigt, dass bei größerer Beweglichkeit des Proteins die Interaktion von S-BayK 8644 und S1114 möglich ist. Doch besteht die Gefahr, dass die Struktur des Proteins sich bei noch geringeren Rückhaltekraften auflöst. Abhilfe kann geschaffen werden, wenn ein Templat mit höherer Homologie, auf dessen Grundlage der komplette Ca²⁺-Kanal modelliert werden kann zur Verfügung steht. In eine Membran eingebettet, könnte

ein solches Modell ohne Rückhaltekräfte simuliert werden. Z. Zt. steht ein solches Templat jedoch nicht zur Verfügung.

Sind Unterschiede in der Wirkung von Agonisten und Antagonisten mit diesem Modell erklärbar? Die moleküldynamischen Untersuchungen konnten, wie oben diskutiert, keinen Beleg für die unterschiedliche Wirkung der DHP-Agonisten und – Antagonisten zeigen. Möglicherweise liegt der Unterschied im unterschiedlichen Potentialverlauf entlang der Membran von offenen und geschlossenen Kanälen (Abbildung 1.9, [42]). Das unterschiedliche elektrostatische Potential von DHP-Agonisten und Antagonisten könnte hier relevant sein und den Verlauf so ändern, dass die Inaktivierung modifiziert wird.

5.5 Abschlussbemerkungen

Der Mechanismus der Inaktivierung ist sehr komplex. Auch dieses Modell kann keine endgültige Antwort geben. Modelle sind ein Versuch, die Wirklichkeit zu beschreiben, kein Abbild davon. Sie beschreiben die Eigenschaften eines Systems. Doch es zeigt sich immer wieder, wie am Beispiel des Selektivitätsfensters zu sehen ist, dass die Natur andere Lösungen findet als der Wissenschaftler sich vorstellen kann.

Der Unterschied zwischen dem geschlossenen, aktivierbaren und dem offenen aktivierten Zustand kann an den hier vorgestellten Modellen nachvollzogen werden. Die tatsächlichen konformatorischen Unterschiede zwischen der offenen/aktiven und dem schnell erreichbaren inaktiven Zustand sind nach wie vor unbekannt. Betrachtet man das vorliegende Modell, so ist vorstellbar, dass durch den Liganden, der Interaktionen zu drei Segmenten aufbaut, diese drei Segmente in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden. Der Antagonist geht eine zusätzliche Interaktion mit dem Segment III-SS ein. Dadurch wird auch dessen Beweglichkeit eingeschränkt. Es ist zu vermuten, dass diese Einschränkung Einfluss auf die Stabilisierung der Ca^{2+} -Ionen in der Pore nimmt. Wie das geschieht, kann nach dem derzeitigen Wissenstand nicht geklärt werden.

Bei der Erstellung des Modells wurden DHPs als Liganden-Template genutzt. Der Rezeptor ist also auf diese optimiert. Es ist bekannt, dass andere Ca^{2+} -Antagonisten, also Benzothiazepine und Phenylalkylamine, die Wirkung der DHPs in einem allosterischen Mechanismus verstärken und in einem Bereich nahe der DHP-

Bindungsstelle gebunden werden. Während die DHPs extrazellulär appliziert werden müssen, um sich wirksam zwischen die Helices einbringen zu können, greifen Benzothiazepine intrazellulär an und nähern sich der Bindungsstelle durch die Pore. Y1508 und I1515 sind sowohl an der Bindung der DHPs als auch der Benzothiazepine beteiligt. Im Modell KvAP-A₂ liegt I1515 direkt im Bereich der Pore, eine Interaktion ist auf jeden Fall denkbar, Y1508 ist schwerer zugänglich, weil es hinter der IV-SS-Bereich liegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Untersuchungen an anderen Liganden-Gruppen durchgeführt. Das Modell KvAP-A₂ schafft jedoch die Grundlage für weitere Untersuchungen mit anderen Liganden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier vorgestellte Modell eine Reihe von neuen, bisher nicht bekannten Informationen über die DHP-Bindungsstelle, liefert, deren Wertigkeit durch Experimente überprüft werden kann.

6 Zusammenfassung

6 Zusammenfassung

Das spannende Gebiet der spannungsgesteuerten Ionenkanäle ist Gegenstand intensiver Forschung, doch vieles gibt es noch zu erkunden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, die nur ein Teil dieser Gruppe sind.

Von einem Templat ausgehend, welches nur einen Teilbereich, den der Pore, zeigt, ist in dieser Arbeit dargestellt, wie durch den Einsatz verschiedener Methoden des Molecular Modellings, wie Homologie-Modelling, Liganden-Docking und Anwendung quantenchemischer Methoden, ein Modell der DHP-Bindungsstelle erstellt werden kann. Im Verlauf der Arbeit wurden weitere experimentelle Erkenntnisse über Ionenkanäle veröffentlicht. Diese wurden sukzessive beim Modellieren berücksichtigt und resultierten in der Erstellung mehrerer Modelle. Als Templat wurde schließlich ein Kanal offener Konformation gewählt. Trotz der geringen Homologie zwischen den Sequenzen von K^{+} - und Ca^{2+} -Kanälen lässt sich mit einem multiplen Sequenz-Alignment ein Modell erstellen, das eine Abschätzung der Lage der transmembranären Segmente zulässt. Der Aufbau des Selektivitätsfensters folgt in dieser Arbeit nicht den gängigen Vorstellungen, sondern orientiert sich an den kristallisierten Vorbildern, die ihr bevorzugtes Ion mit den Carbonyl-Gruppen des Proteinrückgrates stabilisieren. Diese Anordnung erlaubt außerdem der Aminosäure S1114 eine in Experimenten ermittelten Beteiligung an der DHP-Bindung.

Die genaue Lage der an der DHP-Bindung beteiligten Aminosäuren wurde an die Eigenschaften der Liganden, charakterisiert in Pharmakophor und Pseudorezeptor, angepasst. Dadurch erhält man ein Modell, welches die Beteiligung vieler der DHP-bindungsrelevanten Aminosäuren wiedergibt. Der Einfluss dieser Aminosäuren kann in Docking-Versuchen bestätigt werden.

In Moleküldynamiksimulationen wird die Interaktion von Liganden mit dem beweglichen Rezeptor untersucht. Auch zeigt sich, dass der Ligand stabil in der

Bindungstasche bleibt und Interaktionen mit wichtigen Aminosäuren, z.B. eine Wasserstoffbrücke zu Q1060, gefunden werden. CT-Effekte können mit MDS-Methoden nicht simuliert werden, die räumliche Anordnung im Modell lässt dies aber prinzipiell zu. Quantenchemische Berechnungen zeigen, dass ein im Pharmakophor postulierter CT-Effekt mit der Aminosäure M1177 möglich ist.

Auch eine Vorstellung im Bezug auf die unterschiedliche Wirkung von den strukturell sehr ähnlichen Agonisten und Antagonisten ist aus dem Modell erhältlich. DHPs greifen durch ihre Bindung zwischen den Helices in die Inaktivierung ein, indem sie die Lage der Segmente IIS5, IIS6, IVS6 und III-SS durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken, CT-Interaktionen und van-der-Waals-Interaktionen beeinflussen. Dadurch wird im Fall der Antagonisten die Verbindung der wassergefüllten Kavität zum Zellinneren gestört, was den Ca^{2+} -Influx behindert. Im Falle der Agonisten ist es denkbar, dass durch die Verzerrung der Bindungsstelle der Ca^{2+} -Influx beschleunigt wird. Dies kann mit Kraftfeld-Methoden zwar nicht belegt, aber erahnt werden.

Um den genauen Mechanismus zu ergründen, wäre die Vervollständigung des Modells hilfreich. Diese ist aber erst dann sinnvoll, wenn es gelingt, die Kristallstruktur eines spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals aufzuklären. Die verschiedenen Typen haben untereinander eine hinreichend große Homologie, die die Erstellung eines verlässlichen Modells erlaubt.

Das Ziel des Molecular Modellings ist die Erstellung eines Modells, das die Gegebenheiten der Wirklichkeit möglichst genau widerspiegelt. Mit dem vorliegenden Modell wurde eine Grundlage geschaffen, die zur Erhellung des Wirkmechanismus der DHPs und der allosterisch wirkenden Phenylalkylamine und Benzothiazepine und damit der Kanal-Inaktivierung beitragen kann. Inwieweit sich darüber hinaus auch die kinetischen Eigenschaften von Ca^{2+} -Kanälen – wie Kanal-Aktivierung und –Inaktivierung – verstehen lassen, müssen Folgearbeiten zeigen.

7 Literaturverzeichnis

7 Literaturverzeichnis

- [1] Accelrys Inc, San Diego, CA, USA
- [2] Allen, F.H.: The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta. Crystallogr. B* 58 (2002) 380-388, 2002
- [3] Anderson, P. A. V., Greenberg, R. M.: Phylogeny of ion channels: clues to structure and function, *Comp. Biochem. Phys. B* 120 (2001) 17-28
- [4] Åquist, J., Luskhov, V.: Ion permeation mechanism of the potassium channel, *Nature* 404 (2000) 861-884
- [5] Baindur, N., Rutledge, A., Triggel, D. J.: A Homologous Series of Permanently Charged 1,4-Dihydropyridines: Novel Probes Designed To Localize Drug Binding Sites on Ion Channels, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 3743-3745
- [6] Ballesteros, J. H., Weinstein, H.: Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G-Protein-Coupled Receptors, *Methods Neurosci.* 25 (1995) 366-428
- [7] Berjukow, S., Marksteiner, R., Gapp, F., Sinnegger, M. J., Hering, S.: Molecular Mechanism of Calcium Channel Block by S-Isradipine, *J. Biol. Chem.* 275.29 (2000) 22114-22120
- [8] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E.: The Protein Data Bank, *Nucleic. Acid. Res.* 28 (2000) 235-242
- [9] Bezanilla, F.: The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 555-592
- [10] Bodi, I., Yamaguchi, H., Hara, M., He, M., Schwartz, A., Varade, G.: Molecular Studies in the Voltage Dependence of Dihydropyridine Action in L-type Ca^{2+} Channels, *J. Med. Chem.* 272 (1997) 24952-24960
- [11] Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H.: *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, 1996
- [12] Böhm, H.J.: The development of a simple scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure, *J. Comput.-Aid. Mol. Design* 8 (1994) 243-256
- [13] Catterall, W. A.: Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels, *Ann. Rev. Biochem.* 64 (1995) 493-531
- [14] Chang, N., Lipkind, G., Fozzard, H., Penzotti, J., Sunami, A., French, R.,

- Dudley, S.: Interactions with μ -Conotoxin GIIIA suggest a clockwise arrangement of the Na⁺-channel domains, *Biophys. J.* 76 (1999) 261
- [15] Coburn, R. A., Wierzba, M., Suto, M. J., Solo, A. J., Triggle A. M., Triggle, D. J.: 1,4-Dihydropyridine Antagonist Activities at the Calcium Channel: A Quantitative Structure-Activity Relationship Approach, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 2103-2107
- [16] Corry, B., Allen, T. B., Kuyacak, S., Chung, S.: A Model of calcium channels, *Biochim. Biophys. Acta* 1509 (2000) 1-6
- [17] Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heinje, G., Elofson, A., Prediction of transmembrane α -helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method, *Protein Eng.* 10(6) (1997) 673-676
- [18] Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., McKinnon, R.: The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity, *Science* 280 (1998) 69-77
- [19] Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R.: X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0Å reveals the molecular basis of anion selectivity, *Nature* 415 (2002) 287-292
- [20] Ertel, E., Tsien, R. W., Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels, *Neuron* 25 (2000) 533-535
- [21] Favre, I., Moczydlowski, E., Schild, L.: On the Structural Basis for Ionic Selectivity Among Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in the Voltag-gated Sodium Channel, *Biophys. J.* 71 (1996) 3110-3125
- [22] Fromm, K. M., Berdardinelli, G., Mayor-Lopez, M.-J., Weber, J., Goesmann, H.: Similar Coordination – Different Dimensionality: Synthesis, Single Crystal Structures and Theoretical Studies of Hydrogen-Bonded {[CA(H₂O)₂L₄]I₂}_{n/∞}, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 626 (2000) 1685-1691
- [23] Garret, M. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J., Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998)1639-1662
- [24] GCG (Genetics Computer Group) Oxford 1998
seit 2001 assoziiert mit Accelrys, San Diego, CA, USA
- [25] Goldmann, S.; Stoltefuß, J.: 1,4-Dihydropyridine: Einfluss von Chiralität und Konformation auf die Calcium-antagonistische und –agonistische Wirkung, *Angew. Chemie* 103 (1991) 1587-1605
- [26] Goodsell, D. S., Olson, A. J.: Automated Docking in substrates to proteins by simulated annealing, *Proteins* 8 (1990) 195-202
- [27] Harvey, S. C.: Treatment of electrostatic effects in macromolecular Modelling, *Proteins: Struct. Funct. Gen* 5 (1989)78-92
- [28] Hehre, W. J.; Huang, W. W.: Chemistry in Computation, an introduction to

- Spartan. Wavefunction Inc. 1995, S.49
- [29] Heinemann, S. H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., Numa, S.: Calcium channel characteristics conferred in the sodium channel by single mutations, *Nature* 356 (1992) 441-443
- [30] Hendlich, M.: Databases for protein-ligand complexes, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 1178-1182
- [31] Hering, S., Berjukow, S., Sokolov, S., Marksteiner, R., Weiß, R. G., Kraus, R., Timin, E. N.: Topical Review: Molecular determinants of inactivation in voltage-gated Ca^{2+} channels, *J. Physiol.* 528.2 (2000) 237-249
- [32] Hockerman, G. H., Peterson, B. Z., Sharp, E., Tanada, T. N., Scheuer, T., Caterall, W. A.: Construction of a high-affinity receptor site for dihydropyridine agonists and antagonists by single amine acid substitutions in a non-L-type Ca^{2+} -channel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 14906-14911
- [33] Holm, Sander: Protein Folds and Families: sequence and structure alignments, *Nucleic. Acids. Res.* 27 (1999)244-247
- [34] Höltje, H.-D., Marrer, S.: A molecular graphics study on structure-action relationships of calcium-antagonistic and agonistic 1,4-dihydroxyridines; *J. Comput.-Aided. Mol. Design* 1 (1987) 23-30
- [35] <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>
- [36] <http://cbbc.murdoch.edu.au/software/cba/cba52.php>
- [37] <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [38] <http://swift.cmbi.kun.nl/WIWWWI/>
- [39] <http://www.expasy.org>
- [40] Huber, I., Wappl, E., Herzog, A., Mitterdorfer, J., Glossmann, H., Langer, T., Striessnig, J.: Conserved Ca^{2+} -antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity Dihydropyridine binding domain; *Biochem. J.* 347 (2000) 829-836
- [41] Insight 2000, Fdiscover2.98, accelrys, San Diego, CA, USA
- [42] Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R.: The open pore conformation of potassium channels, *Nature* 417 (2002) 423-526
- [43] Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., MacKinnon, R.: X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel, *Nature* 423 (2003) 33-41
- [44] Jones D. T., Protein secondary structure prediction on positron specific-scoring matrices, *J. Mol. Biol.* 292 (1999) 195-202
- [45] Jones, S. W.: Overview of Voltage-Dependent Calcium Channels, *J. Bioenerg. Biomembr* 30 (1998) 299-312

- [46] Kass, R.S.; Arena, J. P.; Chin, S.: Block of L-Type Calcium Channels by Charged Dihydropyridines, *J. Gen. Physiol.* 98 (1991) 63-75
- [47] Kelly, B. L., Gross, A.: Potassium channel gating observed with site-directed mass tagging, *Nature Struct. Biol.* 10 (2003) 280-284
- [48] Kim, Y. H., Calabrese, J., McEwen, C.: CaCl_3^- or Ca_2Cl_4 Complexing Cyclic Aromatic Amide. Template Effect on Cyclization, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 1545-1546
- [49] Kirchhoff, C. J.: Design und Untersuchung von Peptiden mit Calciumkanal-modulatorischem Potential – Eine Molecular Modelling Studie-, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Diss., 2002
- [50] Klebe, G.: The Use of Composite Crystal-field environments in Molecular Recognition and the de novo design of Protein Ligands, *J. Mol. Biol.* 237(1994) 212-235
- [51] Kyte, J., Doolittle, R. F: A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105-132
- [52] Lee, Y. J. A., Chen, J., Cadene, B. T., Chait, B. T., MacKinnon, R.: Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel, *Nature* (2002) 515-522
- [53] Lipkind, G. M., Fozzard, H. A.: Modelling of the Outer Vestibule and Selectivity Filter of the L-Type Ca^{2+} -Channel, *Biochemistry* 40 (2001) 6786-6794
- [54] Lipkind, G. M., Fozzard, H. M.: Molecular Modelling of Interactions of Dihydropyridines and Phenylalkylamines with the Inner Pore of the L-Type Ca^{2+} Channel, *Mol. Pharmacol.* 63 (2002) 499-511
- [55] Liu, Y. S., Sompornpisut, P., Perozo, E.: Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state, *Nature Struct. Biol.* 8 (2001) 883-887
- [56] Loev, B., Goodman, M., Sander, K., Tedeschi, R., Macko, E.: „Hantzscht-Type“ Dihydropyridine Hypotensive Agents; *J. Med. Chem.* 17 (1975) 956-965
- [57] Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A.: Taschenatlas der Pharmakologie, Verlag Thieme, 3. Auflage, 1996
- [58] Medicine Worldwide:
http://m-ww.de/krankheiten/herz_kreislauf_erkrankungen/bluthochdruck.html
- [59] Mikala, G.; Bahinski, A.; Yatani, A.; Tang, S.; Schwartz, A.: Differential contribution by glutamate residues to an ion selectivity site in the L-type Ca^{2+} channel pore, *FEBS* 335 (1993) 265-269
- [60] Mitterdorfer, J., Wang, Z., Sinnegger, M. J., Hering, S., Striessnig, J., Grabner, M., Glossmann, H.: Two Amino Acid Residues in the IIS5 Segment of L-Type Calcium Channels Differentially Contribute to 1,4-Dihydropyridine Sensitivity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30330-30335

- [61] Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y, MacKinnon, R.: Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter, *Nature* 414 (2001) 37-42
- [62] Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M.: Stereochemical quality of protein structure coordinates, *Proteins* 12 (1992) 345- 364
- [63] Mutschler, E.: *Arzneimittelwirkungen: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, 7. Auflage 1996
- [64] Peterson, B. Z., Caterall, W. A.: Calcium Binding in the Pore of L-Type Calcium Channels Modulates High Affinity Dihydropyridine Binding, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18201-18204
- [65] Peterson, B. Z., Tanada, T. N., Caterall, W. A.: Molecular Determinants of High Affinity Dihydropyridine Binding in L-type Calcium Channels, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5293-5296
- [66] Peterson, B. Z.; Johnson, B. D.; Hockerman, G. A.; Acheson, M.; Scheuer, T.; Caterall, W. A.: Analysis of the Dihydropyridine Receptor Site of L-type Calcium Channels by Alanine-scanning Mutagenesis, *J. Mol. Biol.* 272 (1997) 18752-18758
- [67] Ponder, J. W.; Richards, F. M.: Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes, *J. Mol. Biol.* 193 (1987) 775-791
- [68] PROCHECK 3.5.4 / Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M.: PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl.Cryst.* 26 (1993) 283-291
- [69] Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, T.: A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm, *J. Mol. Biol.* 261 (1996), 470-489
- [70] Rost, B., Sander, C.: Improved Prediction of secondary structure by use of sequence profiles and neural networks, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993) 7558-7562
- [71] Rovnyak, G., Kimball, D., Beyer, B., Cucinotta, G., DiMarco, J., Gougoutas, J., Hedberg, A., Malley, M., McCarthy, J., Zhang, N., Moreland, S.: Calcium Entry Blockers and Activators: Conformational and Structural Determinants of Dihydropyridine Calcium Channel Modulators; *J. Med. Chem.* 38 (1995) 119-129
- [72] Schleifer, K. J.: Quantum Chemical Generation of a nifedipine pharmacophore Modell, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 5 (1995) 162-165
- [73] Schleifer, K. J.: Sekundärstrukturvorhersagen an spannungsabhängigen Calciumkanälen, Koppenhofer, B, Epperlein, U. (Herausgeber), *Chemie und Informatik: Terra Inkognita oder das Land der unbegrenzten Möglichkeiten?*, Shaker Verlag 1997, Aachen, 149-157

- [74] Schleifer, K. J.: Spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanal - Aufbau, Funktion und Modulation, *Pharm. Unserer Zeit* 26 (1997) 179-186
- [75] Schleifer, K. J.: Stereoselective Characterization of the 1,4-Dihydropyridine Binding Site at L-Type Calcium Channels in the Resting State and the Opened/Inactivated State; *J. Med. Chem.* 42 (1999) 2204-2211
- [76] Schleifer, K., J.: Correlation of LUMO* energies and free energies of binding for a series of nifedipine analogues, *Pharmazie* 54 (1999) 804-808
- [77] Schuster, A., Lacinova, L., Klugbauer, N., Ito, H., Birnbauer, L., Hofmann, F.: The IVS6 segment of the L-Type calcium channel is critical to the action of dihydropyridines and phenylalkylamines, *The EMBO Journal* 15 (1996) 2365-2370
- [78] SCWRL; Dunbrack, R.L.; Cohen, F.E.: Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences, *Protein Sci.* 6 (1992) 1661-1681
- [79] Silbernagl, S., Despopoulos, A.: *Taschenatlas der Physiologie*, 4.Auflage 1991, Thieme Verlag
- [80] Sinnegger, M. J., Wang, Z., Grabnert, M., Hering, S., Striessnig, J., Glossmann, H., Mitterdorfer, J., Nine L-type Amino Acid Residues Confer Full 1,4-Dihydropyridine Sensitivity to the Neuronal Calcium Channel α_{1A} -Subunit, *J. Bio. Chem.* 272 (1997) 27686-27693
- [81] SPARTAN 5.1.3, Wavefunction inc., Irvine, CA, USA
- [82] Stewart, J. J.: MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. *J Comput.-Aid. Mol. Design* 4 (1990) 1-105
- [83] Stoll, F.: *Theoretische Untersuchungen zur Entwicklung eines Prostacyclin-Modells*, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Diss., 2001
- [84] Strance, D. M., Bezanilla, F.: A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field, *Nature* 427 (2004) 548-553
- [85] Striessnig, J., Graber, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M. J., Glossmann, H.: Structural Basis of drug binding to L-Ca²⁺-channels, *Trends Pharmacol. Sci.* 19 (1998) 108-115
- [86] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ., CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic. Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680
- [87] von Heijne G, Membrane Structure Prediction. Hydrophobicity Analysis and the positive-inside rule, *J. Mol. Biol.* 225 (1992) 487-497
- [88] Vriend, G.: WHAT IF: a molecular modelling and design program, *J. Mol. Graph.* 8 (1990) 52-56
- [89] Wrisch, A., Grissmer, S.: Structural Differences of Bacterial and Mammalian K⁺ Channels, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39345-39353

- [90] www.ebi.ac.uk/embl
- [91] Yamaguchi, S., Okamura, Y., Nagao, T., Adachi-Akahane, S.: Serine Residue in the IIS5-S6 Linker of the L-Ca²⁺-Channel α_{1C} -Subunit is the Critical Determinant of the Action of Dihydropyridine Ca²⁺ Channel Agonists, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 41504-41511
- [92] Zheng, W., Stoltefuss, J., Goldmann, S., Triggle, D. J.: Pharmacologic and Radioligand Binding Studies of 1,4-Dihydropyridines in Rat Cardiac and Vascular Preparations: Stereoselectivity and Voltage Dependence of Antagonist and Activator Interactions, *Mol. Pharmacol.* 41 (1991) 535-541
- [93] Zhorov, B. S., Folkman, E. V., Ananthanarayanan, V. S.: Homology Model of Dihydropyridine Receptor: Implications for L-Type Ca²⁺ Channel Modulation by Agonists and Antagonists, *Arch Biochem Biophys* 393 (2001) 22-41

8 Anhang

8 Anhang

Anhang A: Abkürzungen

ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (angiotensin converting enzyme)
AS	Aminosäure
CT/ EDA	Charge Transfer/ Elektron-Donator-Akzeptor-Beziehung
BTZ	Benzothiazepin
DHP	Dihydropyridin
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
LUMO	Lowest Occupied Molecular Orbital
MDS	Moleküldynamiksimulation
MSA	Multiples Sequenz-Alignment
PAA	Phenylakylamin
RMSD	Root Mean Square Deviation
TM	transmembranär
VGCC	spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal (voltage-gated calcium channel)
VGIC	spannungsgesteuerter Ionenkanal (voltage-gated ion channel)
VGPC	spannungsgesteuerter K ⁺ -Kanal (voltage-gated potassium channel)

Anhang B: Aminosäuren: Drei- und Einbuchstabencode

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

Anhang C: Nomenklatur der Modelle

In Klammern ist ein Verweis auf den Abschnitt, in dem das Modell besprochen wird.

Modell-Bezeichnung	Templat	Erstellung/Modifikation
KcsA-C	KcsA	ClustalW (4.2)
KcsA-G	KcsA	Gen-Alignment mit GCG(4.4.1)
KcsA-A	KcsA	Strukturalignment, optimiert auf Liganden (4.4.6)
MthK-C	MthK	ClustalW (4.2)
MthK-G	MthK	Gen-Alignment mit GCG 4.4.1)
MthK-A	MthK	Strukturalignment optimiert auf Liganden(4.4.6)
KvAP-C	KvAP	ClustalW (4.4)
KvAP-A ₁	KvAP	Strukturalignment, die wichtigen Aminosäuren sind manuell zum Bindungsstelle orientiert worden, dann Dockingveruche (4.4.2)
KvAP-A ₂	KvAP	nach dem Docken aus KvAP-A ₁ entwickeltes Modell → endgültiges Modell dieser Arbeit (4.4.2-4.6, 4.5.1.1)
KvAP-A ₃	KvAP	wie KvAP-A ₂ , S1114 eine Aminosäure zum N-Term verschoben (4.5.1.1)

Anhang D: Benutzte Hard- und Software

Hard- und Software

Die Berechnungen dieser Arbeit wurden mit folgenden Rechnersystemen durchgeführt:

Silicon Graphics Workstations:

- IRIS INDIGO² R 10000
- IRIS O₂ R 10000
- IRIS O₂ R 12000
- Origin 2000 mit 38 R 10000 Prozessoren (am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

Folgende Software wurde benutzt:

Excel	Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft)
FDiscover	Rechenmodul des Programmpakets Insight2000 / FDiscover der Firma accelrys, mit dem verschiedene molekülmechnische und moleküldynamische Berechnungen in verschiedenen Kraftfeldern durchgeführt werden können
Insight2000	Grafikmodul des Programmpakets Insight2000 / FDiscover der Firma accelrys zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
ConQuest	Software zur Struktursuche in der <i>Cambridge Structural Database</i>
Spartan	Softwarepaket zur Durchführung von ab-initio- und semiempirischen Berechnungen, das auch umfangreiche Visualisierungsmöglcihkeiten bietet
Sybyl	Molecular-Modeling-Paket der Firma TRIPOS, mit dem molekülmechnaische und molekülmechanische Berechnungen in mehren Kraftfeldern durchgeführt werden können. Daneben bietet das Programm umfangreiche Visualisierungsmöglichkeiten und ist kompatibel mit FlexX.
AutoDock	Programm zum automatisierten Docking von Liganden in Rezeptoren, basierend auf Gridfeldern und Metropolis- oder genetischen Lamarck-Algorhithmus
FlexX	Docking-Program der Firma BiosolveIT, beruhend auf fragment-basiertem Ansatz

Anhang E: Eingabedateien

Eingabedatei der Loslassdynamik zur Ermittlung der Rückhalte­kraft auf dem Proteinrückgrat:

```
! INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
! Loslassdynamik
  overlap = 0.01

  begin simulation
*   add-automatic bond torsion valence out-of-plane
!
  reduce
!
  set dielectric = 1.000000
!
  tethered list
*   add main
*   molecule 1 residue ASN 1 to N-M 1Q
!
  initialize dynamics
*   template force with a force constant of 2000.0 kcal/A2
*   for 20000 iterations
*   at 310.000 K
*   steps of 1.000
*   no cross terms
*   no morse
*   write history file every 500 steps
*   write averages every 1000 steps
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 1500.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 1250.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 1000.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 900.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 800.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
```

```
*   template force with a force constant of 750.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 700.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 650.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 600.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 550.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 500.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 450.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 400.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 350.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 300.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
*   no morse
!
  resume dynamics
*   template force with a force constant of 250.0 kcal/A2
*   for 10000 iterations
*   no cross terms
```

```

*      no morse
!
  resume dynamics
*      template force with a force constant of 200.0 kcal/A2
*      for 10000 iterations
*      no cross terms
*      no morse
!
  resume dynamics
*      template force with a force constant of 150.0 kcal/A2
*      for 10000 iterations
*      no cross terms
*      no morse
!
  resume dynamics
*      template force with a force constant of 100.0 kcal/A2
*      for 10000 iterations
*      no cross terms
*      no morse
  resume dynamics
*      template force with a force constant of 50.0 kcal/A2
*      for 10000 iterations
*      no cross terms
*      no morse
  resume dynamics
*      template force with a force constant of 0.0 kcal/A2
*      for 10000 iterations
*      no cross terms
*      no morse
!
  end.

```

Eingabedatei der Moleküldynamiksimulationen von KvAP-A₂ / KvAP-A₃ mit S-Isradipin / S-BayK 8644:

```

!      INPUT FILE FOR DISCOVER GENERATED BY INSIGHT
!
  overlap = 0.01
  cutoff = 16.000000
  cutdis = 15.000000
  swtdis = 1.5

  begin simulation
*      add-automatic bond torsion valence out-of-plane
  reduce
!
  set dielectric = 1.000000
!
!
!
  Fixed atom list generation
*      add calpha
*      molecule 1 residue ASN 1
*      add calpha
*      molecule 1 residue ASN 26
*      add calpha
*      molecule 1 residue CYSH 27
*      add calpha
*      molecule 1 residue CYSH 64
*      add calpha
*      molecule 1 residue ASP- 90
*      add calpha

```

```
*   molecule 1 residue  ASP- 65
*   add calpha
*   molecule 1 residue  LEU  89
*   add calpha
*   molecule 1 residue  ASN 126
*   add calpha
*   molecule 1 residue  LEU 155
*   add calpha
*   molecule 1 residue  ILE 125
*   add calpha
*   molecule 1 residue  ILE 156
*   add calpha
*   molecule 1 residue  THR 193
*   add calpha
*   molecule 1 residue  ASN 194
*   add calpha
*   molecule 1 residue  MET 218
*   add calpha
*   molecule 1 residue  PHE 219
*   add calpha
*   molecule 1 residue  TRP 254
!

tethered list
*   add main
*   molecule 1 residue  ASN 1 to N-M 1Q
!

Minimize
*   template force with a force constant of 300.0 kcal/A2
*   no cross terms
*   no morse
*   for 500 iterations
*   using steep descents
*   until the maximum derivative is less than 10.000000000 kcal/A
!

Minimize
*   template force with a force constant of 300.0 kcal/A2
*   no cross terms
*   no morse
*   for 3000 iterations
*   using conjugate gradient
*   until the maximum derivative is less than 1.000000000 kcal/A
!

initialize dynamics
*   template force with a force constant of 300.0 kcal/A2
*   for 1000 iterations
*   at 310.000 K
*   steps of 1.000
*   no cross terms
*   no morse
*   write history file every 500 steps
!

inumber = 1
100 temp = 320.0
resume dynamics
*   for 5000 iterations
*   at 310.0 K
*   steps of 1.000 fs
*   with no cross terms
*   no morse
print energy/molecule
print molecule-molecule interactions
print hbonds
```

```
        archive as file number inumber
        inumber = inumber + 1
        if inumber .le. 200 then 100
!
        iloop = 1
200    retrieve file number iloop
        minimize
        *    no cross terms
        *    no morse
        *    for 200 iterations
        *    using conjugate gradient
        *    until the maximum derivative is less than 1.00000000 kcal/A
        archive as file number inumber
        inumber = inumber + 1
        iloop = iloop + 1
        if iloop .le. 200 then 200

end
```


Danksagung

Genie und Wahnsinn liegen dicht beieinander. Leider ist das Genie irgendwann ausgezogen und hat nur den Wahnsinn zurückgelassen. Bei folgenden Menschen möchte ich mich bedanken, dass sie mir geholfen haben, meinen ganz normalen Wahnsinn in Grenzen zu halten und diese Arbeit zu Ende zu bringen:

Danke an alle Kollegen. Vor allem an Barbara, Christian und Stefan vom ersten Semester für lustige Praktika mit den chemisch teilweise doch sehr unbeleckten Erstis und für jegliche Flexibilität, Dienste zu tauschen, falls man auf die Idee kommen sollte, Freizeitbeschäftigungen wie Segeln nachgehen zu wollen. Und besonders für die Schonzeit in den letzten Wochen trotz des Umzugs.

Besonderen Dank an Andrea, Kirstin und Dirk. Nicht nur für die spontane Teerunde mit fachlichen Diskussionen, sondern auch für Kochorgien mit rheinischer Kochkultur, Segeltörns, das Abfangen total frustrierter Zusammenbrüche, die gelegentliche Rettung meiner Pflanzen und die stets spontane Hilfsbereitschaft, notfalls per Telefon.

Ein ganz großer Knuddel geht an meine Bürogenossin und jetzt „Nachbarin“ Edith. Wir sind halt die von der „Klo-Etage“. Deine Offenheit und Freundlichkeit ist schöner als der Platz in der „Belle Etage“. Viel Spaß in der Klinischen Pharmazie!

Natürlich darf auch der „Breakfast Club“, bestehend aus Monika, Marcus und Boris, nicht vergessen werden. Ohne euch hätte ich vielleicht doch vergessen, dass es ein Leben außerhalb der Uni gibt. Sportlich bin zwar nicht geworden, aber vertraut mit dem Schaffensprozess junger Autoren.

Lieber Boris, Deine ausgeprägten Macken haben das Potential, mich in den Wahnsinn zu treiben! Aber manchmal waren die Email-Orgien der einzige Grund weiter zu machen. Sonst wäre diese Arbeit nie fertig geworden.

Doktoranden unter sich: der tägliche Email-Chat zwischen Essen und Düsseldorf. Vera und Christian, außerdem danke für Filmabende, Grillen, Brunchs, Zusammenflicken meines Autos und Hilfe beim Rechner.

Danke an die Uni-Segelgruppe, speziell an Sven, Oliver und Jörg. Warum man von Kiel nach Düsseldorf zieht, um Segeln zu lernen? Weiß ich doch auch nicht. Vielleicht, weil es mit euch einfach mehr Spaß macht.

Meine persönliche Gehirnwartungsexpertin Sonja ist zwar in Zürich, war aber dank modernster Technik in allen emotionalen Notfällen für mich da. Wir haben es weiter gebracht als alle dachten. Und den Rest schaffen wir auch noch! Beginnen wir mit einem Ausflug ins zak?

Mitbewohnerin, Schneiderin, Kampfgenossin in Diabloland, Rechtsbeistand und nicht zuletzt Hüterin meiner Drachen. Johanna, Du kannst so viel. Danke, das Du die letzten 13 Jahre an meiner Seite warst. Lass uns noch weitere Schlachten schlagen. Zum Beispiel am Eisbuffet?

Co-Doc Firas, Du hast recht, es gibt ein Leben nach der Promotion. Ich hoffe, der kulturelle Austausch bleibt bestehen.

Ganz lieben Dank spreche ich meinen Eltern und Geschwistern aus. Jahrelang habt ihr das „pseudo-vulkanische“ Gehabe, ganz leicht angeätzte Spülen, das Blubbern von selbst angesetztem Wein und Ähnliches ertragen. Schön, dass Franziska jetzt auch in das Alter für den ersten Chemiebaukasten kommt. Aconita ist gerne bereit, sich ihrer anzunehmen.

Zum Schluss ein Dank an die Kieler Sandra, Alexa, Florian und alle, die ungenannt blieben. Besonders an Bodhidharma oder Tsching-nung, auf jeden Fall an die Menschen, welche *Camelia sinensis* (*Theaceae*) kultivierten. Ohne Ströme heißen Tees klappt hier gar nichts, außer der Tür.

Lebenslauf

Name Andrea Vollbrecht
geboren am 14. Oktober 1973
in Schleswig

Schulbildung

1979-1983 Grundschule Tolk
1983-1987 Realschule Süderbrarup
1987-1989 Bruno-Lorenzen-Realschule Schleswig
06/1989 Mittlere Reife
1989-1992 Lornsen-Gymnasium Schleswig
05/1992 Abitur

Studium

10/1992-03/1994 Studium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04/1994-11/1998 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
11/1998 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
01/1999-12/1999 Pharmazie-Praktikum in der Apotheke am ZOB in Kiel
01/2000 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Wissenschaftliche Tätigkeit

03/2000 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Prof. Dr. H.-D. Höltje
Thema: Molecular Modelling Untersuchungen an der Dihydropyridin-Bindungsstelle von offenen Ca^{2+} -Kanälen
03/2000-06/2000 wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
seit 06/2000 Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Pharmazeutische Chemie der HHUD