

Kombinierte quanten- und molekularmechanische Untersuchungen zur Bindung von Inhibitoren der HIV-1 Protease

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Hensen

aus Perleberg

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Kuckländer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2004

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2001 bis Dezember 2004 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje. Er hat mir dieses interessante Thema überlassen und mich in hilfreichen Diskussionen immer wieder bestärkt. Die Arbeitsbedingungen an seinem Lehrstuhl waren ideale Voraussetzungen für die Erstellung dieser Arbeit. Danken möchte ich ihm ebenfalls für die große Unterstützung bei der Durchführung zweier Forschungsaufenthalte an der University of Minnesota.

Herrn Prof. Dr. J. Gao danke ich im Besonderen für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe in Minneapolis tätig sein zu dürfen. Neben seiner persönlichen Unterstützung waren auch die zur Verfügung gestellten Rechenkapazitäten sehr bedeutsam für das Ergebnis und den zeitlichen Abschluss der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Kuckländer danke ich herzlich für die Anfertigung des Gutachtens.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u> EINLEITUNG</u>	9
1.1	AIDS - Erworbenes Immunschwäche-Syndrom.....	11
1.1.1	Epidemiologie.....	11
1.1.2	Die Entdeckung des humanen Immundefizienz-Virus.....	12
1.1.3	Der Ursprung des HI-Virus.....	13
1.1.4	Der Aufbau des HI-Virus.....	15
1.1.5	Der virale Infektionszyklus.....	17
1.2	Die antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion	20
1.2.1	Reverse Transkriptase-Inhibitoren (RTI)	20
1.2.1.1	Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI).....	20
1.2.1.2	Nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NtRTI)	21
1.2.1.3	Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)	22
1.2.2	Protease-Inhibitoren (PI).....	22
1.2.3	Integrase-Inhibitoren.....	23
1.2.4	Entry-Inhibitoren	23
1.2.4.1	Fusions-Inhibitoren	23
1.2.4.2	Attachment-Inhibitoren.....	24
1.2.4.3	Co-Rezeptor-Antagonisten.....	24
1.3	Ergebnisse der antiretroviralen Therapie	24
1.3.1	Nebenwirkungen	25
1.3.2	Die Virus-Eradikation.....	26
1.3.3	Mutationen und Resistenzentwicklung	26
1.4	Die HIV-Protease.....	27
1.4.1	Entdeckung und Strukturaufklärung des Enzyms	27
1.4.2	Das aktive Zentrum	28
1.4.3	Die proteolytische Spaltung des Substrates	31
1.4.4	Entwicklung von HIV-Protease-Inhibitoren	32
1.4.5	Aussichtsreiche Inhibitoren in der klinischen Prüfung.....	35
1.4.6	Inhibitor induzierte Mutationen und Resistenzentwicklung bei der HIV-1 Protease...37	
1.4.7	Natürliche Resistenz durch Subtyp-spezifische Polymorphismen	39
2	<u> PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</u>	41
3	<u> METHODEN</u>	45
3.1	Computergestützte Simulation von Biomolekülen.....	47

3.1.1	Quantenchemische Verfahren	47
3.1.2	Kraftfeldbasierte Methoden.....	49
3.2	Minimierungen und Moleküldynamiksimulationen	51
3.2.1	Langevin-Dynamiken.....	51
3.2.2	Wahl des Zeitschritts unter Anwendung des <i>SHAKE</i> -Algorithmus	52
3.2.3	QM/MM-MD-Simulationen	53
3.3	Berechnung von relativen Bindungsaffinitäten.....	57
3.3.1	Thermodynamischer Zyklus.....	60
3.3.1.1	Thermodynamische Störungstheorie	61
3.3.1.2	Thermodynamische Integration.....	64
3.3.2	Erweiterung des thermodynamischen Zyklus	65
3.3.2.1	Bestimmung des elektrostatischen Anteils relativer Bindungsaffinitäten	66
3.3.2.2	Bestimmung des dispersiven Anteils relativer Bindungsaffinitäten	67
3.4	Quantitative Bestimmung von Polarisierungseffekten.....	68
4	<u>DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE</u>	73
4.1	Vorgehensweise	75
4.1.1	Auswahl geeigneter Inhibitoren zur Berechnung von Bindungsaffinitäten	75
4.1.2	Aufbereitung der Kristallstruktur.....	76
4.1.3	Protonierungsgrad von Asp25 und Asp25'	77
4.2	Durchführung der Moleküldynamiksimulationen.....	79
4.2.1	Modifikation der Liganden in der Kristallstruktur	79
4.2.2	Definition der QM- und MM-Regionen.....	80
4.2.3	Erstellung einer Referenzstruktur.....	81
4.2.3.1	Addition von Wasserstoffatomen.....	81
4.2.3.2	Solvatation der Enzym-Inhibitor-Komplexe.....	81
4.2.4	Definition der Randbedingungen.....	82
4.2.5	Erwärmung und Equilibrierung des Systems.....	84
4.3	Bestimmung der Bindungsenthalpiedifferenz zwischen AG1254 und AG1224	88
4.3.1	Ermittlung der elektrostatischen Anteile der Bindungsenthalpiedifferenz	88
4.3.2	Bestimmung der dispersiven Anteile der Bindungsenthalpiedifferenz	91
4.3.3	Berechnung der relativen Bindungsenthalpie	95
4.4	Untersuchung von Polarisierungseffekten der HIV-1 Protease	97
4.4.1	Durchführung der MD-Simulationen zur Untersuchung der Bindungseigenschaften	98
4.4.2	Ergebnisse der MD-Simulationen.....	100
4.4.2.1	Analyse der Wechselwirkungsenergien.....	100
4.4.2.2	Analyse des Einflusses einzelner Aminosäuren auf die Ligandenbindung	101
4.4.2.3	Analyse und Visualisierung der Polarisierung auf atomarer Ebene	104

4.5	Suche nach strukturellen Verbesserungen	107
4.5.1	Mozenavir-Derivate	107
4.5.1.1	Entwurf eines neuen Grundgerüsts mit konjugiertem System	108
4.5.1.2	Verbesserung der Substituenten.....	112
4.5.2	Tipranavir-Derivate	117
4.5.2.1	Invertierung des Sulfonamids.....	118
4.5.2.2	Ersatz des Sulfonamids durch Hydroxylgruppen	121
4.5.3	Vergleich der Elektronenwanderung der untersuchten Strukturen	127
4.6	Abschätzung von Bindungsaffinitäten	129
<u>5</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>139</u>
5.1	Protonierung der katalytischen Dyade	141
5.2	Relative Bindungsenthalpie	141
5.3	Polarisationseffekte der HIV-1 Protease	144
5.4	Vorschläge zur Optimierung von Protease-Inhibitoren.....	147
5.5	Abschätzung von Bindungsaffinitäten	148
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>151</u>
<u>7</u>	<u>LITERATUR</u>	<u>155</u>
<u>8</u>	<u>ANHANG</u>	<u>167</u>

1 EINLEITUNG

1.1 AIDS - Erworbenes Immunschwäche-Syndrom

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 1981 wurde in den USA erstmals von einer auffälligen Häufung schwerer opportunistischer Krankheitsbilder bei homosexuellen Männern berichtet [1]. Es handelte sich u.a. um ernsthafte Viruserkrankungen (z.B. Karposi-Sarkom) und parasitäre Infektionen (z.B. Pneumocystis-carinii-Pneumonie). Die Erkrankungen traten bei Menschen mit extrem geschwächtem Immunsystem auf. Heute ist die Ursache für diese Infektionen unter dem Namen *Acquired Immunodeficiency Syndrome*¹ (AIDS) bekannt.

Vor 20 Jahren war die Tragweite von AIDS noch nicht absehbar. Heutzutage ist die Gefährlichkeit der Erkrankung im Bewusstsein vieler Menschen verankert. Allein bis Ende Dezember 2002 waren bereits mehr als 30 Millionen Menschen weltweit nach einer Infektion verstorben. Mittlerweile gehört AIDS zu den größten Gefahren für Menschen, die in Afrika südlich der Sahara leben (s. Abbildung 1.1). Weltweit gesehen stellt es die viert häufigste Todesursache dar.

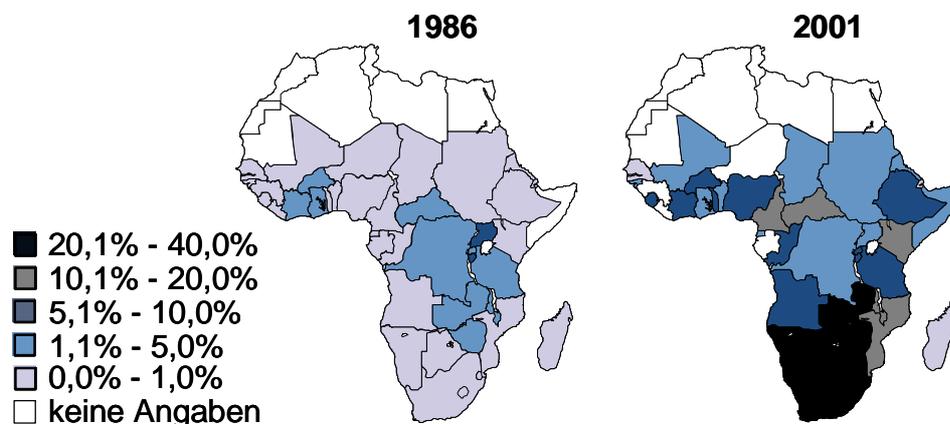


Abbildung 1.1: Anstieg der Verbreitung von AIDS in Afrika. Angegeben ist der prozentuale Anteil der HIV-Infizierten an der Bevölkerung im Alter von 15 bis 49 Jahren.

Bei AIDS handelt es sich um eine globale Epidemie, die nicht auf Subpopulationen begrenzt ist. Derzeit sind schätzungsweise 40 Millionen Menschen infiziert, wobei in einigen Gebieten ein weiterer signifikanter Anstieg erwartet wird. Im Jahr 2003 infizierten sich täglich durchschnittlich 14.000 Menschen. Folglich gehört AIDS schon heute zu den schwer wiegendsten Erkrankungen, von denen die Menschheit jemals betroffen war [2].

¹ Acquired Immunodeficiency Syndrome (engl.): erworbenes Immunschwäche-Syndrom

1.1.2 Die Entdeckung des humanen Immundefizienz-Virus

Nach anfänglichen Untersuchungen wurde vermutet, dass die Erkrankung ihre Ursache in den Zytomegalie-Infektionen der betroffenen Patienten habe [3]. Diese und weitere Theorien konnten jedoch schnell widerlegt werden, nachdem weitere Untersuchungen erfolgten. Kurze Zeit später wurde auch von ähnlichen Fällen auf Haiti und in Afrika berichtet [4]. Am Pariser Institut Pasteur entdeckte 1983 die Arbeitsgruppe von Luc Montagnier ein Retrovirus, das als Ursache für AIDS vermutet wurde [5]. Es erhielt den Namen Lymphadenopathy Associated Virus¹ (LAV). Zeitgleich beschrieben auch Robert Gallo und seine Mitarbeiter vom National Health Cancer Institute in Bethesda ein Virus mit der Bezeichnung Human T-cell Leukemia Virus Type 3 (HTLV-3) [6].

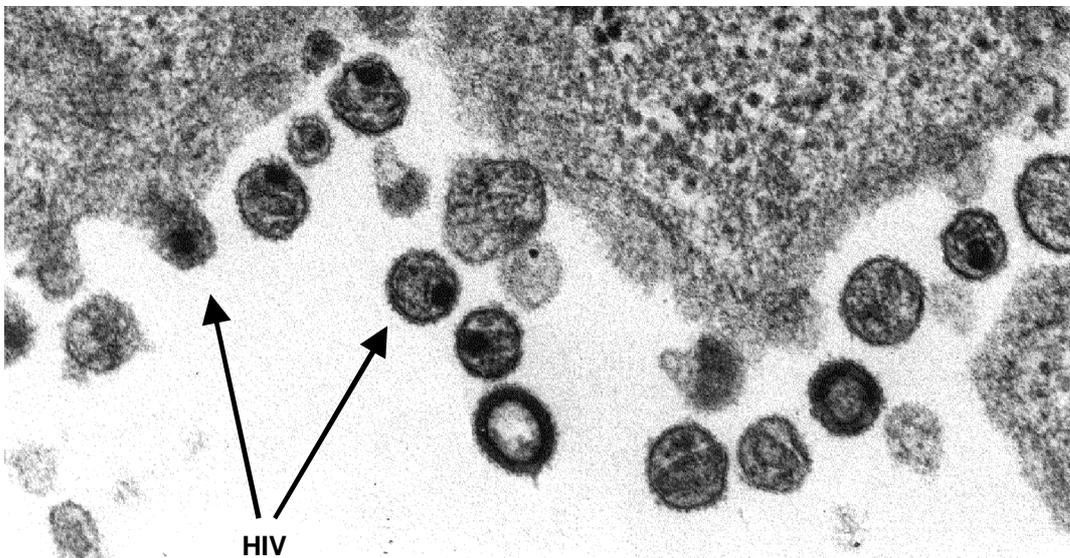


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HI-Viren an infiziertem Gewebe.

Im Ergebnis ihrer Forschungen beanspruchten beide Wissenschaftler die Entdeckung des AIDS-verursachenden Virus für sich. Es folgte ein mehrjähriger wissenschaftlicher Streit. Erst im Jahr 1986 wurde bestätigt, dass LAV und HTLV-3 identisch sind. Der Retrovirus erhielt den Namen *Human Immunodeficiency Virus*² (HIV) (s. Abbildung 1.2) und Montagnier und Gallo einigten sich schließlich 1987 auf einen Kompromiss, wonach die Patenteinnahmen geteilt wurden.

Eine weitere Virusvariante wurde 1986 entdeckt [7]. Sie wurde bisher fast ausschließlich in Zentral- und Ostafrika gefunden, trat aber auch schon in

¹ Lymphadenopathy Associated Virus (engl.):

² Human Immunodeficiency Virus (engl.): menschliches Immunschwächevirus

Indien auf. Diese Virusvariante wird als HIV-2 bezeichnet im Gegensatz zu HIV-1, das der Auslöser der Epidemien in Amerika und Europa war.

1.1.3 Der Ursprung des HI-Virus

Die Geschichte des HI-Virus begann schon lange vor der erstmaligen Entdeckung von AIDS. Die älteste Blutprobe, in der die Viren nachgewiesen werden konnten, stammt aus dem Jahr 1959 von einem Mann aus Kinshasa [8].

Es gilt heute als unumstritten, dass HIV vom *Simian Immunodeficiency Virus*¹ (SIV) abstammt, welches wie HIV zur Familie der Lentiviren gehört und bei Affen ähnliche Erkrankungen auslöst. HIV-1 und HIV-2 sind die einzigen bekannten humanpathogenen Retroviren dieser Familie. Untersuchungen zur Verwandtschaft der einzelnen Virenstämme zeigten, dass die beiden Vertreter zu bestimmten Varianten des SIV größere Ähnlichkeiten besitzen als untereinander [9]. Es wird angenommen, dass die Aufspaltung vor etwa 900 ± 300 Jahren in Zentralafrika erfolgte [10].

HIV-1 entstand wahrscheinlich durch drei unterschiedliche zoonotische Transmissionen² von SIV_{cpz} auf den Menschen, wodurch die drei HIV-1 Gruppen M³, O⁴ und N⁵ entstanden sind. Im Menschen kam es anschließend vermutlich zur weiteren Diversifikation der HIV-1 Gruppen unter Ausbildung der einzelnen Subtypen (s. Abbildung 1.3) [11][12].

SIV_{cpz} benutzte ursprünglich eine bestimmte Schimpansenart (*Pan troglodytes*) als Wirt. In Zentralafrika gehörten Schimpansen zu den Tieren, die zur Ernährung gejagt sowie als Haustiere gehalten wurden. So wird eine Übertragung vom Tier auf den Mensch u.a. durch Verletzungen, die durch infizierte Haustiere verursacht wurden, vermutet. In einigen afrikanischen Kulturen war auch der Verzehr von rohem Fleisch üblich, wodurch es ebenfalls zur Überwindung der Speziesgrenze des Virus gekommen sein kann. Für Viren der HIV-1 Gruppe M wird angenommen, dass eine Übertragung auf den Menschen bereits vor 1940 erfolgte [9].

¹ Simian Immunodeficiency Virus (engl.): Simianes Immunschwächevirus

² zoonotische Transmission (lat.): von Tieren auf den Menschen übertragene Infektionskrankheit

³ M: major (engl.): bedeutend

⁴ O: outlier (engl.): Ausreißer

⁵ N: non-M, non-O

HIV-2 stammt hingegen wahrscheinlich von SIV_{sm} ab, welches bei einer bestimmten Art von Altweltaffen (*Cercocebus atys*) nachgewiesen wurde [14]. Die unterschiedlichen HIV-2 Subtypen sind vermutlich ebenfalls durch unabhängige Zoonosen entstanden (s. Abbildung 1.3).

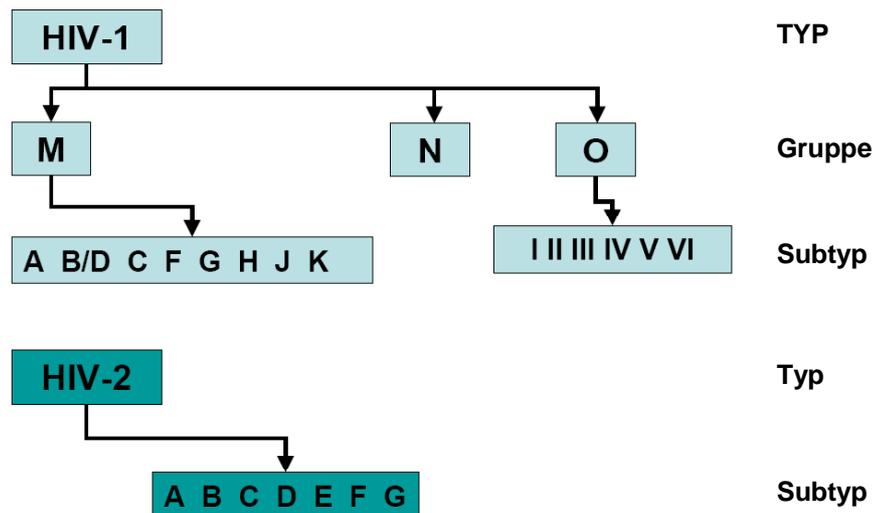


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Varianten von HIV

Die Verbreitung der Viren war ursprünglich nur auf kleine Gebiete Westafrikas beschränkt, weitete sich jedoch in zunehmendem Maße mit der Erschließung des Kontinents z.B. durch den Straßenbau aus. Bedingt durch das enorme Bevölkerungswachstum und die Urbanisierung kam es auf dem afrikanischen Kontinent zu einer schnellen Ausbreitung der Krankheit. Sie wurde jedoch insbesondere aufgrund der niedrigen Lebenserwartung und der schlechten medizinischen Versorgung zunächst nicht erkannt. Unter anderem fand das Virus über Gastarbeiter, die in Zaire (Afrika) Mitte der siebziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts arbeiteten, seinen Weg in die Karibik. Da der Ausbruch der Erkrankung erst bis zu 10 Jahren nach der Infektion erfolgt, kehrten die Gastarbeiter scheinbar gesund in ihre Heimat zurück. Das Virus konnte sich unerkannt auf den karibischen Inseln verbreiten. Die erstmalige Beschreibung der Virusinfektion bei homosexuellen Männern aus Los Angeles lässt sich darauf zurückführen, dass die karibische Inselwelt zu den Hauptreisezielen homosexueller Amerikaner gehörte.

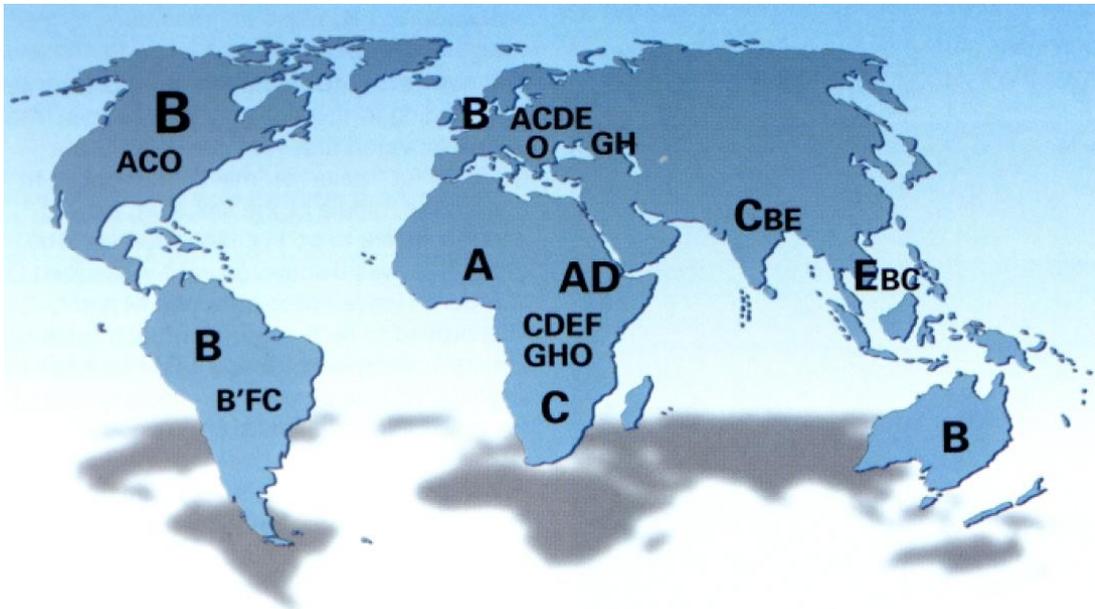


Abbildung 1.4: Geographische Verteilung von HIV-1 Subtypen.

Für die weltweite Pandemie sind hauptsächlich die Viren der Gruppe M verantwortlich (s. Abbildung 1.4). Innerhalb dieser Gruppe ist eine Klassifizierung anhand der phylogenetischen Strukturen in die Subtypen A-D, F-H, J und K möglich. Weltweit am häufigsten sind Subtyp C-Infektionen. In Europa und Nordamerika dominiert der Subtyp B. Die Subtypen A und F lassen sich noch in weitere Subklassen unterteilen [13].

1.1.4 Der Aufbau des HI-Virus

Das HI-Virus ist ein Retrovirus von kugeliger Gestalt mit einem Radius von etwa 80 bis 100 nm [15]. Die Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschichtmembran mit verschiedenen zellulären Membranproteinen. Das Transmembranprotein gp41 und das Oberflächenprotein gp120 sind in der äußeren Membran angeordnet. Die Innenseite der Membran kleidet das Matrixprotein p17 aus.

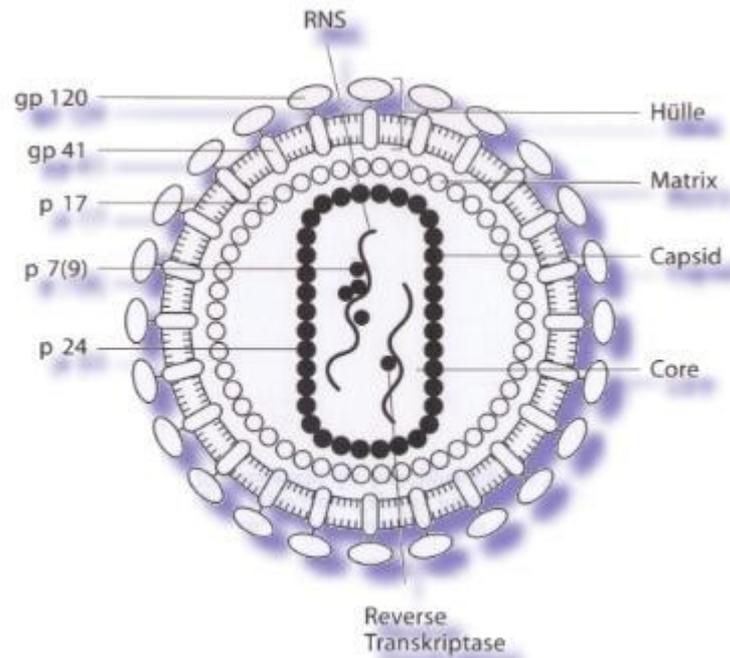


Abbildung 1.5: Struktur des HI-Virus.

Das Capsid-Protein p24 bildet eine Hülle, das so genannte Viruscapsid, in dem sich zwei Kopien der viralen RNA¹ befinden. Neben der RNA liegen im Viruscapsid auch verschiedene Kopien der Nucleocapsid-Proteine p6 und p7, die Hilfsproteine Vif, Vpr und Nef sowie die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) vor [16]. Andere akzessorische Hilfsproteine sind Tat, Rev und Vpu, die aller Wahrscheinlichkeit nach nicht im Virus vorkommen. Sie werden in der infizierten Wirtszelle synthetisiert und besitzen regulatorische Aufgaben bei der Transkription der viralen DNA², der Synthese von viralen Proteinen sowie beim korrekten Zusammenbau neuer Virionen³.

Die RNA umfasst etwa 9000 Basenpaare und bildet das virale Genom (s. Abbildung 1.6). Das HIV-Genom codiert 15 Proteine, die auf mehreren offenen Leserahmen codiert werden [17]. So sind die genetischen Informationen der retroviralen Polyproteine Gag, Pol und Env auf je einem Leserahmen enthalten. Die Polyproteine werden durch Proteasen in ihre Funktionseinheiten zerlegt. Hierbei werden aus dem Gag-Polyprotein die Proteine p17, p24 und p7 sowie p6 freigesetzt. Die drei Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease

¹ RNA, ribonucleic acid (engl.): Ribonukleinsäure, Träger der genetischen Information bei HIV

² DNA, desoxyribonucleic acid (engl.) Desoxyribonukleinsäure

³ Virion (griech.): infektiöses Virus

bilden sich aus dem Pol-Polyprotein. Die Glykoproteine gp41 und gp120 werden aus dem Env-Protein hydrolysiert.

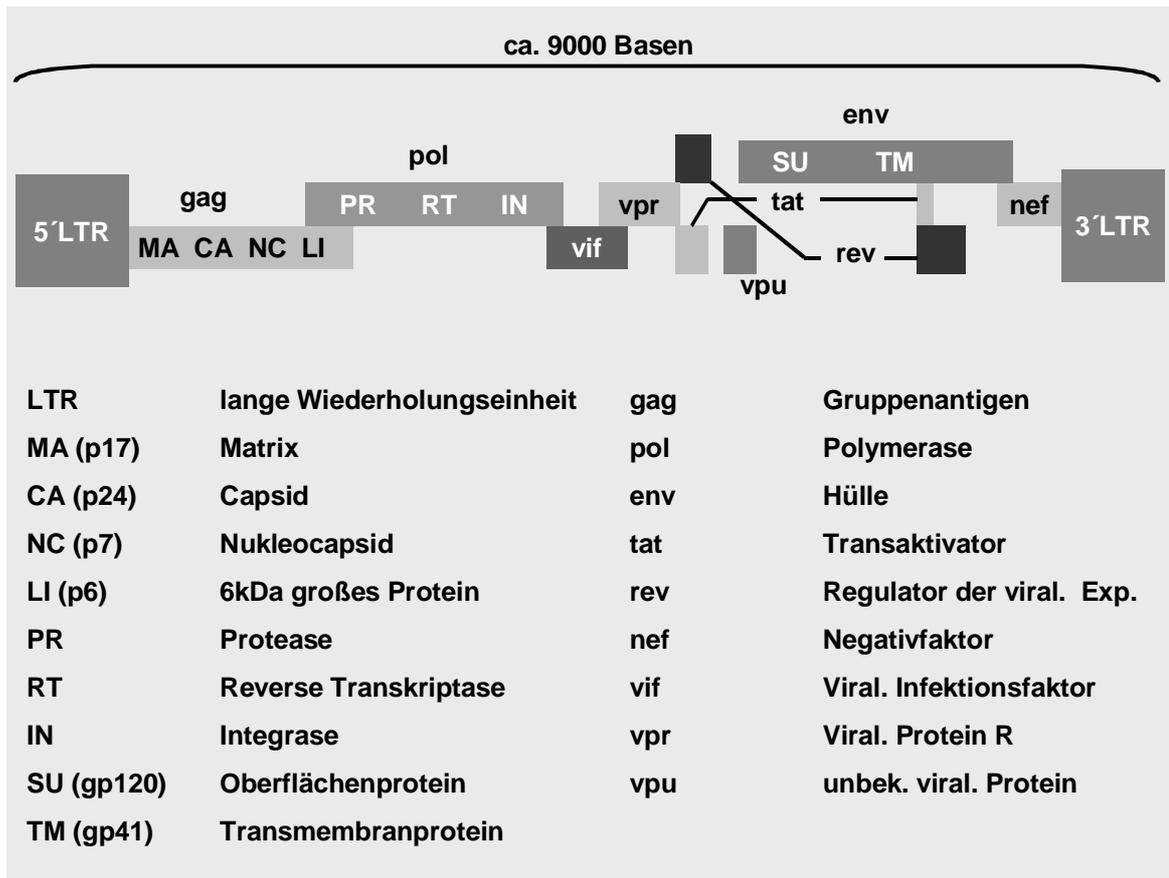


Abbildung 1.6: Aufbau des HIV-Genoms.

1.1.5 Der virale Infektionszyklus

Die Beschreibung der Replikation erfolgt anhand der Abbildung 1.7. Erläuterungen zu grundlegenden Begriffen der Biologie können u.a. in [18] nachgelesen werden.

Die Replikation beginnt mit der Infektion der Wirtszelle durch das Virus (A). Zur Fusion von Virus und Wirtszelle ist es erforderlich, dass eine spezifische Bindung des Oberflächenproteins gp120 an einen CD4-Rezeptor¹ der Zielzelle erfolgt. Dieser Rezeptor ist auf CD4⁺-T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Gliazellen zu finden, die somit mögliche Wirtszellen für HIV darstellen. Zusätzlich sind weitere Co-Rezeptoren für eine effiziente Aufnahme des Virus in die Zelle notwendig. Die Bindung von gp120 am CD4-Rezeptor verursacht eine Änderung der räumlichen Struktur von Env. Auf diese

¹ CD = cluster of differentiation (engl.): Einteilung von Leukozytendifferenzierungs-Antigenen

Weise wird eine zweite Bindung über einen Co-Rezeptor möglich [19]. Zu den Co-Rezeptoren für HI-Viren zählen Chemokin-Rezeptoren (CCR5- oder CXCR4) aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die intrazelluläres Calcium mobilisieren und die Leukozyten-Taxis induzieren [20]. In Folge der Bindung des Virus ändert auch gp41 seine Konformation, sodass die Virusmembran mit der Membran der zukünftigen Wirtszelle fusionieren kann. Nach dem Abstreifen der Membran befindet sich der Nukleoproteinkomplex, bestehend aus dem Capsid und einem Teil der Matrixproteine, im Zytoplasma der Wirtszelle.

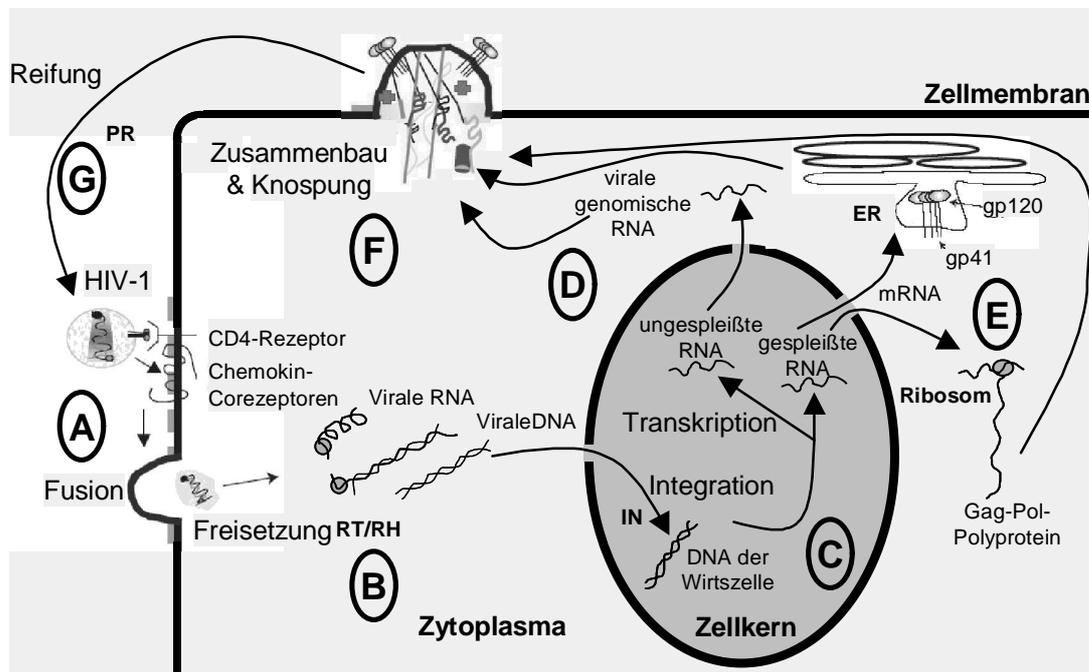


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HI-Viren.

Im Anschluss an die erfolgreiche Infektion der Wirtszelle beginnt die Reverse Transkriptase mit der DNA-Synthese an der genomischen RNA (B). Zunächst entsteht ein Hybrid aus RNA und DNA, dann hydrolysiert eine zelluläre RNaseH (RH) den noch vorhandenen RNA-Anteil und die Reverse Transkriptase vervollständigt im Anschluss den DNA-Doppelstrang. Die Reverse Transkriptase besitzt keine Möglichkeit zur Überprüfung der Lesegenauigkeit und damit der Richtigkeit des synthetisierten DNA-Moleküls. Das führt bei der Synthese der beiden DNA-Stränge mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} zum Einbau von falsch gepaarten Basen. Pro Replikationsrunde und Genom entsteht daher etwa eine Mutation [21]. Untersuchungen haben gezeigt, dass täglich ca. 10 Milliarden neuartige Viruspartikel entstehen [22]. Die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase ist so für die schnelle Bildung einer Vielzahl von nahe verwandten, aber genetisch unterschiedlichen HIV-Varianten, die als „Quasispezies“ bezeichnet werden, verantwortlich. Diese Mutationen

führen jedoch fast alle zu nicht vermehrungsfähigen Viren. Die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase ist u.a. ein Grund für das rasche Auftreten von resistenten Viren unter antiretroviraler Therapie.

Das transkribierte Virusgenom wird nun zusammen mit den Capsidkomponenten als Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert. Dort wird die virale DNA in das Wirtsgenom durch die viruseigene Integrase eingebunden (C).

Die Bildung neuer Viruspartikel startet mit der Transkription der proviralen DNA. Dazu beginnt die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II an einem Promoter der terminalen Wiederholungseinheit 5'-LTR mit der Ablesung der genetischen Information. Für die Initiierung sind nur die humanen Transkriptionsfaktoren NF- κ B, Sp1 und TBP notwendig. Jedoch wird die Ablesung wesentlich effizienter, sobald das virale regulatorische Protein Tat entstanden ist, welches an der neu entstehenden RNA bindet und die Synthese um den Faktor 100 erhöht [23].

Das virale regulatorische Protein Rev wird benötigt, um ungespleißte DNA-Abschriften aus dem Zellkern zu transportieren. Es bindet an entsprechenden Erkennungselementen der RNA und verhindert ein Spleißen. So kommt es zu einer Ansammlung viraler RNA im Zytoplasma, die für die neuen Virionen als Genom benötigt werden (D) [24].

Zur Proteinsynthese werden die gebildeten mRNAs ins Zytoplasma transportiert (E). Die durch Translation an freien Ribosomen entstandenen Gag- und Gag-Pol-Polyproteine werden zur Zellmembran transportiert. Die Translation der Env-mRNA erfolgt an Polyribosomen des endoplasmatischen Retikulums. Dabei sind die synthetisierten Proteine in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert und werden über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Während des Transports erfolgt die vollständige Prozessierung in den externen (gp120) und in den membranverankerten Proteinanteil (gp41).

Der Zusammenbau der Viruspartikel findet an Plasmamembranen statt. Nach der Virion-Bildung aus genomischer RNA, Vif, Vpr, Nef, Gag- und Gag-Pol-Polyproteinen verlassen die Viruspartikel die Wirtszelle durch Knospung (F).

Ein HIV-Partikel wird jedoch erst nach der Reifung infektiös (G). Hierzu müssen die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine durch die Protease in funktionelle Einheiten gespalten werden. So entstehen direkt nach der Knospung zuerst autokatalytisch die Protease selbst und im Anschluss die Reverse Transkriptase und die Integrase sowie die Proteine p17, p24, p7 und p6.

Als letzten Schritt vor einer erneuten Infektion einer Wirtszelle ist die Endozytose von auf der Zellmembran befindlichen CD4-Rezeptoren notwendig, um eine Agglutination von Viruspartikeln zu verhindern.

1.2 Die antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion

Die wissenschaftlichen Anstrengungen der letzten 20 Jahre haben zu einer großen Zahl von zugelassenen Wirkstoffen geführt, die zur Virusrepression nach einer HIV-Infektion eingesetzt werden können. Dabei werden verschiedene Angriffstellen genutzt, um die Virusreplikation zu hemmen. Trotzdem ist es bisher nicht gelungen, eine Möglichkeit zur kurativen Therapie zu finden, sodass der Schutz des Menschen vor einer Infektion weiterhin oberste Priorität besitzt und durch Aufklärungskampagnen unterstützt werden sollte. Des Weiteren sind erste Impfstoffe mittlerweile zu klinischen Studien zugelassen worden. Jedoch ist bisher nicht absehbar, ob diese erfolgreich verlaufen werden und wann sie in großem Umfang eingesetzt werden können, um die weltweite Epidemie zu bekämpfen. Erst im vergangenen Jahr scheiterte in Thailand eine größere Phase III Studie, die an mehreren tausend Patienten durchgeführt wurde [26].

Wirkstoffe, die bei erfolgter Infektion eingesetzt werden, lassen sich in mehrere Gruppen einteilen und werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Reverse Transkriptase-Inhibitoren (RTI)

1.2.1.1 Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

Im Jahr 1987 wurde die erste antiretrovirale Substanz, Zidovudin, zur HIV-Therapie zugelassen (s. Abbildung 1.8). Mit ihr war es erstmalig möglich, die viruseigene Reverse Transkriptase bei HIV-Patienten zu hemmen und somit die Viruslast zu senken [26]. Zidovudin ist ein Didesoxynukleosid, das von zellulären Kinasen durch Triphosphorylierung in seine aktive Form überführt und danach als Substrat bei der Transkription erkannt wird. Die virusstatische Wirkung beruht zum einen auf einer kompetitiven Hemmung der RT, zum anderen auf dem Kettenabbruch bei der Synthese der proviralen DNA, bedingt durch die fehlende 3'-OH-Gruppe der Desoxyribose. Die Affinität des Zidovudin zur RT ist etwa einhundertmal höher als zu den zellulären DNA-Polymerasen [27]. Als weitere Vertreter dieser Substanzklasse sind Didanosin, Zalcitabin, Stavudin, Lamivudin und Abacavir ebenso zur Therapie zugelassen (s. Tabelle 1.1).

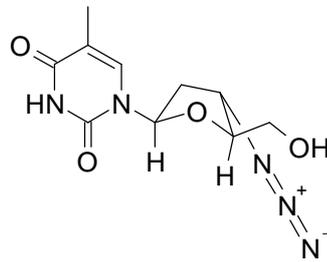


Abbildung 1.8: Chemische Struktur von Zidovudin.

1.2.1.2 Nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NtRTI)

Im Gegensatz zu den Nukleosidanaloga besitzen Nukleotidanaloga bereits eine gebundene Phosphatgruppe. Die erste Substanz, das Tenofovir DF (Disoproxil Fumarat), wurde im Jahr 2002 in Deutschland zur Behandlung zugelassen (s. Abbildung 1.9). Es handelt sich um ein Adeninphosphonatanalogon. Die Aktivierung zum Triphosphatanalogon als Substrat für die RT wird durch die bereits vorhandene Phosphatgruppe beschleunigt, da die Bildung des Monophosphats durch Kinasen häufig nur mit relativ geringer Aktivität erfolgt [28].

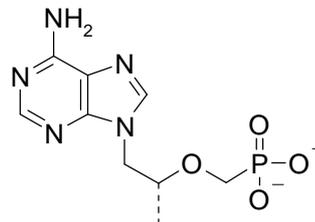


Abbildung 1.9: Chemische Struktur von Tenofovir.

Tabelle 1.1: Nukleosidische/-tidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren

Wirkstoffname	Code	Jahr der Zulassung
Zidovudin	AZT/ZDV	1987
Didanosin	DDI	1991
Zalcitabin	DDC	1992
Stavudin	D4T	1994
Lamivudin	3TC	1995
Abacavir	1592U89	1998
Tenofovir ^a	PMPA	2001

^a Prodrug eines Nukleotidanalagon

1.2.1.3 Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI)

Die Substanzen dieser Klasse dienen der RT nicht als Substrat, sondern binden allosterisch in einer hydrophoben Seitentasche in der Nähe des aktiven Zentrums [29]. Neben der räumlichen Nachbarschaft besteht auch eine funktionelle Assoziation zwischen der NNRTI-Bindungsstelle und dem aktiven Zentrum der RT. So kann durch eine Kombination von NRTI und NNRTI die Hemmung des Enzyms gesteigert werden [30]. Als erster NNRTI wurde Nevirapin 1996 (s. Abbildung 1.10) zur Behandlung zugelassen. Später folgten Delavirdin und Efavirenz (s. Tabelle 1.2).

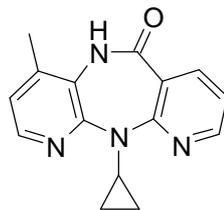


Abbildung 1.10: Chemische Struktur von Nevirapin.

Tabelle 1.2: Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren

Wirkstoffname	Code	Jahr der Zulassung
Nevirapin	BI-RG-587	1996
Delavirdin	U-90152	1997
Efavirenz	DMP-266	1998

1.2.2 Protease-Inhibitoren (PI)

Die HIV-Protease stellt ein weiteres Enzym des HI-Virus dar, für welches Hemmstoffe zur Behandlung eingeführt werden konnten. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der Protease im Jahr 1989 [31][32] wurde gezieltes Wirkstoffdesign ermöglicht und führte zur erfolgreichen Entwicklung von Inhibitoren. Saquinavir erhielt als erste Substanz im Dezember 1995 die Zulassung zur Behandlung. Wenige Monate später folgten Ritonavir, Indinavir und Nelfinavir, sodass nach kurzer Zeit eine größere Auswahl an Substanzen verfügbar war, die die Therapie der HIV-Infektion revolutionierten. Infolge der Einführung dieser neuen Wirkstoffgruppe wurde das HAART-Behandlungsschema entwickelt (s. Kapitel 1.3).

Tabelle 1.3: Protease-Inhibitoren

Wirkstoffname	Code	Jahr der Zulassung
Saquinavir	Ro 31-8959	1995
Ritonavir	ABT-538	1996
Indinavir	MK-639	1996
Nelfinavir	AG-1343	1997
Amprenavir	VX-478	1999
Lopinavir	ABT-378	2000
Atazanavir	BMS-232632	2004

Inzwischen werden weitere Substanzen (Lopinavir, Amprenavir und Atazanavir) therapeutisch genutzt. Gravierende Wirkunterschiede wurden bisher nicht festgestellt. Ein Problem stellen jedoch die relativ ausgeprägten Kreuzresistenzen dar.

1.2.3 Integrase-Inhibitoren

Es wird schon seit einigen Jahren nach Hemmstoffen für ein drittes viruseigenes Enzym, die Integrase, geforscht. Frühe Inhibitoren mit guter *in vitro* Wirksamkeit zeigten jedoch zu geringe *in vivo* Effekte [33]. Inzwischen wurde eine neuere Substanz, S-1360, zu klinischen Phase II Studien zugelassen [34].

1.2.4 Entry-Inhibitoren

Der Eintritt der HI-Viren in CD4-Wirtszellen stellt eine neu erforschte Möglichkeit zur Hemmung der Replikation dar. Dabei gibt es drei Schlüsselpositionen, die sich zur Inhibition eignen.

1.2.4.1 Fusions-Inhibitoren

Inhibitoren dieser Gruppe binden am Transmembran-Protein gp41, das erst während der Fusion des HI-Virus mit der Wirtszelle für die Bindung zugänglich wird. Mit Enfuvirtid (T-20), das im Jahr 2003 seine Zulassung erhielt, ist nun eine weitere Möglichkeit geschaffen worden, die Viruslast insbesondere von intensiv behandelten Patienten zu senken. Enfuvirtid ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid, das subkutan verabreicht wird. Ein Problem der Fusionsinhibitoren liegt in ihrer aufwändigen Synthese. Zur Herstellung von

Enfuvirtid sind 106 Syntheseschritte notwendig, was zu besonders hohen Produktionskosten führt. Die Entwicklung des Inhibitors T-1249 wurde daher vorerst gestoppt, obwohl erste klinische Studien ebenfalls erfolgsversprechend waren [34].

1.2.4.2 Attachment¹-Inhibitoren

Bei den *Attachment*-Inhibitoren handelt es sich um Substanzen, die reversibel am Oberflächenprotein gp120 binden und so eine Interaktion mit den CD4-Rezeptoren der Wirtszellen verhindern. Erste Vertreter dieser Gruppe weisen noch Probleme auf. So ist das gut peroral verfügbare BMS-806 nur bei einigen HIV-Isolaten wirksam, wodurch die Gefahr der Resistenzbildung relativ groß ist [35]. Das lösliche Antikörper-ähnliche Fusionsprotein Pro-542 zeigt hingegen erstaunliche Wirksamkeit, kann jedoch bisher nur als Infusion verabreicht werden [34].

1.2.4.3 Co-Rezeptor-Antagonisten

Zu den Co-Rezeptor-Antagonisten gehören Substanzen, die Hemmstoffe des CCR5- oder CXCR4-Rezeptors darstellen. Die Substanzen sind derzeit noch in frühen Entwicklungsstadien. Erste Erfolge wurden mit SCH-C und PRO-140 beim CCR5-Rezeptor sowie mit AMD-3100 und T-22 beim CXCR4-Rezeptor erreicht [34][36][37].

1.3 Ergebnisse der antiretroviralen Therapie

Bis zur Mitte der neunziger Jahre stellte Zidovudin die empfohlene Behandlungsmethode in der AIDS-Therapie dar. Der Erfolg der Behandlung beschränkte sich jedoch auf eine durchschnittliche Lebensverlängerung um zwei Jahre [38].

Die Zulassung von weiteren nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitoren ermöglichte eine Kombinationsbehandlung aus zwei Wirkstoffen, da klinische Studien zeigten, dass so eine größere Hemmung der RT zu erreichen war.

Eine erhebliche Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten ergab sich ab dem Jahr 1995 durch die Einführung von Hemmstoffen der HIV-1 Protease. So wurde u.a. die Tripel-Therapie etabliert, welche aus zwei Hemmstoffen der Reversen Transkriptase und einem Protease-Inhibitor besteht. Dieses unter der

¹ Attachment (engl): Anlagerung

Bezeichnung *Highly Active Antiretroviral Therapy*¹ (HAART) bis heute angewendete Therapieregime führte in den ersten drei Jahren nach seiner Einführung in den USA zu einer Senkung der jährlichen Sterblichkeitsrate von 30% auf 9% [39]. Der Erfolg der HAART-Medikation zeigt sich unter anderem auch an den sinkenden AIDS-Fallzahlen trotz gleich bleibender Neuinfektionsraten. So ist es durch die Anwendung derartiger Wirkstoffkombinationen möglich, die Viruszahl bis unter die Nachweisgrenze von 50 Kopien pro Milliliter Blut zu senken.

Probleme ergeben sich häufig bei der Patientencompliance, da die Anzahl der mehrmals täglich einzunehmenden Medikamente enorm hoch ist. Aus diesen Praxiserfahrungen ergab sich ein weiteres Ziel zukünftiger Forschungen, welche die Entwicklung von Medikamenten beinhaltet, die nur einmal pro Tag oder Woche eingenommen werden müssen.

Es bleibt anzumerken, dass die jährlichen Kosten für die intensive antiretrovirale Therapie etwa 10.000,- € pro AIDS-Patient betragen und insofern vielen Infizierten aus finanziellen Gründen bisher nicht adäquat geholfen werden kann.

1.3.1 Nebenwirkungen

Vor 15 Jahren gab es als Alternative zur Behandlung mit NRTI nur ein schnelles Voranschreiten der Erkrankung mit baldigem Tod. Daher war ihre DNA-Toxizität ein wenig bedeutsamer Nebeneffekt. Heutzutage führt die angewandte Kombinationstherapie zu einer deutlichen Lebensverlängerung von HIV-Patienten. Dies bewirkt auch eine stärkere Auffälligkeit und Relevanz von Nebenwirkungen der eingesetzten Wirkstoffe.

Die mitochondriale Toxizität stellt eine ernsthafte Nebenwirkung der Behandlung mit NRTI dar. Es kommt dabei zur Störung des Stoffwechsels der Mitochondrien durch Hemmung ihrer DNA-Polymerase γ , wodurch sie degenerieren [40]. Die Energieversorgung der betroffenen Zellen wird gestört, was einen katastrophalen Effekt insbesondere für Leber- und Pankreaszellen hat. Hepatotoxizität, Laktatazidose und Pankreatitis sind klinische Befunde dieser Nebenwirkung.

Bei der Behandlung mit Protease-Inhibitoren treten häufig gastrointestinale Störungen auf [41]. Eine Ursache dafür liegt vermutlich darin, dass die eingesetzten Inhibitoren auch eine relativ hohe Affinität zum wichtigsten Enzym

¹ Highly Active Antiretroviral Therapy (engl.): Hochaktive Antiretrovirale Therapie

des Magens, dem Pepsin, besitzen. Durch die Hemmung dieses Enzyms kommt es nur noch zu einem unvollständigen Abbau der aufgenommenen Nahrung und in dessen Folge zu verschiedenartigen Beschwerden des Magen-Darm-Traktes.

Eine für den Therapieerfolg notwendige Langzeitbehandlung mit Proteaseinhibitoren führt vielfach zum Lipidodystrophie-Syndrom, einer Fettumverteilungserkrankung. Hierbei kommt es zu signifikanten Aussehens-Veränderungen sowie Störungen des Lipid- und Glukosemetabolismus, die zu Insulinresistenz und Diabetes führen können [42].

1.3.2 Die Virus-Eradikation

Bereits wenige Monate nach dem Beginn einer antiretroviralen Kombinationstherapie kommt es zu einer signifikanten Absenkung der Viruslast. Das führte am Ende des letzten Jahrhunderts zu der Vermutung, dass durch diese Behandlungsmethode eine Eradikation der HIV-Infektion innerhalb weniger Jahre möglich sei [43]. Heutzutage geht man davon aus, dass eine Heilung nicht möglich sein wird. Ein Grund dafür sind die latent infizierten CD4-Zellen, die ein wahrscheinlich lebenslang bestehendes Reservoir an Viren bilden. Dieses Reservoir besitzt eine Halbwertszeit von ca. 44 Monaten, wodurch eine Eradikation ca. 60 bis 73 Jahren benötigen würde [44]. Die virale Replikation findet in diesen Zellen, die u.a. im Blut und in den Lymphknoten [45] vorkommen, auch noch nach Jahren intensiver Behandlung statt [46]. Es wurde bisher erfolglos versucht, die latenten Reservoirs mittels verschiedener Substanzen auszuwaschen, sodass man resümieren muss, dass eine Heilung mit den heutigen Mitteln nicht möglich ist [47].

1.3.3 Mutationen und Resistenzentwicklung

Die intensive Behandlung der HIV-Infektion führt häufig für einige Jahre zur Senkung der Viruslast bis unter die Nachweisgrenze. Hierdurch erholt sich das Immunsystem deutlich. Der Erfolg kann aber durch die Entwicklung resistenter Viren erheblich eingeschränkt werden. Dabei funktioniert die Resistenzbildung als *Escape*¹-Mechanismus, bei dem die unter Behandlung mit antiretroviralen Medikamenten replikationsfähigen Viren zur dominanten Spezies selektiert werden. Eine Folge der Resistenzbildung ist ein Wiederanstieg der Viruslast und somit ein Therapieversagen. Durch das Auftreten von Resistenzen gegen

¹ Escape (engl.): Rettung

mehrere Medikamentenklassen werden die Möglichkeiten nachfolgender Therapieregime deutlich eingeschränkt und Folgetherapien haben meist nur noch einen vorübergehenden Erfolg.

1.4 Die HIV-Protease

1.4.1 Entdeckung und Strukturaufklärung des Enzyms

1985 wurde erstmalig postuliert, dass das HI-Virus eine Protease besitzt, die zur Familie der Aspartylproteasen gehört [48]. Begründet wurde diese Zuordnung durch die Identifizierung der für Aspartylproteasen typischen katalytischen Triade, bestehend aus der Sequenz Asp-(Ser/Thr)-Gly. Die experimentelle Bestätigung erfolgte 1988 [49] und bereits 1989 konnte die räumliche Struktur der HIV-1 Protease (HIV-1 PR) aufgeklärt werden [31][32], wodurch vorherige Postulate bestätigt wurden.

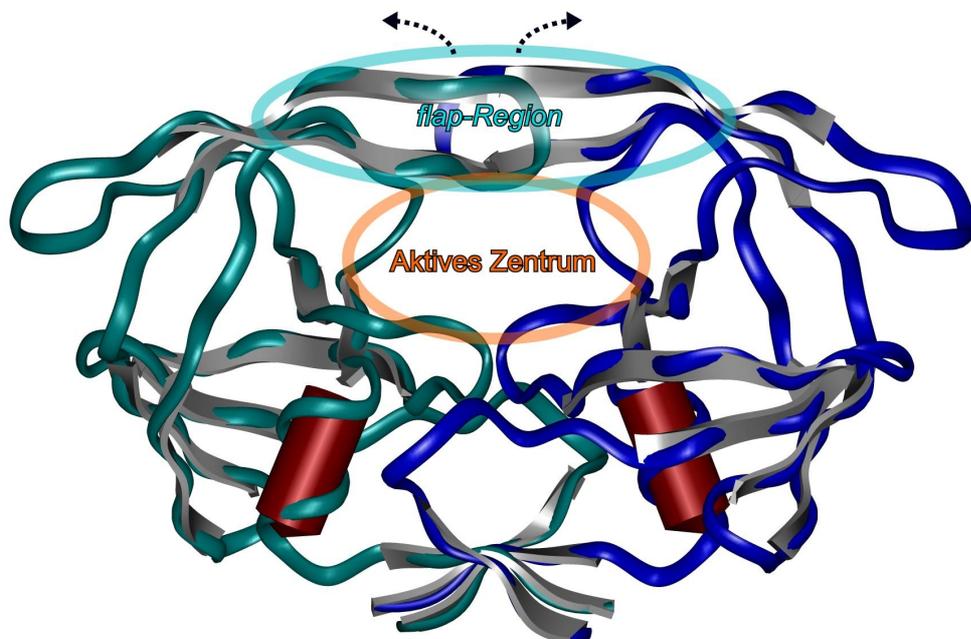


Abbildung 1.11: Kristallstruktur der HIV-Protease. (PDB-Code¹: 5HVP [50][51]) Die Proteinketten sind als Bänder entsprechend der Monomere in blau und türkis eingefärbt. α -Helices sind in rot und β -Faltblätter in grau dargestellt. Das aktive Zentrum und die angrenzende *flap*-Region sind im Text näher beschrieben.

Im Gegensatz zu humanen Aspartylproteasen wie Pepsin, Renin, Kathepsin D und Chymosin handelt es sich bei der HIV-1 PR um ein homodimeres Enzym,

¹ PDB-Code = Proteindatenbank-Identifikationscode

das aus zwei identischen Monomeren aufgebaut ist. Wie in Abbildung 1.11 zu erkennen, sind die beiden Proteinketten C_2 -symmetrisch zueinander angeordnet und bestehen aus jeweils 99 Aminosäuren [52]. Das symmetrische aktive Zentrum befindet sich an der Grenzfläche der Monomere. Die Dimere werden neben anderen Interaktionen vorwiegend durch ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das sowohl die Amino- (Aminosäuren 1-4) als auch die Carboxytermini (Aminosäuren 95-99) jeder Untereinheit enthält, zusammengehalten. Zusätzlich stabilisieren geladene Aminosäuren an den Ausgängen des aktiven Zentrums den Zusammenhalt der Monomere durch elektrostatische Wechselwirkungen. Jedes Monomer selbst wird durch hydrophobe Wechselwirkungen aliphatischer Aminosäuren im Kern stabilisiert.

Die Aminosäuren 9-24 bilden zwei Bänder eines β -Faltblatts, unterbrochen von einem β -turn¹. Die Aminosäuren Asp25, Thr26, Gly27 (katalytische Triade) bilden eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen mit den entsprechenden Aminosäuren des anderen Monomers aus. Diese charakteristische Wechselwirkung wird als *fireman's grip*² bezeichnet [53]. Es folgen zwei *loop*³-Regionen, die aus den Aminosäuren 30-35 und 36-42 bestehen. Jedes Monomer trägt ein flexibles Segment (*flap*⁴), das von einem antiparallelen β -Faltblatt (Aminosäuren 43-49 und 52-66) und dazwischenliegendem β -turn gebildet wird. Es dehnt sich über die Substrat bindende Spalte aus. Die *flap*-Region kontrolliert den Zugang zum aktiven Zentrum. Abbildung 1.11 zeigt sie in geschlossener Form, wie sie nach Bindung von Substrat oder Inhibitor vorliegt. Zur Öffnung bewegen sich beide Klappen in Richtung der schwarz gepunkteten Pfeile nach oben. Die Aminosäuren 69-78 und 83-85 bilden weitere Bänder der β -Faltblätter. Dazwischen befindet sich eine weitere *loop*-Region. Eine klar definierte α -Helix folgt im Sequenzabschnitt 86-94 [54].

1.4.2 Das aktive Zentrum

Das aktive Zentrum formt bei geschlossener *flap*-Region eine Röhre. Die beteiligten Aminosäuren bilden acht aufeinander folgende Spezifitätstaschen. Die Bezeichnung der Bindungstaschen erfolgt gemäß der üblichen Nomenklatur [55] mit S4 bis S1 vor und S1' bis S4' hinter der hydrolysierbaren Bindung.

¹ turn (engl.): Wende

² fireman's grip (engl.): Griff des Feuerwehrmanns

³ loop (engl.): Schlinge

⁴ flap (engl.): Klappe

Entsprechend werden die Seitenketten der Aminosäuren des Substrates oder äquivalente Strukturelemente gebundener Inhibitoren mit P4 bis P4' bezeichnet. Zwischen den Spezifitätstaschen gibt es strukturelle Unterschiede, jedoch besitzen sie einen vorwiegend hydrophoben Charakter.

Untersuchungen haben gezeigt, dass Heptapeptide (P4-P3') die Minimalsubstrate der HIV-1 PR darstellen [56]. Es ist anzunehmen, dass die Protease mit allen sieben Aminosäuren Wechselwirkungen eingeht, da kürzere Aminosäureketten nur wesentlich langsamer gespalten werden.

Die HIV-PR hydrolysiert etwa 10 der 1500 existierenden Peptidbindungen in den Gag und Gag-Pol-Polyproteinen [57]. Die Spezifität der Bindungsspaltung ist nicht bedingt durch den katalytischen Mechanismus sondern durch die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym. Dementsprechend werden von der HIV-1 PR nur bestimmte Aminosäuresequenzen in den Spezifitätstaschen P4-P4' als Substrat erkannt.

Die größte Präferenz besteht für P2', wo nur Glu oder Gln gebunden werden. P1 akzeptiert hydrophobe Aminosäuren wie Phe, Leu, Met, Asn und Tyr. P1' bindet meistens Pro. In P3 ist häufig Glu zu finden, während P2 überwiegend mit hydrophoben Resten besetzt ist. Die Abbildung 1.12 zeigt schematisch die Spezifitätstaschen des aktiven Zentrums mit einem in gestreckter Form gebundenen Substrat. Es ist erkennbar, welche Aminosäuren an der Bindung des Substrates beteiligt sind. Die Wechselwirkungen erfolgen über Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Kontakte.

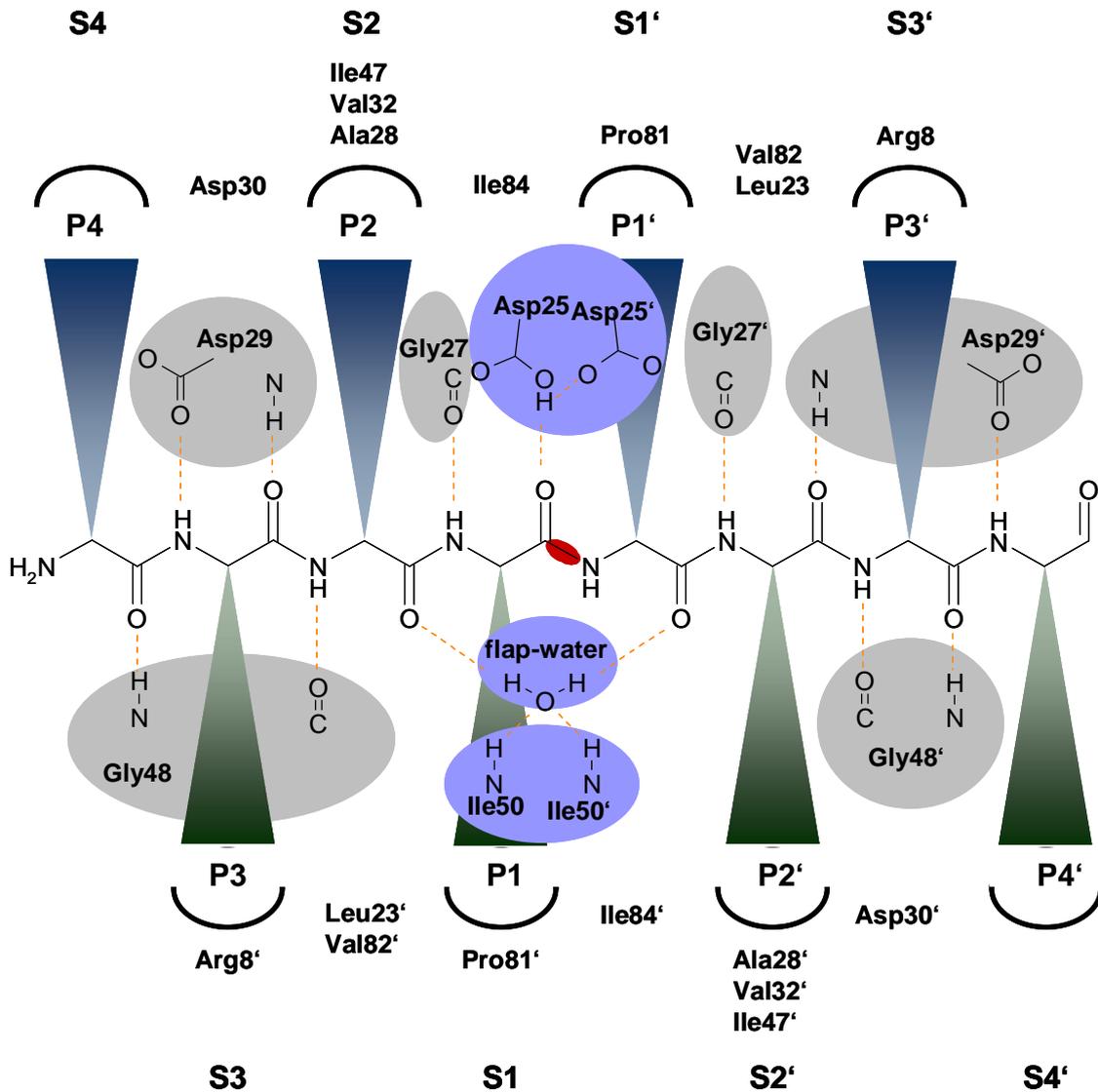


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Substratbindung im aktiven Zentrum der HIV-1 PR. Es sind die an der Bildung der Substratbindungstaschen beteiligten Aminosäuren benannt. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch orangefarbene gestrichelte Linien symbolisiert.

Peptidbindungen werden bevorzugt zwischen den Aminosäuren Phe und Pro oder Tyr und Pro gespalten. Dabei spielen die beiden Aminosäuren Asp25 und Asp25' eine entscheidende Rolle, da sie am Reaktionsmechanismus beteiligt sind. Daneben sind Ile50 und Ile50' bei der Bindung von Liganden im aktiven Zentrum wichtig. Sie vermitteln Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen nicht direkt zum Substrat bzw. einigen Inhibitoren, sondern über ein zusätzliches Wassermolekül. Dieses Wasser

konnte auch in Kristallstrukturen lokalisiert werden und wird als *flap-water*¹ bezeichnet (s. Abbildung 1.13).

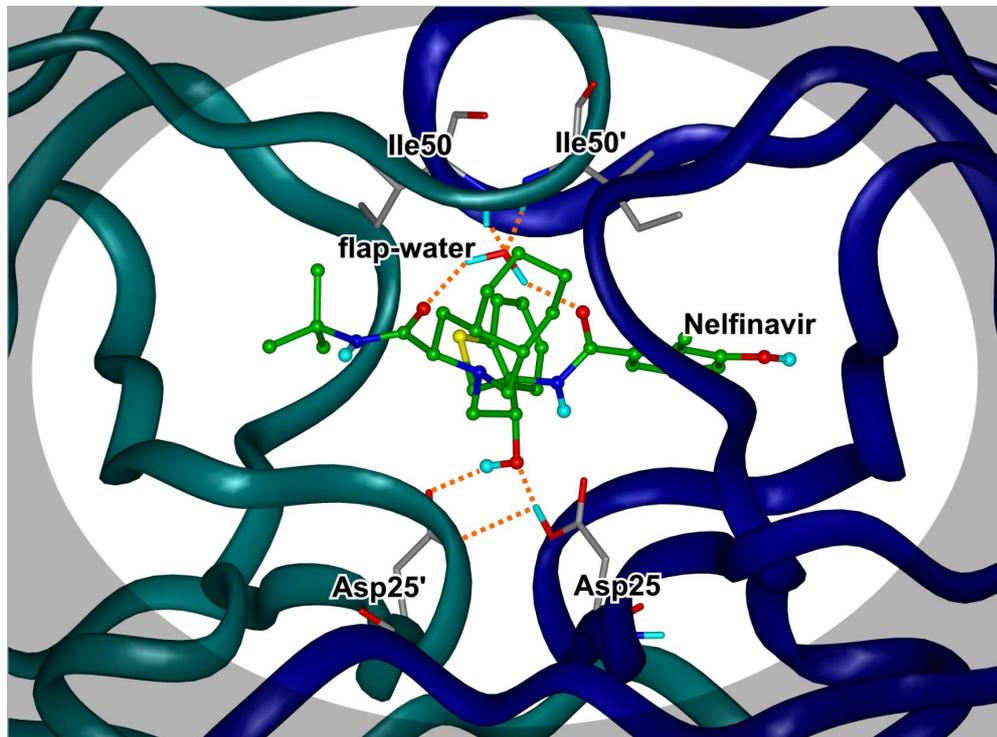


Abbildung 1.13: Nelfinavir gebunden im aktiven Zentrum der HIV-1 PR (PDB: 1OHR [58]). Die Abbildung zeigt die katalytischen Asp25/25' sowie die Ile50/50', welche sowohl bei der Substratbindung als auch im Komplex mit Inhibitoren die wichtigsten Wechselwirkungspartner sind. Das *flap-water* vermittelt die Wasserstoffbrücken zwischen Nelfinavir und HIV-1 PR, die als orange gestrichelte Linien dargestellt sind.

Neben den beschriebenen Interaktionen stabilisiert ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, in das zusätzliche Wassermoleküle involviert sind, die Bindung des Substrates.

1.4.3 Die proteolytische Spaltung des Substrates

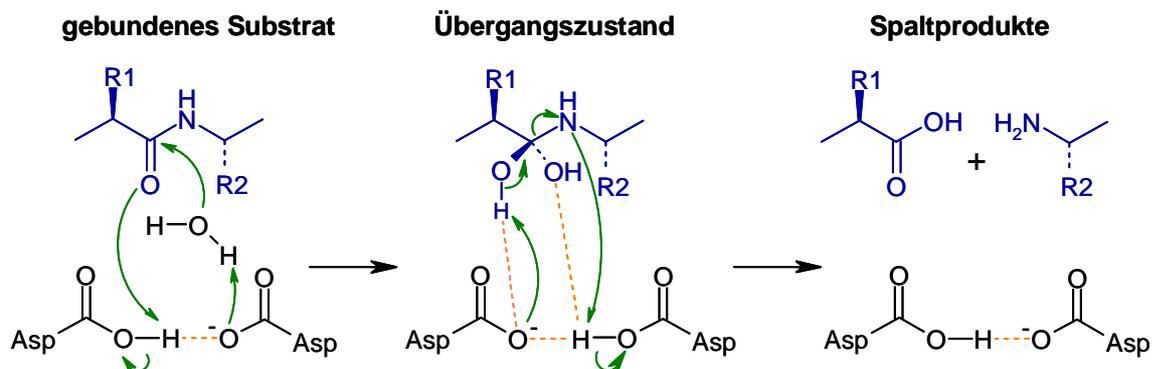
Der Mechanismus der Substratspaltung ist allen Aspartylproteasen gemein. Voraussetzung für den Ablauf der Reaktion sind neben der zu spaltenden Peptidbindung ein katalytisches Wassermolekül sowie die beiden Aspartate, die auch als katalytische Dyade² bezeichnet werden. Dabei ist es essenziell, dass das eine Aspartat protoniert und das andere deprotoniert vorliegt. Untersuchungen der Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der HIV-PR vom

¹ flap-water (engl.): Klappenwasser, Bezeichnung für ein Wassermolekül, das wichtig für die Substratbindung in der HIV-1 PR ist

² Dyade (griech.): Zweiheit, Bezeichnung für eine Zweiergruppe, die in enger Beziehung zueinander steht.

pH-Wert zeigten einen glockenkurvenartigen Verlauf mit einem Maximum zwischen pH 5 und 6 [59], was allgemein als Bestätigung für den monoprotonierten Zustand angesehen wird, da dieser nur im mittleren pH-Bereich vorliegen kann.

Abbildung 1.14 zeigt schematisch den Ablauf der Reaktion. Der Ausschnitt des Substrates ist in blau dargestellt, gepunktete orangefarbene Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen. Grüne Pfeile kennzeichnen



umklappende Elektronenpaare.

Abbildung 1.14: Katalytischer Mechanismus der Substratspaltung in Aspartylproteasen.

Die Reaktion beginnt mit dem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls am Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Amidbindung. Dazu fixiert und polarisiert ein Aspartat das Wassermolekül. Der nukleophile Angriff wird durch die erhöhte Polarisierung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung ermöglicht, da der Carbonylsauerstoff der Amidbindung eine Wasserstoffbrücke zum Wasserstoff des protonierten Aspartates bildet. Die Hybridisierung des angegriffenen Kohlenstoffatoms ändert sich von sp^2 zu sp^3 . Intermediär tritt ein tetrahedrales Zwischenprodukt auf, das zwei Hydroxylgruppen am Kohlenstoffatom trägt. Zur endgültigen Bindungsspaltung kommt es durch die Rückgabe des Protons einer Hydroxylgruppe an das deprotonierte Aspartat unter Bildung einer Carbonylfunktion. Es entstehen als Spaltprodukte die freie Säure sowie das Amin.

1.4.4 Entwicklung von HIV-Protease-Inhibitoren

Das Wirkstoffdesign hat maßgeblich zur erfolgreichen Entwicklung von HIV-1 Protease-Inhibitoren (PI) beigetragen. Dabei waren Erkenntnisse aus der Entwicklung von Renin-Inhibitoren eine wichtige Grundlage für die Forschung [60]. Man lernte ausgehend vom Peptidsubstrat die Konzeption von Inhibitoren, die den Übergangszustand der Substratspaltung imitieren, und entwickelte

weiterhin den Peptidomimetika-Ansatz, bei dem Peptidbausteine durch funktionelle Gruppen mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt werden. Nachdem die räumliche Gestalt der HIV-1 PR aufgeklärt war, konnten die gewonnenen Erkenntnisse direkt auf das neue Target¹ übertragen werden.

Als einer der ersten Inhibitoren konnte das Pepstatin (s. Abbildung 1.15) für die HIV-1 PR gefunden und auch im Komplex mit dem Enzym kristallisiert werden [51]. Bei diesem Hemmstoff handelt es sich um eine Substanz, die aus *Streptomyces*-Arten isoliert wurde. Sie stellt auch einen hoch affinen Inhibitor für andere Aspartylproteasen dar. Das Pepstatin hemmt ebenso die Funktion von Pepsin, Kathepsin D und Renin. Die inhibierende Wirkung beruht auf der seltenen Aminosäure Statin, deren aliphatische Hydroxylgruppe mit den katalytischen Asparaginsäuren interagiert und so den Übergangszustand simuliert.

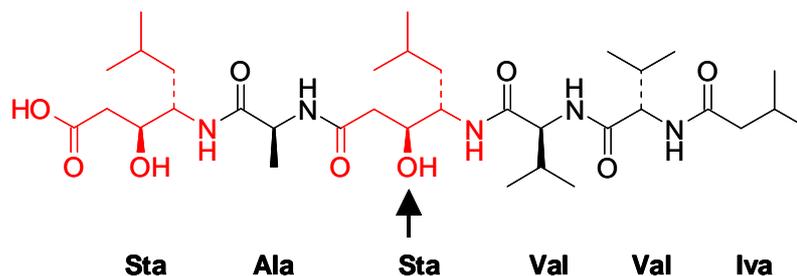
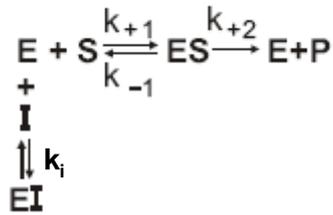


Abbildung 1.15: Aspartylproteasen-Inhibitor Pepstatin. Der Pfeil kennzeichnet die Hydroxylgruppe, die mit Asp25/25' interagiert (Sta = Statin, in rot dargestellt; Iva = Isovaleriansäure).

Alle bisher therapeutisch genutzten Inhibitoren (s. Kapitel 1.2.2) sind Übergangszustandsanaloge, welche die spaltbare Amidbindung durch eine Hydroxyethylenstruktur ersetzen, die vom Enzym nicht gespalten werden kann. Es kommt zu einer kompetitiven Hemmung des Enzyms. Folglich konkurrieren das natürliche Substrat und der Inhibitor um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Günstige Wechselwirkungen zwischen den Hemmstoffen und dem aktiven Zentrum führen zu einer festeren Bindung im Enzym und einer lang anhaltenden Blockade (s. Abbildung 1.16).

¹ Target: Ziel



E – Enzym
 S – Substrat
 I – Inhibitor
 k – Geschwindigkeitskonstante für
 die jeweilige Reaktion

Abbildung 1.16: Gleichung der Reaktionskinetik.

Das Ziel der Forschung ist es, Inhibitoren mit einer möglichst kleinen Inhibitionskonstante zu entwickeln, die also schon bei geringer Konzentration das natürliche Substrat aus dem Enzym verdrängen.

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, spaltet die HIV-1 PR Amidbindungen zwischen lipophilen Aminosäuren. Entsprechend wurden angrenzend zur Hydroxylgruppe lipophile Reste in die Hemmstoffe eingebaut. Weltweit wurde eine Vielzahl neuer Verbindungen synthetisiert, von denen viele die Protease wirksam inhibieren. Eine Reihe von Substanzen sind jedoch nicht als Arzneistoff einsetzbar, da sie u.a. nicht in der Lage sind, in Zellen einzudringen und dort wirksam zu werden. Es mussten daher beim Design von neuen Substanzen auch die pharmakokinetischen Eigenschaften durch weitere Strukturveränderungen verbessert werden [61].

Abbildung 1.17 zeigt die chemischen Strukturen der zur Inhibition der HIV-1 PR zugelassenen Arzneistoffe. Dabei sind strukturelle Gemeinsamkeiten deutlich erkennbar. Die voluminösen Reste in direkter Nachbarschaft zur rot dargestellten Hydroxylgruppe sind bei allen Inhibitoren zu finden. Besonders große Ähnlichkeit besteht zum einen zwischen Saquinavir und Nelfinavir und zum anderen zwischen Ritonavir und Lopinavir.

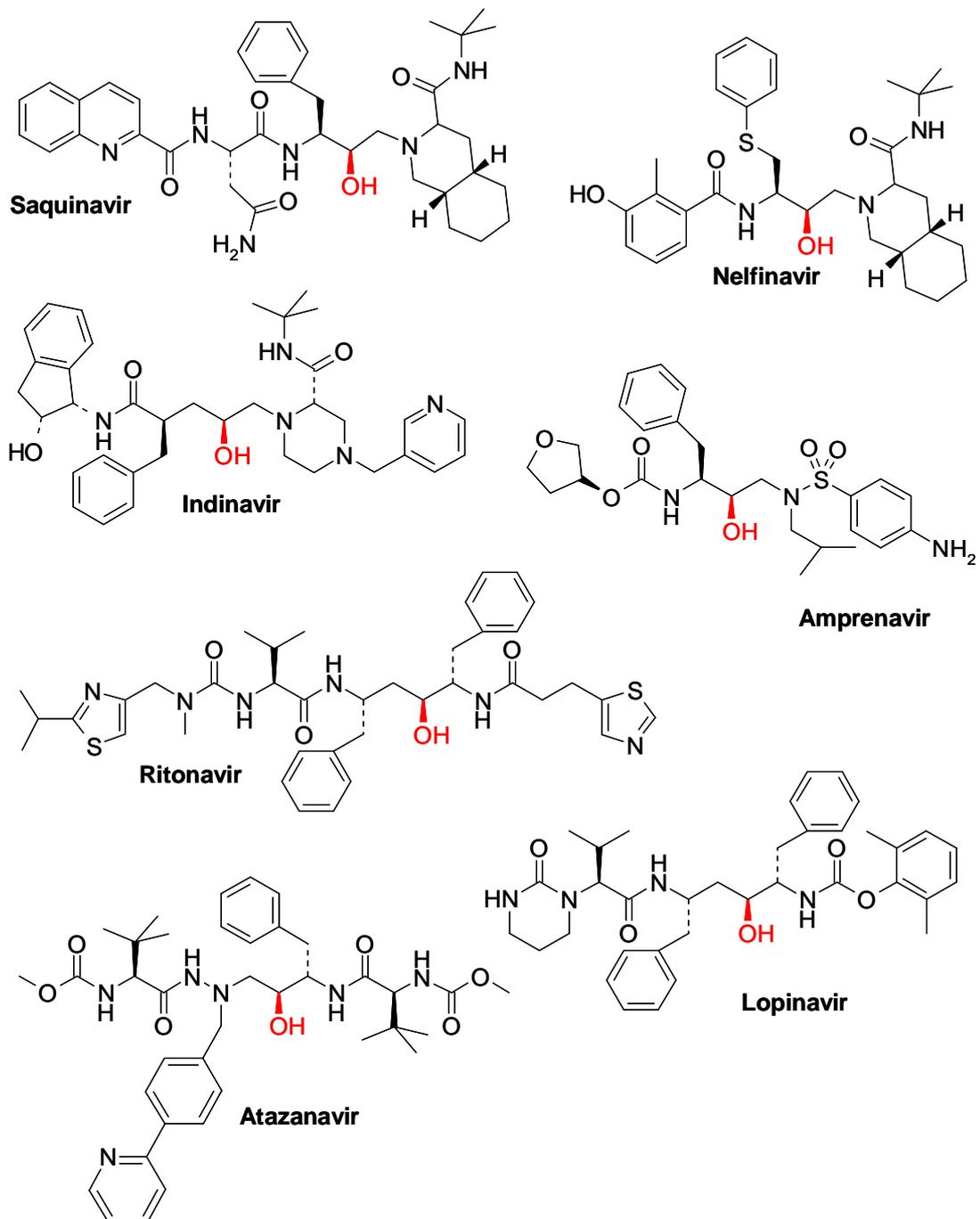


Abbildung 1.17: Zur Behandlung eingesetzte HIV-Protease-Inhibitoren. Die den Übergangszustand imitierende Hydroxylgruppe ist rot gekennzeichnet.

1.4.5 Aussichtsreiche Inhibitoren in der klinischen Prüfung

Die Entwicklung von PI stellt weiterhin ein Gebiet intensiver Forschung dar. Zurzeit befinden sich mehrere Substanzen in klinischen Studien, die bisher z. T. sehr erfolgreich verlaufen. Ein vielversprechender Vertreter ist das Mozenavir (DMP450, s. Abbildung 1.18).

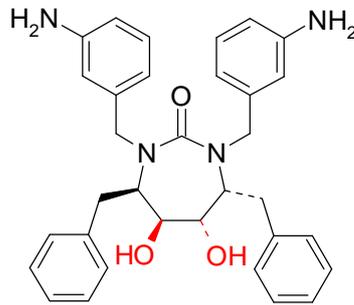


Abbildung 1.18: Chemische Struktur von Mozenavir. Die den Übergangszustand imitierenden Hydroxylgruppen sind rot gekennzeichnet.

Die Verbindung gehört zur Gruppe der zyklischen Harnstoffderivate, die durch die intensive Suche nach neuen Grundgerüsten, die unter Verdrängung des bei den bisherigen Inhibitoren benötigten Wassermoleküls binden, gefunden wurde. Beim Mozenavir handelt es sich um eine symmetrische Verbindung, die ideal im symmetrischen aktiven Zentrum der Protease binden kann. Die Verdrängung des Wassermoleküls bewirkt einen zusätzlichen günstigen entropischen Effekt und erhöht außerdem die Selektivität des Hemmstoffs, da bei anderen humanen Aspartylproteasen ein vergleichbares Wassermolekül nicht bekannt ist. Der Sauerstoff der Carbonylgruppe interagiert beim Mozenavir direkt mit Ile50/50'.

Bei einem umfangreichen *Screening*¹ wurde die hemmende Wirkung von Warfarin und Phenprocoumon festgestellt [62]. Hierbei handelt es sich um 4-Hydroxycumarine, die als Antikoagulantien therapeutisch eingesetzt werden. Die Untersuchungen zeigten, dass diese Verbindungen die HIV-1 Protease im mikromolaren Bereich hemmen. Aufgrund ihrer bekannten guten Bioverfügbarkeit und langen Plasma-Halbwertszeiten waren die Verbindungen interessant und wurden weiter untersucht.

Veränderungen des Grundgerüsts führten zum 4-Hydroxy-Dihydropyron-Grundgerüst, das exzellente Bindungseigenschaften in der Protease besitzt. Durch Variation der Seitenketten entstand schließlich mit Tipranavir (PNU-140690, s. Abbildung 1.19) ein potenter Inhibitor. Diese Substanz verdrängt bei der Bindung im aktiven Zentrum ebenfalls das Wassermolekül und bildet direkte Wasserstoffbrückenbindungen vom Carbonylsauerstoff zu Ile50/50' aus.

¹ Screening (engl.): systematische Suche

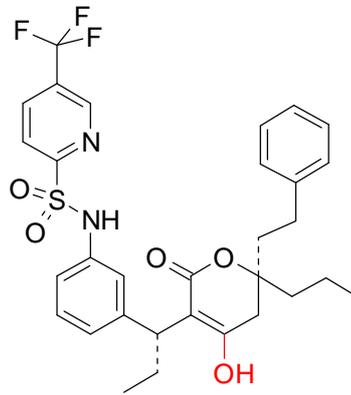


Abbildung 1.19: Chemische Struktur von Tipranavir. Die den Übergangszustand imitierende Hydroxylgruppe ist rot gekennzeichnet.

Zahlreiche weitere PI befinden sich derzeit in frühen klinischen Untersuchungen. Welche von ihnen die Studien erfolgreich beenden können, ist bisher noch nicht absehbar, da schon verschiedene potenziell wirksame Verbindungen letztendlich in den klinischen Prüfungen versagt haben. Der Bedarf an neuen Substanzen ist u.a. durch die im nächsten Abschnitt beschriebenen Resistenzentwicklungen weiterhin gegeben.

1.4.6 Inhibitor induzierte Mutationen und Resistenzentwicklung bei der HIV-1 Protease

Das Spektrum der Mutationen ist für Protease-Inhibitoren gut beschrieben. Eine PI Resistenz entwickelt sich meist langsam, da erst mehrere Mutationen akkumulieren müssen. Es wurden mittlerweile an mehr als 20 Positionen Mutationen der HIV-PR identifiziert, die in Verbindung mit einer Resistenz auftreten (s. Tabelle 1.4 und Abbildung 1.20). Eine Unterscheidung erfolgt zwischen primären und sekundären Mutationen, wobei erstere sich im aktiven Zentrum der Protease befinden und durch strukturelle Änderungen der Substrat bindenden Region die Bindungsaffinität der eingesetzten Wirkstoffe herabsetzen. Es sind vor allem die Positionen 30, 48, 50, 82, 84 und 90 der Aminosäuresequenz betroffen.

Tabelle 1.4: Resistenzassoziierte Mutationen der HIV PR, die bei der Behandlung mit Protease-Inhibitoren auftreten [63][64][65][66]

PI	primäre Mutationen	sekundäre Mutationen
Saquinavir	G48V, V82A/T/F I84V, L90M	L10I/R/V, I54V/L, A71V/T, G73S, V77I,
Ritonavir	V82A/T/F, I84V, L90M	L10I/R/V, K20M/R, V32I, L33F, M36I, M46I/L, I54V/L, A71V/T, V77I
Indinavir	V82A/T/F, I84V	L10I/R/V, K20M/R, L24I, V32I, M36I/L, M46I/L, I54V/L, A71V/T, G73S/A, L90M
Nelfinavir	D30N, I84V, L90M	L10F/I, V32I, M36I, M46I/L, A71V/T, V77I, N88D/S
Amprenavir	I50V, I84V	L10I/R/V, V32I, M46I, I47V, I54V
Lopinavir	I50V, V82A/V/T, I84V	L10F/I, K20I/M, M46I
Atazanavir	I50L, I84V	M46I, A71V

Die Auflistung der PI entspricht der Reihenfolge ihrer therapeutischen Zulassung. Für neuere Inhibitoren stehen deutlich weniger Daten zur Verfügung

Sekundäre Mutationen treten häufig erst nach einer primären Mutation auf und liegen in den äußeren Bereichen des Enzyms. Sie können z.T. die durch vorhergehende Mutationen reduzierte Funktionsfähigkeit (virale Fitness) wieder kompensieren [67].

Primäre Mutationen sind relativ spezifisch für die einzelnen Wirkstoffe, daher kann eine Folgetherapie bei frühzeitiger Umstellung auf andere Substanzen erfolgreich sein, hingegen führt eine Kumulation von sekundären Mutationen meist zu einer geminderten Sensitivität gegenüber mehreren Substanzen der gleichen Wirkstoffklasse, den so genannten Kreuzresistenzen.

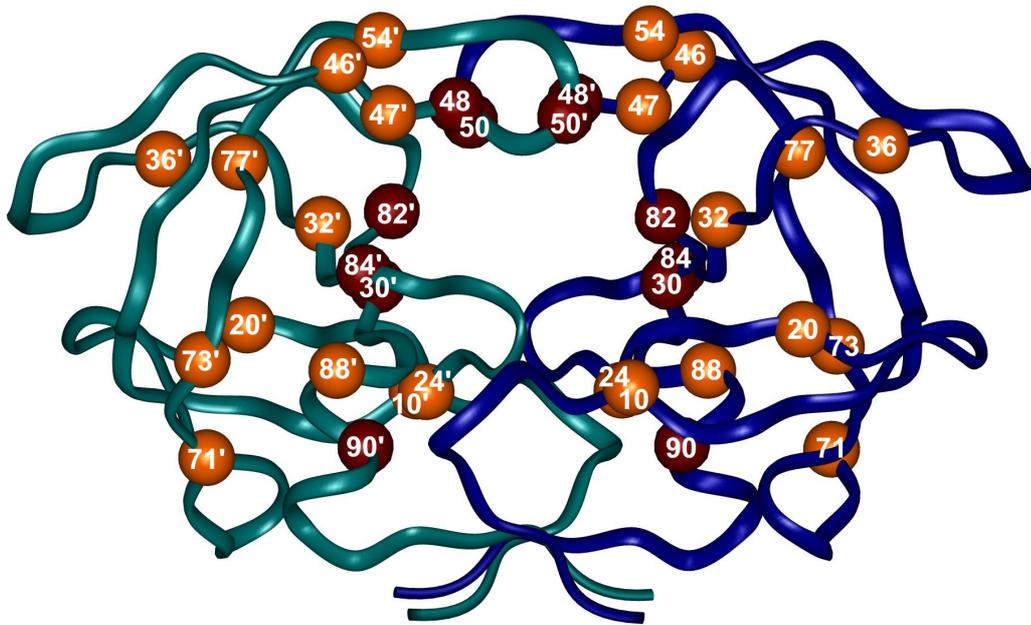


Abbildung 1.20: Positionen der Resistenz-assoziierten Aminosäuren. Rot hinterlegt sind Positionen primärer Resistenz, orange dargestellt sind Positionen sekundärer Resistenz.

1.4.7 Natürliche Resistenz durch Subtyp-spezifische Polymorphismen

Die hohe genetische Variabilität von HIV führt auch zu so genannten Subtyp-spezifischen Resistenzen. Dabei handelt es sich um Sequenzunterschiede in Wildtypisolaten verschiedener Subtypen, die durch natürliche Polymorphismen bedingt sind. Sie sind nur in Bezug auf einen Wildtypstamm eines anderen Subtyps als Mutation anzusehen. Da die Entwicklung von PI überwiegend anhand des HIV-1 Subtyps B aus der Gruppe M erfolgte, können Unterschiede zur Sequenz dieses Subtyps bei der Therapie die gleichen Folgen haben wie Mutationen. Studien zeigen, dass 85% der Non-B-Isolate mindestens eine Mutation an den Positionen 10, 20, 30, 36, 46, 71 und 82 aufweisen [68]. Dieser bereits bestehende Unterschied bei einer mit Resistenz assoziierten Aminosäure lässt eine schnelle Resistenzentwicklung unter Therapie erwarten.

2 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Immunschwächeerkrankung AIDS hat in den vergangenen 20 Jahren weltweit zu einer hohen Zahl von Opfern geführt. Gründe dafür sind zum einen in der zunächst unerkannten und rasanten Ausbreitung des HI-Virus und zum anderen in der Art der Infektion des menschlichen Organismus zu sehen. Es benutzt Zellen des menschlichen Immunsystems als Wirtszellen, die dadurch zu Grunde gehen. Die körpereigene Abwehr gegen Krankheitserreger wird so wirkungslos. Als Todesursache treten meist nachfolgende opportunistische Infektionen auf, die bei intaktem Immunsystem gewöhnlich harmlos verlaufen oder gar nicht auftreten würden.

Die HIV-Protease stellt ein Schlüsselenzym des viralen Replikationszyklus dar. Eine Blockade dieses Enzyms führt zu einer deutlichen Reduktion der Viruslast. Die räumliche Gestalt der Protease wurde bereits vor ca. 15 Jahren erstmalig aufgeklärt. Anhand ihrer Struktur wurden verschiedene Inhibitoren entwickelt, die auch schon zur AIDS-Behandlung eingesetzt werden. Die Erfolge der Forschung ermöglichen es mittlerweile, dass infizierte Patienten unter Einhaltung einer intensiven antiretroviralen Therapie über mehrere Jahre ein relativ symptomfreies Leben führen können. Es wird jedoch während der Therapie die Entstehung neuer Virusvarianten beobachtet, die deutlich weniger empfindlich auf die eingesetzten Wirkstoffe reagieren und so zu einem Rückschlag in der Behandlung führen. Weiterhin ergeben sich durch die langjährige Einnahme der antiretroviralen Medikamente zusätzliche Probleme durch teilweise schwer wiegende Nebenwirkungen einzelner Präparate oder ihrer Kombinationen. Aufgrund der beschriebenen Entwicklungen ist es notwendig, fortlaufend neue Substanzen zu entwickeln. Darüber hinaus ist es nicht absehbar, ob jemals eine kurative Therapie zur Verfügung stehen wird.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung von Protease-Inhibitoren mit Hilfe computergestützter Untersuchungsmethoden zu unterstützen und neue potenzielle Wege zu selektiveren Wirkstoffen aufzuzeigen. Zu diesem Zweck sollten zunächst die Bindungseigenschaften von bereits bekannten hoch affinen Protease-Inhibitoren näher untersucht werden, um die Gründe für ihre Affinität zum Enzym aufzuklären. Als Grundlage dafür standen Kristallstrukturen im Komplex mit den entsprechenden Hemmstoffen zur Verfügung. Durch die Anwendung von kombinierten quantenmechanischen und molekularmechanischen Methoden sollten u.a. durchschnittliche Wechselwirkungsenergien unter besonderer Berücksichtigung von Polarisierungseffekten des Enzyms berechnet werden. Des Weiteren sollten die Einflüsse einzelner Aminosäuren auf die verschiedenen Inhibitoren bestimmt und verglichen werden.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sollten im Anschluss Vorschläge für prinzipielle und spezielle Strukturverbesserungen gemacht und validiert werden. Zur Kontrolle der Aussagekraft des angewendeten Verfahrens sollte zusätzlich untersucht werden, ob mit Hilfe der Berechnungen eine Abschätzung von Bindungsaffinitäten möglich sei. Außerdem sollte ein Verfahren zur Berechnung von relativen Bindungsenthalpien basierend auf einem thermodynamischen Ansatz entwickelt werden.

3 METHODEN

3.1 Computergestützte Simulation von Biomolekülen

Theoretische Untersuchungen biologischer Systeme wie der HIV-Protease ermöglichen die Erforschung von Beziehungen zwischen Struktur und Funktion auf atomarer Ebene. Die computergestützte Bestimmung von Moleküleigenschaften ist eng mit der Entwicklung der Informationstechnologie verbunden. So wurde im Jahr 1977 die erste Moleküldynamiksimulation eines kleinen Proteins veröffentlicht [69]. Seitdem fanden zahlreiche Entwicklungen und Verbesserungen von Methoden statt, die inzwischen zu beachtlichen Fortschritten bei der *in silico*¹ Untersuchung von Molekülen geführt haben. Heutzutage stehen vielfältige Verfahren zur Verfügung, um unterschiedlichste Aufgabenstellungen zu bearbeiten.

3.1.1 Quantenchemische Verfahren

Quantenchemische Verfahren dienen zur Beschreibung von Molekülen mit Hilfe von quantenmechanischen Methoden. So lassen sich die geometrische Anordnung der Atomkerne sowie relative und absolute Energien berechnen. Daneben ist es auch möglich, physikalische Eigenschaften wie Polarisierbarkeiten, Dipolmomente und elektrostatische Potenziale zu bestimmen.

Die aufgeführten Eigenschaften können ausgehend von der Wellenfunktion, welche die Grundlage von quantenmechanischen Methoden ist, berechnet werden.

$$H\Psi = E\Psi \quad (3.1)$$

H : Hamilton-Operator

Ψ : Wellenfunktion

E : Energie

Gleichung (3.1) zeigt die zeitunabhängige Schrödinger Gleichung [70]. Hierbei handelt es sich um einen Satz von Differenzialgleichungen mit jeweils einer Wellenfunktion Ψ_n für jeden erlaubten Energiewert E_n .

¹ *in silico* (lat.): durch eine Computersimulation, in Anlehnung an *in vivo* und *in vitro*

Eine exakte Lösung dieser Gleichung ist nur für ein einfaches Wasserstoffatom möglich. Ihre Anwendbarkeit auf chemisch interessante Systeme wird durch die Einführung von Näherungen ermöglicht.

Die Born-Oppenheimer-Näherung beinhaltet die Abkopplung der Elektronenbewegung von der Bewegung der Atomkerne. Sie beruht auf der Überlegung, dass sich Atomkerne in einem Molekül aufgrund ihrer größeren Masse wesentlich langsamer bewegen als Elektronen. Daher kann die Elektronenbewegung losgelöst von der Kernbewegung in elektronischen Schrödinger-Gleichungen mit jeweils konstanter Kernanordnung betrachtet werden [71].

Die Hartree-Fock-Methode ist ein wichtiger Formalismus zur Lösung der Schrödinger-Gleichung für Mehrelektronensysteme. Ausgangspunkt ist dabei das Modell unabhängiger Teilchen. Die sich ergebende Gleichung kann durch Separation in Eielektronen-Schrödinger-Gleichungen gelöst werden. Die Behandlung von Molekülen wird durch den Ansatz von Molekülorbitalen als Linearkombination von Atomorbitalen (linear combination of atomic orbitals – LCAO) ermöglicht [72].

Unter Berücksichtigung einiger physikalischer Prinzipien können quantenchemische Methoden in *ab initio*¹ und semiempirische Verfahren unterteilt werden.

Grundsätzlich können *ab initio* Verfahren angewandt werden, um Energie- und Strukturdaten systematisch zu bestimmen. Dazu benötigt man keine experimentellen Parameter, jedoch ist ihre Anwendung aufgrund des extremen Rechenaufwands bisher für Systeme in der Größenordnung von Enzymen nicht praktikabel.

Semiempirische Methoden nutzen hingegen weitere Vereinfachungen, um den Rechenaufwand zu reduzieren. So werden die Elektronen der inneren Schalen mit den dazugehörigen Atomkernen zusammengefasst, weil sie bei Wechselwirkungen zwischen Molekülen und bei chemischen Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es werden nur die Positionen der Valenzelektronen bestimmt. Zusätzlich werden viele der zu berechnenden Integrale durch Approximationen aus experimentellen oder genaueren theoretischen Untersuchungen ersetzt, sodass nur Atome behandelt werden können, die auch parametrisiert wurden. Weiterführende Informationen über

¹ *ab initio* (lat.): von Anfang an

semiempirische Methoden sind u.a. in den angegebenen Veröffentlichungen zu finden [73]-[75].

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von HIV-1 PR-Inhibitoren wurde in dieser Arbeit die semiempirische Methode Austin Model 1 (AM1) angewendet [76][77]. Sie wurde bereits zur Untersuchung verschiedener biologischer Probleme erfolgreich eingesetzt [78][79]. AM1 liefert häufig vergleichbare Ergebnisse mit *ab initio* Berechnungen, die auch vielfach gut mit experimentellen Daten korrelieren. Dabei ist AM1 ca. drei Zehnerpotenzen schneller als entsprechende *ab initio* Verfahren. Aus diesen Gründen eignet sich die von Dewar und Mitarbeitern entwickelte Methode zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von Enzym-Inhibitor-Komplexen in QM/MM-MD-Simulationen (s. Kapitel 3.2.3).

3.1.2 Kraftfeldbasierte Methoden

Kraftfelder werden für Systeme aus einigen tausend Atomen eingesetzt, für die quantenmechanische Verfahren bisher nicht anwendbar sind. Im Kraftfeld wird die potenzielle Energie durch empirische Funktionen bestimmt. Dabei werden zahlreiche Näherungen angewendet, die aber bei modernen Kraftfeldern einen guten Kompromiss zwischen Genauigkeit und Aufwand darstellen. So sind die empirischen Parameter z.B. mit Kristallstrukturdaten oder Ergebnissen quantenmechanischer Rechnungen kleiner Modellverbindungen abgeglichen. Eine Einschränkung für Kraftfelder besteht in der Unfähigkeit, drastische Änderungen der elektronischen Struktur (z.B. die Entstehung oder der Bruch von Atombindungen) zu simulieren. Ebenso kann die Parametrisierung von Verbindungen, die noch nicht im Kraftfeld enthalten sind, sehr aufwändig sein.

Inzwischen steht eine Vielzahl von Kraftfeldern für die Simulation von Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten zur Verfügung. Für die Simulation der HIV-1 Protease wurde das CHARMM22-Kraftfeld¹ [80] für Proteine angewendet, das Bestandteil des CHARMM-Software Paketes ist [81].

Allgemein bilden die Gesetze der klassischen Mechanik die Grundlage für die Energieberechnung in Kraftfeldern. Im weiteren Verlauf des Kapitels werden nur die für das Verständnis der durchgeführten Untersuchungen wichtigen Zusammenhänge sowie Besonderheiten des verwendeten Kraftfeldes kurz erläutert. Für eine detaillierte Beschreibung der Kraftfeldtheorie wird auf weiterführende Literatur verwiesen [81]-[83].

¹ CHARMM: Chemistry at HARvard Molecular Mechanics

Die potenzielle Energie ergibt sich als Funktion der Atompositionen (in kartesischen Koordinaten) aller Atome des Systems und setzt sich aus den Wechselwirkungen kovalent gebundener Atome ($E_{gebunden}$) und ungebundener Atome ($E_{ungebunden}$) zusammen (s. Gleichung (3.2)).

$$E_{ges} = E_{gebunden} + E_{ungebunden} \quad (3.2)$$

E_{ges} : Gesamtenergie des Systems

Der Term $E_{gebunden}$ fasst die Energiebeiträge der Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel zusammen. Der Term $E_{ungebunden}$ ergibt sich aus elektrostatischen und dispersiven Wechselwirkungen. Im Anhang E ist eine Liste der aufgeführten Kraftfeldterme zu finden.

Eine Besonderheit des CHARMM22-Kraftfelds stellt die Behandlung von Wasserstoffbrückenbindungen dar. Diese Wechselwirkungen werden nicht durch einen speziellen Energieterm berücksichtigt. Die Donor- und Akzeptoreigenschaften ergeben sich direkt aus der Parametrisierung der elektrostatischen Wechselwirkungen.

Zur effizienteren Nutzung der Rechenzeit wurde bei der Berechnung von $E_{ungebunden}$ ein *Cutoff*-Parameter¹ angewendet, wodurch Wechselwirkungen von weit voneinander entfernten Atomen nicht mehr berücksichtigt wurden. Dieses Verfahren ist sinnvoll, da disperse und elektrostatische Wechselwirkungen eine starke Abstandsabhängigkeit besitzen und ab einer bestimmten Entfernung nur noch einen vernachlässigbar kleinen Beitrag zur Gesamtenergie des Systems beitragen. Die Gefahr der Artefaktbildung wurde durch die Anwendung eines *Cutoff*-Bereichs, in dem die Wechselwirkungen linear skaliert werden, vermieden. In dieser Arbeit wurden die beschriebenen Wechselwirkungen im Abstand zweier Atome von 11 bis 12 Å linear abgesenkt.

Die Untersuchungen der HIV-1 Protease erfolgten in solvatisierter Umgebung. Es wurde das TIP3P-Modell zur Beschreibung der Wassermoleküle benutzt [84]. Als Dielektrizitätskonstante wurde der Standardwert für derartige Proteinsysteme von Eins benutzt.

¹ cutoff (engl.): Abschaltung

3.2 Minimierungen und Moleküldynamiksimulationen

Zur Durchführung von Moleküldynamik (MD)-Simulationen sind Strukturen niedriger Energie als Startgeometrien erforderlich. Zur Strukturoptimierung eignen sich verschiedene Algorithmen der Energieminimierung. Sie sind von den gewählten Kraftfeldparametern abhängig und verbessern die Molekülgeometrien solange, bis die Energieänderung einen zu Beginn bestimmten Maximalwert nicht mehr überschreitet oder die Schrittzahl einen vorher festgelegten Maximalwert erreicht. Die in den durchgeführten Untersuchungen verwendeten Algorithmen werden im Folgenden kurz beschrieben.

Die „Steepest-Descent“ (SD) Methode stellt eine einfache und effektive Gradientenmethode zur schnellen Optimierung von Strukturen dar, die weit von einem Minimum entfernt liegen. Sie eignet sich gut zur anfänglichen Optimierung von Kristallstrukturengeometrien und führt zu einer deutlichen Verbesserung von ungünstigen Konformationen. Eine endgültige Annäherung an ein Minimum ist hingegen nur schwer zu erreichen.

Zur weitergehenden Strukturoptimierung ist die Anwendung der „Adopted Basis Set Newton-Raphson“ (ABNR) Methode sinnvoll [81][85]. Hierbei handelt es sich um ein rechenintensives Gradientenverfahren, bei dem neben der ersten auch die zweite Ableitung der Energiefunktion berechnet wird. Durch dieses Verfahren lassen sich energetisch stabile Strukturen ermitteln, die als Startpunkt für MD-Simulationen geeignet sind.

In MD-Simulationen [86][87] können zeitabhängige Prozesse molekularer Systeme durch die numerische Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichung beobachtet werden. Sie stellen eine leistungsfähige Methode zur detaillierten Betrachtung von biologischen Vorgängen auf atomarer Ebene dar [88]. Man erhält u.a. eine Trajektorie¹, welche die sich verändernden Positionen der Atome im Verlauf einer Simulation wiedergibt. Zur Integration der Bewegungsgleichungen wurde der Leap-Frog-Algorithmus [89] benutzt, bei dem jeweils abwechselnd Geschwindigkeiten und Positionen der Atome berechnet werden.

3.2.1 Langevin-Dynamiken

Die Anwendung der Langevin Gleichung (3.3) anstelle der Newtonschen Bewegungsgleichung ermöglicht die zusätzliche Berücksichtigung von

¹ Trajektorie: Bewegungsbahn

Solventeffekten. Entsprechende Simulationen werden als Stochastik- oder Langevin-Dynamiken bezeichnet [90].

$$m_i a = F_i \{x_i(t)\} - \gamma_i v_i m_i + R_i(t) \quad (3.3)$$

Dabei entspricht der Kraftterm $F_i \{x_i(t)\}$ dem der Newtonschen Bewegungsgleichung. Die Solventeffekte werden durch einen zusätzlichen Reibungskraftterm $\gamma_i v_i m_i$, der die Anziehung des Lösungsmittels widerspiegelt, sowie einen Term $R_i(t)$ implementiert, der zur Berücksichtigung der Wärmebewegung des Solvents dient.

Bei den MD-Simulationen dieser Arbeit kam ein Hybridverfahren zum Einsatz, bei dem für Atome bis zum Abstand von 20 Å vom Zentrum des jeweiligen Systems die klassische Bewegungsgleichung benutzt wurde und für weiter entfernte Atome die Langevin-Gleichung Anwendung fand [91][92].

3.2.2 Wahl des Zeitschritts unter Anwendung des *SHAKE*-Algorithmus

Bei MD-Simulationen werden die Atompositionen wie beschrieben nach bestimmten Zeitabständen mit Hilfe der Bewegungsgleichung neu berechnet. Der so genannte Zeitschritt muss klein genug sein, um auch die schnellste Bewegung im System ausreichend wiederzugeben. Ein zu groß gewählter Zeitschritt führt im Verlauf von Dynamiken zur Aufsummierung von Fehlern bei der Berechnung der stark schwankenden Bewegungen. Andererseits erhöht ein kleiner Zeitschritt die Rechendauer, da für die gleiche Simulationslänge mehr Integrationsschritte benötigt werden.

In Biomolekülen gehören die Streckschwingungen von Bindungen zwischen Wasserstoff- und Schweratomen mit einer Periodendauer von 10 fs zu den schnellsten periodischen Bewegungen. Um diese ausreichend wiederzugeben, wäre ein Zeitschritt von 0,5 fs notwendig. Eine Alternative bietet die Anwendung des *SHAKE*-Algorithmus [93] auf die Atombindungen, an denen Wasserstoffatome beteiligt sind. Dabei werden die Bindungslängen konstant auf ihrem Idealwert gehalten. Diese Bewegungseinschränkung ist möglich, da der energetische Einfluss der ausgeschalteten Schwingungen für die untersuchten Eigenschaften nur von geringer Bedeutung ist.

Der *SHAKE*-Algorithmus ermöglicht folglich die Anwendung eines Zeitschritts von 1 fs, da die Streckschwingungen von Schweratomen mit einer Periodendauer von etwa 20 fs ausreichend wiedergegeben werden.

3.2.3 QM/MM-MD-Simulationen

Zur Nutzung der Vorteile von quantenchemischen Methoden bei der Untersuchung großer biomolekularer Systeme wurde in der vorliegenden Arbeit ein Hybridverfahren angewandt, das quantenmechanische und molekularmechanische Methoden verbindet. Es eignet sich sowohl zur Untersuchung von enzymatischen Reaktionen [94] als auch von Enzym-Ligand-Komplexen.

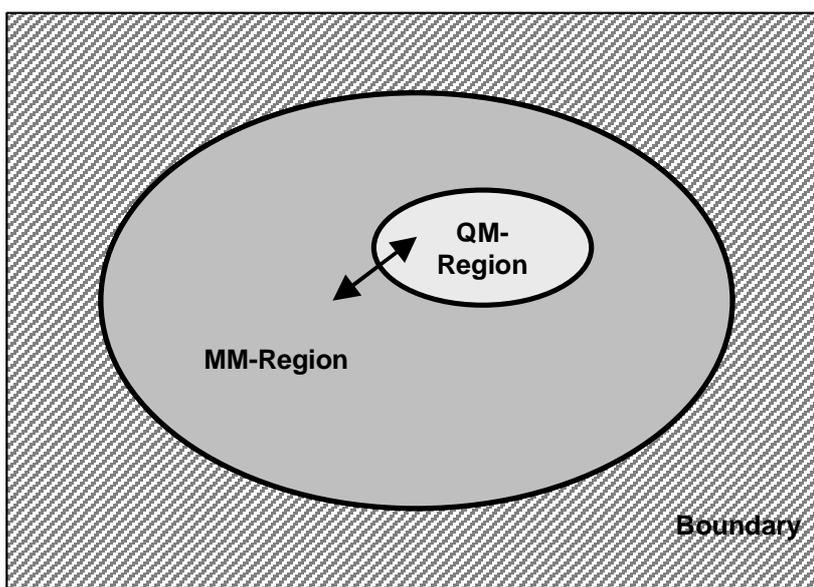


Abbildung 3.1: Partitionierung des Systems.

In der kombinierten quantenmechanischen/molekularmechanischen (QM/MM) Methodik wird das Gesamtsystem in zwei Regionen unterteilt (s. Abbildung 3.1). Die quantenmechanisch behandelte Region beinhaltet den Teil des Systems, der von besonderem Interesse ist und daher elektronisch exakt untersucht werden soll.

Zur molekularmechanisch betrachteten Region kann bei der Untersuchung von Enzymen das umgebende Protein gehören, weil es in Kraftfeldern gut parametrisiert ist. Zur Vermeidung von Problemen, die durch die begrenzte Größe eines Systems bedingt sind, ist es notwendig zusätzliche Randbedingungen in einer *boundary*¹ zu definieren (s. Kapitel 3.2.1) [95][93]-[101].

Das Gesamtsystem kann mit der in Gleichung (3.4) dargestellten Funktion beschrieben werden.

¹ boundary (engl.): Abgrenzung

$$\hat{H}_{eff} \Psi(r, R_q, R_c) = E(R_q, R_c) \Psi(r, R_q, R_c) \quad (3.4)$$

- \hat{H}_{eff} : effektiver Hamilton-Operator
 Ψ : Wellenfunktion
 E : Energie des Systems
 r : Koordinaten der Elektronen der QM-Atome
 R_q : Koordinaten der Kerne der QM-Atome
 R_c : Koordinaten der MM-Atome

Für das partitionierte System ergibt sich der effektive Hamiltonian folglich als Summe der folgenden Terme:

$$\hat{H}_{eff} = \hat{H}_{QM} + \hat{H}_{QM/MM} + \hat{H}_{MM} \quad (3.5)$$

- \hat{H}_{QM} : Hamiltonian der QM-Region
 $\hat{H}_{QM/MM}$: Hamiltonian für die QM/MM-Wechselwirkungen
 \hat{H}_{MM} : Hamiltonian der MM-Region

Gleichung (3.5) bildet die Grundlage der angewendeten QM/MM-Methode. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, muss ein zusätzlicher *boundary*-Term definiert werden, um Beschränkungen durch die begrenzte Systemgröße zu kompensieren [100]. Die Repräsentation der Umgebung kann - wie bei reinen kraftfeldbasierten MD-Simulationen - durch periodische [102] oder stochastische Randbedingungen (s. Kapitel 3.2.1) erfolgen. Zur Vereinfachung der weiteren Beschreibung wird angenommen, dass die entsprechenden Parameter im Simulationsprozess implementiert sind [103]. Im Folgenden werden die einzelnen Summanden der obigen Gleichung näher erläutert.

Der quantenmechanische Hamilton-Operator lässt sich durch die folgende Funktion ausdrücken:

$$\hat{H}_{QM} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{2N} \nabla_i^2 - \sum_{m=1}^M \sum_{i=1}^{2N} \frac{Z_m}{r_{im}} + \sum_{i<j} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{m<n} \frac{Z_m Z_n}{R_{mn}} \quad (3.6)$$

$2N$: Summe aller Elektronen

M : Summe der QM-Atome

i, j : Koordinaten der Elektronen

m, n : Koordinaten der Atomkerne

r : Elektron-Elektron- oder Elektron-Kern-Abstand

R : Abstand zweier Atomkerne

Z : effektive Kernladung

Die Gleichung beschreibt die Energieberechnung für die QM-Partikel im Vakuum. Sie ist nur von den Positionen der Atomkerne und Elektronen sowie der Anzahl der Ladungen abhängig und wird in atomaren Einheiten angegeben. Weiterführende Informationen sind in entsprechender Fachliteratur zu finden, z.B. [104][105].

Besondere Beachtung gilt der Berechnung der Wechselwirkungen zwischen den Regionen. Ihre Berücksichtigung ermöglicht eine realistische Repräsentation der Proteinumgebung oder Wasserhülle für die QM-Region. Der Hybrid-Hamilton-Operator lässt sich in einen elektrostatischen ($\hat{H}_{QM/MM}^{el}$) und einen dispersiven Term ($\hat{H}_{QM/MM}^{Disp}$) unterteilen:

$$\begin{aligned}
\hat{H}_{QM/MM} &= \hat{H}_{QM/MM}^{el} + \hat{H}_{QM/MM}^{Disp} \\
&= \left(- \sum_{s=1}^S \sum_{i=1}^{2N} \frac{q_s}{r_{is}} + \sum_{s=1}^S \sum_{m=1}^M \frac{q_s Z_m}{R_{ms}} \right) \\
&\quad + \sum_{s=1}^S \sum_{m=1}^M 4 \epsilon_{ms} \left[\left(\frac{s_{ms}}{R_{ms}} \right)^{12} - \left(\frac{s_{ms}}{R_{ms}} \right)^6 \right]
\end{aligned} \tag{3.7}$$

- q_s : Partialladung der MM-Atome
 S : Summe der interagierenden MM-Atome
 r : Abstand der QM-Elektronen von den MM-Atomen
 R : Abstand der QM-Atomkerne von den MM-Atomen
 ϵ_m, s_m : Lennard-Jones Parameter

Die elektrostatischen Wechselwirkungen ergeben sich aus den Partialladungen q_s der MM-Atome, den QM-Elektronen und den effektiven Kernladungen der QM-Atome in Abhängigkeit vom Abstand der beteiligten Partikel. Dabei werden die elektrostatischen Einflüsse zwischen den Regionen ähnlich zu reinen quantenmechanischen Interaktionen behandelt.

Zur Bestimmung der Dispersionseffekte zwischen QM- und MM-Atomen wird ein Lennard-Jones Potenzial verwendet. Die benötigten Parameter ϵ_m und s_m können für die jeweiligen Atomtypen aus dem verwendeten Kraftfeld entnommen werden.

Im $\hat{H}_{QM/MM}$ werden auch Polarisierungseffekte der MM-Region auf die QM-Region berücksichtigt. Sie sind in den effektiven Potenzialen empirisch implementiert und spiegeln so die durchschnittlichen polarisierenden Einflüsse wieder. Eine individuellere Bestimmung wäre nur unter Berücksichtigung eines induzierten Dipols möglich. Dieser hängt wiederum von der jeweiligen atomaren Polarisierbarkeit und dem elektrischen Feld aller Atome des Systems ab. Auf diese Weise besteht eine Verknüpfung zwischen der Wellenfunktion und dem Dipolmoment, wodurch eine zeitaufwändige Lösung nach der Selbstkonsistenzmethode notwendig wäre [95].

Der Hamiltonian \hat{H}_{MM} repräsentiert die Atome der MM-Region. Die potenzielle Energie wird mit Hilfe des in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Kraftfeldes ermittelt und setzt sich aus den Energietermen für Atombindungen, Bindungswinkel, Torsionswinkel, elektrostatischen und dispersiven Wechselwirkungen zusammen (s. Gleichung (3.8) und Anhang E).

$$\hat{H}_{MM} = E_B + E_W + E_T + E_{ele} + E_{Disp} \quad (3.8)$$

Die Berechnung der Gesamtenergie des Systems lässt sich aus den Gleichungen (3.4) und (3.5) ableiten:

$$E(R_q, R_c) = E_{QM} + E_{QM/MM} + E_{MM} \quad (3.9)$$

R_q : Koordinaten der Kerne der QM-Atome

R_c : Koordinaten der MM-Atome

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Berechnung der quantenmechanisch behandelten Region die semiempirische Methode AM1 (s. Kapitel 3.1.1) benutzt. Eine Anwendung von *ab initio* Methoden wäre mit dem vorgestellten Hybridverfahren ebenso möglich, jedoch ist der Rechenaufwand für QM/MM-MD-Simulationen für die zur Verfügung stehenden Computern zu groß. Insofern müssen etwaige Schwächen der semiempirischen Methode toleriert und bei der Bewertung der Ergebnisse entsprechend berücksichtigt werden.

Zur Bestimmung der potenziellen Energie der MM-Region diene das CHARMM22-Kraftfeld (s. Kapitel 3.1.2).

3.3 Berechnung von relativen Bindungsaffinitäten

Die Vorhersage der biologischen Aktivität niedermolekularer Verbindungen an Rezeptoren oder Enzymen gehört zu den Zielen des rationalen Wirkstoffdesigns. Unter der Annahme, dass sich die biologische Aktivität proportional zur Bindungsaffinität verhält, kann die Ligandenbindung als Vorgang unter Gleichgewichtsbedingungen beschrieben werden, der durch Assoziation und Dissoziation gekennzeichnet ist und in Form einer thermodynamischen Gleichgewichtsgröße ausgedrückt werden (s. Gleichung (3.10)) [106].

$$K_A = K_i^{-1} = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (3.10)$$

- K_A : Assoziationskonstante
 K_i : Inhibitionskonstante (= Dissoziationskonstante)
 $[RL]$: Konzentration des Enzym-Ligand-Komplexes
 $[R],[L]$: Konzentrationen von Enzym, Ligand

Die Grundlage zur Betrachtung biochemischer Prozesse ist die Gleichung zur Berechnung der Änderung der freien Enthalpie¹ ΔG , die sich aus dem Ersten und Zweiten Hauptsatz der Thermodynamik ableitet und 1878 von J. W. Gibbs eingeführt wurde (3.11).

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S \quad (3.11)$$

- ΔG : Änderung der freien Enthalpie des Systems
 ΔH : Änderung der Enthalpie des Systems
 T : absolute Temperatur
 ΔS : Änderung der Entropie des Systems

Die Gleichung gilt für Umwandlungen unter konstantem Druck und Temperatur. Die Änderung der Enthalpie kann wie folgt hergeleitet werden:

$$\Delta H = \Delta E + P * \Delta V \quad (3.12)$$

- ΔH : Änderung der Enthalpie des Systems
 ΔE : Änderung der inneren Energie
 P : Druck
 ΔV : Volumenänderung

Obige Gleichungen zeigen, dass ΔG nur von der Änderung der inneren Energie ΔE und der Entropieänderung ΔS abhängig ist, wenn man berücksichtigt, dass

¹ Die freie Enthalpie wird im englischen Sprachraum als „Gibbs free energy“ bezeichnet.

die Volumenänderung ΔV bei nahezu allen biologischen Reaktionen klein ist und daher ΔH nahezu ΔE entspricht [107].

Für den Ablauf von chemischen Reaktionen und enzymatischen Umsetzungen ist die Änderung der freien Enthalpie ΔG entscheidend. Nur wenn ΔG negativ ist, laufen biochemische Prozesse spontan ab. Die Beziehung zwischen ΔG und der Gleichgewichtskonstanten einer Enzym-Inhibitor-Bindung ist durch die Gleichung (3.13) gegeben.

$$\Delta G = RT \ln K_i \quad (3.13)$$

R : allgemeine Gaskonstante (8,314472 J / mol * K)

Die Untersuchung des Bindungsunterschieds von zwei Liganden am gleichen Enzym kann mit Hilfe von ΔG beider Prozesse bestimmt werden. Mit Hilfe von Gleichung (3.14) kann die Bindungsenthalpiedifferenz (relative freie Bindungsenthalpie) $\Delta\Delta G$ auch direkt aus den Inhibitionskonstanten der untersuchten Reaktionen ermittelt werden.

$$\Delta\Delta G = RT \ln \frac{K_2}{K_1} = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (3.14)$$

$\Delta\Delta G$: Bindungsenthalpiedifferenz

K_1, K_2 : Inhibitionskonstanten von Ligand 1 und 2

$\Delta G_1, \Delta G_2$: Änderung der freien Bindungsenthalpie von
Ligand 1 und 2

Die Bestimmung von $\Delta\Delta G$ mit Hilfe von MD-Simulationen bietet eine direkte Verbindung zwischen den simulierten Strukturen und den thermodynamischen Eigenschaften der Enzym-Ligand-Komplexe. Grundlage der Berechnungen ist die Beziehung zwischen der Änderung der freien Enthalpie eines betrachteten Systems und dem Ensemblemittelwert der zur Beschreibung des Systems angewendeten Energiefunktion [108][109]. Die genauen Zusammenhänge ergeben sich aus den Gesetzen der statistischen Mechanik (detailliertere Informationen s. Referenz [110]).

Unter Berücksichtigung obiger Beziehungen sind in theoretischen Untersuchungen sowohl die relative freie Enthalpie ΔG als auch relative freie

Energie¹ ΔA , die sich aus der Helmholtz-Funktion berechnet, zugänglich. Der Unterschied zwischen beiden Werten ist für Vorgänge in Lösung vernachlässigbar und entspricht dem Produkt aus Druck und Volumenänderung während einer isobaren und isothermen Reaktion [106].

3.3.1 Thermodynamischer Zyklus

Die Berechnung von relativen freien Bindungsenthalpien kann durch die Darstellung eines thermodynamischen Zyklus veranschaulicht werden. In Abbildung 3.2 ist die Bindung zweier unterschiedlicher Inhibitoren 1 und 2 am gleichen Enzym dargestellt. Die waagerechten Pfeile entsprechen den Reaktionen, die üblicherweise experimentell untersucht und für die Inhibitionskonstanten bestimmt werden können. Eine Simulation dieser Prozesse ist extrem schwierig, da Enzym und Inhibitor zueinander diffundieren müssten. Häufig findet während der Bindung auch noch eine Anpassung der Konformation von Enzym und Ligand statt, sodass es neben dem exorbitanten Rechenaufwand unmöglich erscheint, eine geeignete Reaktionskoordinate zu definieren und konvergente relative freie Bindungsenthalpien zu berechnen.

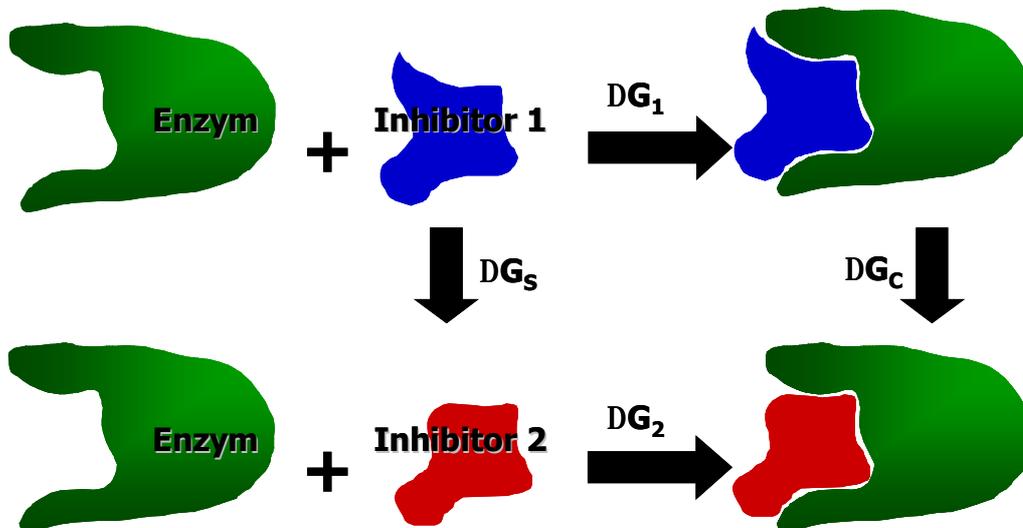


Abbildung 3.2: Darstellung der Bindung zweier Liganden an einem Enzym als thermodynamischer Zyklus. Die waagerechten Routen entsprechen der experimentell messbaren Bindung von Inhibitoren am Enzym, die senkrechten Pfeile der strukturellen Veränderung von einem zum anderen Inhibitor in wässriger Umgebung und im Enzym.

Alternativ können in Computersimulationen Routen unphysikalischer Prozesse genutzt werden, um den Bindungsenthalpieunterschied zwischen zwei Inhibitoren zu bestimmen. Sie sind durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet. Es

¹ Die freie Energie wird im englischen Sprachraum als „Helmholtz free energy“ bezeichnet.

ist dabei notwendig, die strukturelle Änderung von Inhibitor 1 zu Inhibitor 2 sowohl in Wasser (ΔG_s) als auch in Proteinumgebung (ΔG_c) zu simulieren. Die Nutzung dieses Weges zur Berechnung der relativen freien Bindungsenthalpie ist anwendbar, da es sich hierbei um eine Zustandsfunktion handelt und ihr Wert unabhängig vom gewählten Berechnungsweg ist [111].

Gleichung (3.15) zeigt, dass sich der Bindungsaffinitätsunterschied $\Delta\Delta G$ der Inhibitoren folglich aus der Differenz der waagerechten oder senkrechten Enthalpieunterschiede bestimmen lässt.

$$\Delta\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_c - \Delta G_s \quad (3.15)$$

Zum genauen Vergleich von berechneten freien Enthalpien und experimentellen Bindungskonstanten ist es sinnvoll, während der Computersimulation dem Experiment ähnliche Umgebungsbedingungen zu wählen.

3.3.1.1 Thermodynamische Störungstheorie

Zur *in silico* Bestimmung von relativen freien Enthalpien ΔG_s und ΔG_c (s. Kapitel 3.3.1) kann die im Folgenden beschriebene *Free Energy Perturbation*¹ (FEP) Methode angewendet werden. Sie basiert auf den Gleichungen von Zwanzig [112] und eignet sich zur Untersuchung von Inhibitoren, die sich strukturell nur geringfügig voneinander unterscheiden.

Zur Anwendung der FEP-Methode wird ein Koordinatenset erstellt, in dem alle Atome der beiden beteiligten Inhibitoren sowie der Umgebung (Wasserhülle oder Enzym) vorhanden sind. Ein System, in dem beide Inhibitoren gleichzeitig vorliegen, wird auch als duale Topologie² bezeichnet. Die Atome des Inhibitors 1 bilden das Segment X. Segment Y beinhaltet die Atome des Inhibitors 2. Zur korrekten Energieberechnung sind jegliche Wechselwirkungen zwischen Segment X und Y deaktiviert. Die Inhibitoren interagieren jeweils nur mit der Umgebung. Die Gleichung (3.16) zeigt die grundlegende Beziehung, auf der die Berechnungen basieren.

$$\Delta G_{X \rightarrow Y} = k_B T \ln \left\langle e^{-\frac{E_Y - E_X}{k_B T}} \right\rangle \quad (3.16)$$

¹ perturbation (engl.): Störung

² Topologie: Lehre von allgemeinen räumlichen Beziehungen und Eigenschaften des Raumes

$\Delta G_{X \rightarrow Y}$:	Enthalpieunterschied zwischen Segment X und Y
$E_Y - E_X$:	Energiedifferenz zwischen Segment Y und X
k_B :	Boltzmann-Konstante ($1,38066 \cdot 10^{-23}$ J/K)
T :	absolute Temperatur

Die Energiedifferenz zwischen Segment Y und X stellt einen Mittelwert (symbolisiert durch eckige Klammern) dar, der sich aus den sich ändernden Energien der unterschiedlichen Strukturen ergibt. Zur Ermittlung der Mittelwerte der Energiedifferenzen wird eine Serie von MD-Simulationen durchgeführt, in denen Segment X schrittweise in Segment Y umgewandelt wird.

Eine Voraussetzung für die Berechnung verlässlicher Energiedifferenzen ist die Ähnlichkeit zwischen den Inhibitoren und die damit verbundene Überlappung ihrer Phasenräume¹. Diese Überlappung kann durch die Einführung von Übergangszuständen zwischen den Segmenten X und Y verbessert werden (s. Abbildung 3.3).

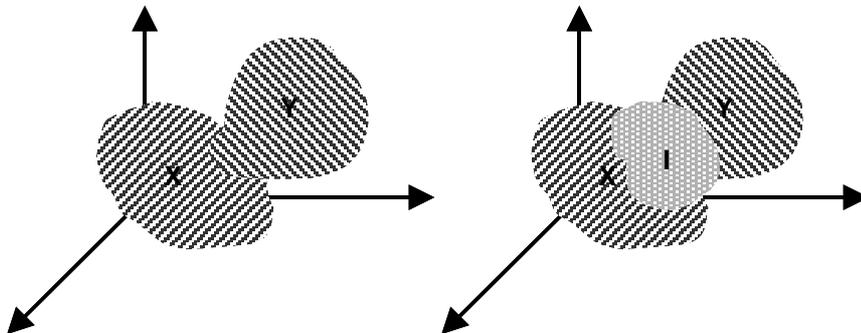


Abbildung 3.3: Links: Die Phasenräume der Segmente X und Y überlappen nur geringfügig. Rechts: Die Einführung eines Übergangszustands I verbessert die Überlappung zwischen X und Y.

Der Kopplungsparameter I ermöglicht die Schaffung von Übergangszuständen während der MD-Simulationen. Er dient der Skalierung der Energiefunktion $\hat{H}(I)$ (s. Gleichung (3.17)). Die Schrittgröße ΔI bestimmt die Anzahl der Übergangszustände, die zu einer Serie gehören. Je kleiner die Schrittgröße gewählt wird, desto größer ist die Ähnlichkeit zwischen den Übergangszuständen. Es steigt aber auch die Zahl der notwendigen MD-Simulationen.

$$\hat{H}(I) = \hat{H}_0 + (1-I)\hat{H}_X + I\hat{H}_Y \quad (3.17)$$

\hat{H}_0 : Energiefunktion der Umgebung

\hat{H}_X : Energiefunktion des Segments X (Inhibitor 1)

\hat{H}_Y : Energiefunktion des Segments Y (Inhibitor 2)

I : Kopplungsparameter

Der Kopplungsparameter I nimmt Werte zwischen Null und Eins an. Für den I -Wert Null besteht die Energiefunktion nur aus den Hamilton-Operatoren des Inhibitors 1 (Segment X) und der Umgebung. Der Hamilton-Operator des Inhibitors 2 (Segment Y) ist ausgeschaltet und hat keinen Einfluss auf die Energieberechnung. Bei I gleich Eins ist der Einfluss des Inhibitors 1 deaktiviert und die Energie des Systems wird nun nur noch durch die Terme \hat{H}_Y und \hat{H}_0 bestimmt und nicht mehr durch \hat{H}_X [113][114].

Der beschriebene Ansatz wird auch als *forward sampling*² bezeichnet, da die freie Enthalpie in Richtung $\lambda_i \rightarrow \lambda_{i+1}$ bestimmt wird. Hingegen erfolgt beim *backward sampling*³ die Berechnung in Richtung $\lambda_i \rightarrow \lambda_{i-1}$. Die Ermittlung der Enthalpieunterschiede durch eine kombinierte Berechnung der Unterschiede in beiden Richtungen ist unter dem Namen *double wide sampling*⁴ bekannt.

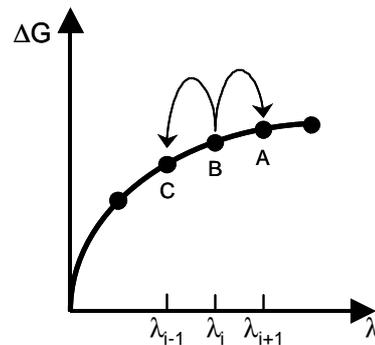


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der *double wide sampling*⁴ Methodik.

¹ Der Phasenraum ist der mathematische Raum der zeitlich veränderlichen Variablen, die zu einem System von Differenzialgleichungen gehören.

² forward sampling (engl.): Stichprobennahme vorwärts

³ backward sampling (engl.): Stichprobennahme rückwärts

⁴ double wide sampling (engl.): Stichprobennahme vorwärts und rückwärts

Abbildung 3.4 veranschaulicht das Prinzip der Berechnung der Enthalpieunterschiede zwischen den Punkten B und A (*forward sampling*) sowie B und C (*backward sampling*). Das Verfahren ermöglicht eine effiziente Berechnung der Enthalpieänderungen, da mittels einer einzelnen Simulation die doppelte I -Schrittgröße abgedeckt werden kann.

3.3.1.2 Thermodynamische Integration

Eine alternative Möglichkeit zur Berechnung von Bindungsenthalpiedifferenzen bietet die Thermodynamische Integration (TI) [115]. Die Durchführung der benötigten MD-Simulationen erfolgt analog zur FEP-Methode (vgl. Kapitel 3.3.1.1) einschließlich der Anwendung einer dualen Topologie. Ebenso dient ein Kopplungsparameter I zur Skalierung der Energiefunktion.

Zur Ermittlung der Enthalpieunterschiede wird folgende Gleichung verwendet:

$$\Delta G_{X \rightarrow Y} = \int_{I=0}^{I=1} \left\langle \frac{\partial \Delta E(r, I)}{\partial I} \right\rangle_I dI \quad (3.18)$$

$\Delta G_{X \rightarrow Y}$: Enthalpieunterschied zwischen den Segmenten X

und Y

ΔE : Energiedifferenz der Segmente X und Y

r : Raumkoordinaten der Segmente

I : Kopplungsparameter

Die Bestimmung des Integrals erfolgt aus den durchschnittlichen Energiedifferenzen zwischen den Segmenten X und Y, die in MD-Simulationen mit verschiedenen Werten für I ermittelt werden. Aufgrund der linearen λ -Abhängigkeit (vgl. Gleichung (3.17)) entspricht die Ableitung der potenziellen Energie in Bezug auf I folglich:

$$\frac{\partial E(r, I)}{\partial I} = E_X(r) - E_Y(r) \quad (3.19)$$

$E_{X,Y}$: potenzielle Energien der Segmente X und Y

Unter Anwendung von Gleichung (3.19) ergibt sich für die Änderung der freien Enthalpie das Integral [116]:

$$\Delta G_{X \rightarrow Y} = \int_{l=0}^{l=1} \langle E_X(r) - E_Y(r) \rangle_l dl \quad (3.20)$$

3.3.2 Erweiterung des thermodynamischen Zyklus

Bei der Bestimmung von relativen Bindungsaffinitäten zwischen zwei unterschiedlichen Inhibitoren bestehen atomare Unterschiede, die in quantenmechanischen Berechnungen unter Anwendung der Molekülorbitaltheorie nicht behandelt werden können. Um die Untersuchung derartiger Problemstellungen auch mit quantenmechanischen Verfahren durchzuführen, wurde der in Kapitel 3.3.1 beschriebene thermodynamische Zyklus erweitert.

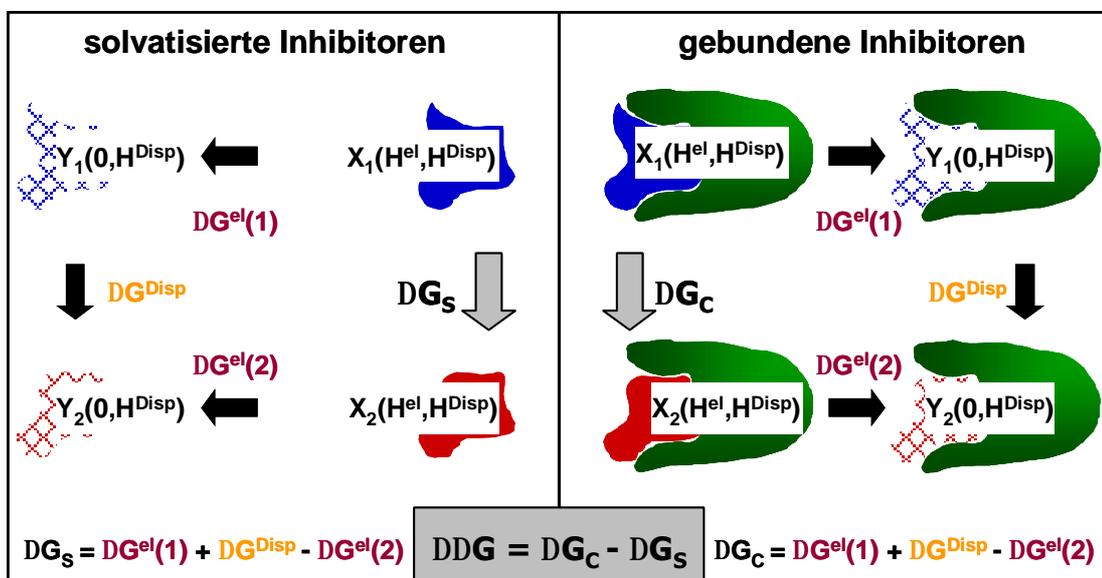


Abbildung 3.5: Erweiterter thermodynamischer Zyklus.

Abbildung 3.5 dient zur Veranschaulichung der notwendigen Simulationen. Das Schema zeigt die Inhibitoren auf der linken Seite in einer wässrigen Umgebung. Im rechten Teil der Abbildung liegen die Inhibitoren im Komplex mit dem Enzym vor. Die Bestimmung des elektrostatischen Anteils der Enthalpieänderungen ΔG^{el} erfolgt in QM/MM-MD-Simulationen entlang der waagerechten schwarzen Pfeile (s. Kapitel 3.3.2.1). Dabei werden sämtliche elektrostatischen Wechselwirkungen der Liganden mit der Umgebung (Wasserhülle bzw. Enzym) schrittweise verringert, sodass als Ergebnis nur noch Dispersionseffekte zwischen beiden vorliegen. Die senkrechten schwarzen Pfeile kennzeichnen kraftfeldbasierte MD-Simulationen, die zur Berechnung des dispersiven Anteils ΔG^{Disp} dienen (s. Kapitel 3.3.2.2). Der relative Bindungsaffinitätsunterschied

$\Delta\Delta G$ kann mit Hilfe der angegebenen Formeln aus den Enthalpieänderungen der sechs einzelnen MD-Simulationen bestimmt werden.

3.3.2.1 Bestimmung des elektrostatischen Anteils relativer Bindungsaffinitäten

Zur Berechnung des elektrostatischen Anteils von Enthalpieunterschieden unter Berücksichtigung von Polarisierungseffekten wurde eine kombinierte FEP-QM/MM-Methode angewendet [95][117]. Sie beruht auf den bereits beschriebenen Grundlagen für QM/MM-Hybridverfahren aus Kapitel 3.2.3 und der Thermodynamischen Störungstheorie (s. Kapitel 3.3.1.1). Abweichend von der vorhergehenden Beschreibung liegt in jedem System jeweils nur ein Inhibitor in zwei unterschiedlichen Zuständen vor. Der Unterschied zwischen Zustand X und Y besteht in den elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Umgebung (MM-Region). Die QM/MM-MD-Simulationen dienen der Bestimmung des elektrostatischen Anteils der Bindungsenthalpieänderung (s. Gleichung (3.21)) zwischen Zustand X (vollständige Wechselwirkungen zwischen QM- und MM-Region) und Y (nur Dispersionswechselwirkungen zwischen QM- und MM-Region). Zu diesem Zweck wird ebenfalls ein Kopplungsparameter λ zur Simulation von Übergangszuständen eingeführt. Er ändert sich schrittweise während der Berechnungen von Eins (Zustand X) auf Null (Zustand Y).

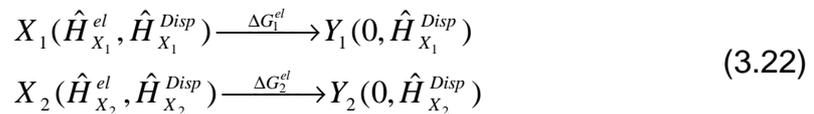
$$\hat{H}_X(\lambda) = \lambda \hat{H}_X^{el} + \hat{H}_X^{Disp} \quad (3.21)$$

\hat{H}_X : Hamiltonian, für die Gesamtenthalpieänderung

\hat{H}_X^{el} : Hamiltonian für den elektronischen Anteil von \hat{H}_X

\hat{H}_X^{Disp} : Hamiltonian für den dispersiven Anteil von \hat{H}_X

Bei diesem Verfahren werden die elektronischen Terme der QM/MM-Wechselwirkungen in einer Serie von MD-Simulationen in Abhängigkeit vom Kopplungsparameter λ verringert und schrittweise ΔG^{el} bestimmt.



- X_1, X_2 : Inhibitoren 1 und 2
 Y_1, Y_2 : Zwischenzustände der Inhibitoren 1 und 2
 \hat{H}^{el} : Hamilton-Operator für den elektronischen Anteil von \hat{H}_X
 \hat{H}^{Disp} : Hamilton-Operator für den dispersiven Anteil von \hat{H}_X
 $\Delta G_1^{el}, \Delta G_2^{el}$: elektrostatische Anteile der Enthalpieänderung

Im Ergebnis dieser Simulationen besitzt jeder Inhibitor nur noch Dispersionswechselwirkungen mit der Umgebung (s. Gleichung (3.22)). In einer anschließenden Simulation kann dann ein Inhibitor mit Hilfe einer reinen MM-Methode in einen anderen umgewandelt werden (s. Kapitel 3.3.2.2). In Kapitel 3.3.1.2 ist beschrieben, wie sich der relative Bindungsaffinitätsunterschied aus den Einzeltermen ermitteln lässt.

3.3.2.2 Bestimmung des dispersiven Anteils relativer Bindungsaffinitäten

Zur Umwandlung der atomaren Struktur vom einen zum anderen Inhibitor wurde in der vorliegenden Arbeit die BLOCK-Methode des CHARMM-Softwarepaketes angewendet [118]. Hierbei handelt es sich um eine kraftfeldbasierte Methode, die mit Hilfe der Thermodynamischen Integration (s. Kapitel 3.3.1.2) die relative Bindungsenthalpie bestimmt.

Zu Beginn ist es notwendig, ein System zu erstellen, in dem sowohl Inhibitor 1 als auch Inhibitor 2 vorliegen. Atome, die nur in einem Liganden vorkommen, werden jeweils in unterschiedliche Segmente eingeteilt und die Wechselwirkungen zwischen den entsprechenden Atomen abgeschaltet (s. duale Topologie, Kapitel 3.3.1.1). Die Besonderheit bei der Anwendung der BLOCK-Methode besteht darin, dass die sich ändernden Atome keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Umgebung besitzen. Dadurch ist

es möglich, den dispersiven Anteil der Enthalpieänderung zu bestimmen (s. Gleichung (3.23)).

$$Y_1(0, \hat{H}_{X_1}^{Disp}) \xrightarrow{\Delta G^{Disp}} Y_2(0, \hat{H}_{X_2}^{Disp}) \quad (3.23)$$

Y_1, Y_2 : Zwischenzustände der Inhibitoren 1 und 2

\hat{H}^{Disp} : Hamilton-Operator für den dispersiven Anteil von
 \hat{H}_X

ΔG^{Disp} : Dispersionsanteil der Enthalpieänderung

Die Umwandlung von einem in den anderen Inhibitor wird sowohl in Lösung als auch im Komplex mit dem Enzym betrachtet.

3.4 Quantitative Bestimmung von Polarisierungseffekten

Ein wichtiges Merkmal von kombinierten QM/MM-Methoden ist die Bestimmung der Wellenfunktion der quantenmechanisch behandelten Region eingebettet in der Umgebung, die in den hier durchgeführten Simulationen entweder aus dem Enzym oder der Wasserhülle besteht. Eine zusätzliche Bestimmung der Wellenfunktion unter Vakuumbedingungen ermöglicht die Untersuchung verschiedener Eigenschaften, die mit der Bindung von Liganden im Enzym oder der Solvatation verbunden sind. So ist z.B. die Bestimmung der elektronischen Polarisierung eines Liganden, die durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Enzym hervorgerufen wird, möglich (s. Abbildung 3.6).

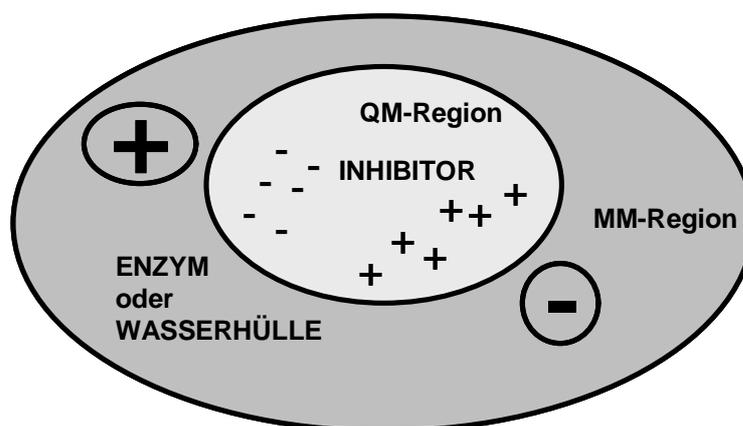


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des elektrostatischen Einflusses der MM-Region auf die QM-Region. Die Partialladungen des Enzyms oder der Wasserhülle (große Ladungssymbole) bewirken eine Anpassung der Ladungsverteilung (Polarisation) des Inhibitors (kleine Ladungssymbole).

Zur Berechnung der oben beschriebenen Polarisierungseffekte ist es notwendig, den gesamten Liganden quantenmechanisch zu behandeln. Die im Folgenden beschriebene Methode dient dabei der Zerlegung der Energiefunktion des Systems, wodurch der Einfluss des Enzyms auf die Ladungsverteilung des Liganden bestimmt werden kann [95][119].

Die Energie des Gesamtsystems wird mittels der bereits beschriebenen Gleichung (3.9) berechnet. Daraus lässt sich die Gleichung zur Ermittlung der Gesamtwechselwirkungen zwischen Ligand und Enzym ableiten:

$$\begin{aligned}\Delta E &= \langle \Psi | \hat{H}_{QM}^0 + \hat{H}_{QM/MM} | \Psi \rangle - \langle \Psi^0 | \hat{H}_{QM}^0 | \Psi^0 \rangle \\ &= \Delta E_{QM/MM}^{Disp} + \Delta E_{QM/MM}^{el}\end{aligned}\quad (3.24)$$

ΔE : Gesamtwechselwirkungsenergie

$\Delta E_{QM/MM}^{Disp}$: Dispersionsanteil von ΔE

$\Delta E_{QM/MM}^{el}$: elektrostatischer Anteil von ΔE

Ψ : Wellenfunktion des Liganden im Enzym

Ψ^0 : Wellenfunktion des Liganden im Vakuum

Die Gesamtwechselwirkungen bestehen entsprechend der Definition des Systems (s. Gleichung (3.7)) aus dispersiven und elektrostatischen Anteilen. Durch die Bindung eines Liganden im Enzym ändert sich seine Umgebung, quantenmechanisch gleichbedeutend mit der Änderung der Wellenfunktion des Inhibitors im Vakuum Ψ^0 zu einer Wellenfunktion in Proteinumgebung Ψ .

Die Polarisierung ist ein elektronischer Effekt, zu dessen Bestimmung folglich nur die elektrostatischen Wechselwirkungen betrachtet werden müssen und deren Änderung sich für das hier beschriebene System folgendermaßen berechnen lässt:

$$\begin{aligned}\Delta E_{el} &= \langle \Psi | \hat{H}_{QM}^0 + \hat{H}_{QM/MM}^{el} | \Psi \rangle - \langle \Psi^0 | \hat{H}_{QM}^0 | \Psi^0 \rangle \\ &= E_{QM} + E_{QM/MM}^{el} - E_{QM}^0\end{aligned}\quad (3.25)$$

Die Abbildung 3.7 veranschaulicht die Zusammensetzung der Interaktionen.

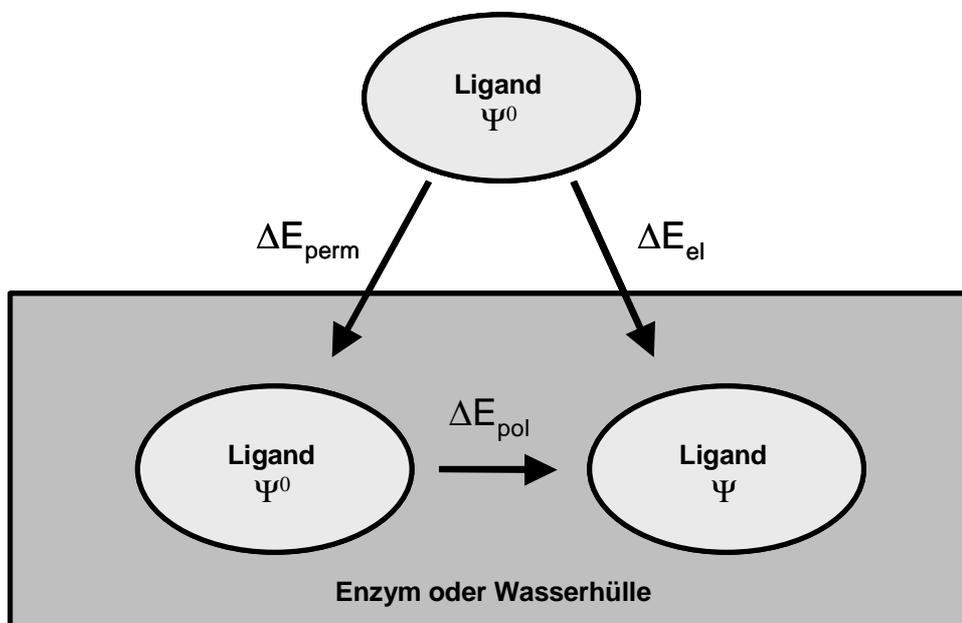


Abbildung 3.7: Zusammensetzung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen QM- und MM-Region.

Der im oberen Teil dargestellte Ligand befindet sich im Vakuum. Er besitzt keinerlei Umgebungseinflüsse und seine Energie wird durch Ψ^0 wiedergegeben. Rechts unten liegt der Ligand gebunden im Enzym oder in solvatisierter Form vor. Es treten elektrostatische Interaktionen mit der Umgebung auf. Die Partialladungen der umgebenden MM-Region führen zu einer Anpassung der Wellenfunktion des Liganden. Die hier verwendete Methode ermöglicht es nun zusätzlich, die Wechselwirkungsenergien zwischen der Umgebung und dem gebundenen Liganden ohne Anpassung der Wellenfunktion zu berechnen. Dieser Zustand ist links unten dargestellt. Dadurch lässt sich der Anteil der elektrostatischen Interaktionen bestimmen, der durch die neue Umgebung bedingt ist. Er wird als permanente Wechselwirkungsenergie ΔE_{perm} bezeichnet. Die Anpassung der Wellenfunktion aufgrund der äußeren Einflüsse repräsentiert hingegen den polarisierenden Effekt ΔE_{pol} des Enzyms auf den Liganden.

Gleichung (3.26) zeigt, dass sich ΔE_{perm} aus der Anwendung der Wellenfunktion der Gasphase auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen QM- und MM-Region ermitteln lässt.

$$\Delta E_{perm} = \langle \Psi^0 | \hat{H}_{QM/MM}^{el} | \Psi^0 \rangle \quad (3.26)$$

Die Polarisation ist wie beschrieben ein Ergebnis der veränderten Wellenfunktion im Enzym. Sie setzt sich additiv aus der Polarisationsstabilisierungsenergie ΔE_{stab} und der elektrostatischen Verformungsenergie ΔE_{dist} zusammen.

$$\Delta E_{pol} = \Delta E_{stab} + \Delta E_{dist} \quad (3.27)$$

Die Polarisationsstabilisierungsenergie entspricht dabei der Zunahme an Wechselwirkungsenergie aufgrund der neuen Ladungsverteilung des Inhibitors im Enzym und ergibt sich wie folgt:

$$\Delta E_{stab} = \langle \Psi | \hat{H}_{QM/MM}^{el} | \Psi \rangle - \langle \Psi^0 | \hat{H}_{QM/MM}^{el} | \Psi^0 \rangle \quad (3.28)$$

Die elektrostatische Verformungsenergie zeigt den energetischen Aufwand an, der notwendig ist, um die neue Ladungsverteilung im gebundenen Zustand zu organisieren und lässt sich nach Gleichung (3.29) ermitteln.

$$\Delta E_{dist} = \langle \Psi | \hat{H}_{QM}^0 | \Psi \rangle - \langle \Psi^0 | \hat{H}_{QM}^0 | \Psi^0 \rangle \quad (3.29)$$

Entsprechend der *Linear Response Theory* ist der Gewinn an Wechselwirkungsenergie ΔE_{stab} doppelt so groß ist wie der Aufwand zur Anpassung der Elektronenverteilung ΔE_{dist} [119][120].

4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

4.1 Vorgehensweise

In der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede der Bindung von ausgewählten Inhibitoren der HIV-1 Protease analysiert, um Strukturmerkmale zu identifizieren, die für besonders günstige Wechselwirkungen verantwortlich sind. Als Basis für die Untersuchungen standen verschiedene Kristallstrukturen von Enzym-Inhibitor-Komplexen zur Verfügung.

Zu Beginn wurden relative Bindungsaffinitäten bekannter Inhibitoren theoretisch ermittelt. Dazu wurde ein kombiniertes QM/MM-Verfahren entwickelt und eingesetzt, das eine sehr detaillierte Bestimmung von Enthalpiedifferenzen ermöglicht.

In anschließenden Untersuchungen erfolgte die Analyse expliziter Wechselwirkungsenergien zwischen der HIV-1 Protease und strukturell sehr unterschiedlichen Inhibitoren. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten genutzt werden, um Strukturmodifikationen zu entwerfen, die zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität führen können.

4.1.1 Auswahl geeigneter Inhibitoren zur Berechnung von Bindungsaffinitäten

Die Anwendbarkeit der FEP-Methode (s. Kapitel 3.3.1.1) ist auf relativ kleine strukturelle Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Inhibitoren beschränkt. Es wurden daher zur Überprüfung der entwickelten Prozedur zwei geeignete Vorstufen des potenten Wirkstoffes Nelfinavir (s. Kapitel 1.2.2 und 1.4.4) ausgewählt.

Die hemmende Wirkung der beiden Substanzen AG1224 und AG1254 (s. Tabelle 4.1) auf die HIV-1 Protease unterscheidet sich um mehr als zwei Zehnerpotenzen, obwohl lediglich eine Nitrogruppe durch eine Hydroxylgruppe an einem Aromaten ersetzt wurde. Die Kristallstrukturen der ausgewählten Liganden waren nicht verfügbar. Ihre strukturelle Ähnlichkeit zum potenten Hemmstoff Nelfinavir ist aber so groß, dass die Koordinaten der HIV-1 Protease im Komplex mit Nelfinavir als Vorlage für die Untersuchungen genutzt werden konnten.

Tabelle 4.1: Ausgewählte Inhibitoren zur Bestimmung relativer Bindungsaffinitäten [121]

Name	Struktur	K_i [nM]
AG1224		540
AG1254		3

4.1.2 Aufbereitung der Kristallstruktur

Die Koordinaten der HIV-1 Protease im Komplex mit Nelfinavir wurden der Proteindatenbank (PDB) entnommen. Die Kristallstruktur (PDB-Code: 1OHR [58]) besitzt eine Auflösung von 2,1 Å.

Die Koordinaten der Wasserstoffatome waren wie üblich nicht angegeben. Daher wurden die Positionen der fehlenden Atome generiert. Die Wahl der Protonierung von funktionellen Gruppen erfolgte entsprechend der physiologischen Bedingungen im Blut (pH=7,4).

Eine besondere Bedeutung besitzt der Protonierungszustand der katalytischen Dyade, die von Asp25 und Asp25' gebildet wird. Es musste untersucht werden, ob diese beiden Aminosäuren auch bei der Bindung von Inhibitoren in einer monoprotonierten Form¹ vorliegen, wie es Voraussetzung für den Ablauf der Substratspaltung ist (s. Kapitel 1.4.3). Bei einem physiologischen pH-Wert liegen saure Aminosäuren normalerweise deprotoniert vor. Verschiedene Untersuchungen des Enzyms zeigten aber eine gegenseitige Beeinflussung der Seitenketten-Carboxylatgruppen von Asp25 und Asp25' aufgrund ihrer

¹ monoprotonierte Form bedeutet hierbei, dass die Carboxylatgruppe der Seitenkette von Asp25 protoniert und die von Asp25' deprotoniert vorliegt.

räumlichen Nähe. So ergaben u.a. NMR-Studien an der mit verschiedenen Inhibitoren komplexierten Protease, dass der erste pK_S -Wert kleiner als 2,5 und der zweite größer als 6,2 ist [122][123]. Dies lässt darauf schließen, dass der monoprotonierte Zustand über einen großen pH-Bereich vorliegt. Dabei hat das Proton vermutlich einen stabilisierenden Effekt auf beide Aminosäuren. Es verhindert durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der unprotonierten und protonierten Säurefunktion eine gegenseitige Abstoßung der beiden Carboxylatgruppen aufgrund der hohen negativen Ladungsdichte.

Im nächsten Abschnitt werden Untersuchungen beschrieben, die die Gültigkeit dieses Protonierungszustandes auch für die hier betrachteten Inhibitoren prüfen.

4.1.3 Protonierungsgrad von Asp25 und Asp25'

Die erwähnten experimentellen Ergebnisse zur Protonierung von Asp25/25' wurden mit Hilfe von MD-Simulationen überprüft. Zum einen wurde ein System untersucht, in dem beide Aspartate negativ geladen vorlagen. Außerdem wurde ein weiteres System erstellt, in dem nur ein Aspartat deprotoniert und der andere Rest als freie Säure vorlag und folglich dem monoprotonierten Zustand der Dyade entspricht. In beiden QM/MM-MD-Simulationen erfolgte die Untersuchung der HIV-1 Protease im Komplex mit Nelfinavir, wobei die QM-Region den vollständigen Inhibitor enthielt. Zur Repräsentation physiologischer Bedingungen wurde das komplexierte Enzym mit einer sphärischen Wasserhülle umgeben (genauere Beschreibung des angewendeten Protokolls zur Vorbereitung und Durchführung der Moleküldynamiksimulationen s. Kapitel 4.2.3 bis 4.2.5). Der einzige Unterschied beider Systeme bestand in der unterschiedlichen Protonierung von Asp25.

Nachdem sich in beiden Dynamiksimulationen ein Gleichgewichtszustand eingestellt hatte, wurden die Veränderungen der Atompositionen im aktiven Zentrum analysiert und miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurde der *Root-Mean-Square-Deviation*¹-Wert (RMSD-Wert) der beteiligten Schweratome bestimmt. Er stellt ein Maß für die Übereinstimmung der Koordinaten zweier Strukturen dar. Es ist zu beachten, dass seine Berechnung von der Anzahl der betrachteten Atome abhängig ist und die Werte daher nur für identisch selektierte Systeme direkt vergleichbar sind (s. Gleichung (4.1)).

¹ Root Mean Square Deviation (engl.): mittlere quadratische Abweichung

$$RMSD = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(x-x^0)^2 + (y-y^0)^2 + (z-z^0)^2}{N}} \quad (4.1)$$

x, y, z : Koordinaten der zu vergleichenden Struktur

x^0, y^0, z^0 : Koordinaten der Referenzstruktur

N : Anzahl der zu vergleichenden Atome

Für die Untersuchung des Protonierungsgrades der katalytischen Dyade anhand der RMSD-Werte wurden die in Abbildung 4.1 rot dargestellten Schweratome ausgewählt.

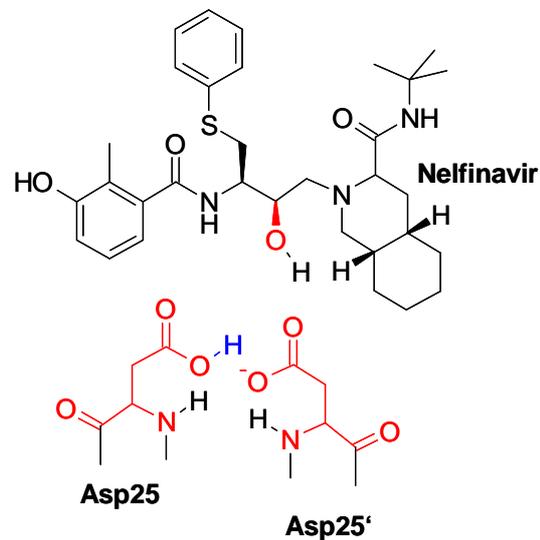


Abbildung 4.1: Aktives Zentrum der HIV-1 PR im Komplex mit Nelfinavir. Die 18 rot markierten Atome wurden zur Untersuchung der Protonierung der beiden Aspartate ausgewählt. Das blaue Wasserstoffatom existiert nur in der Simulation des monoprotonierten Zustandes.

Abbildung 4.2 zeigt den Verlauf der RMSD-Werte für die beiden Systeme im Vergleich zur Kristallstruktur. Es wurden die Daten aus jeweils 50 ps der equilibrierten MD-Simulationen analysiert.

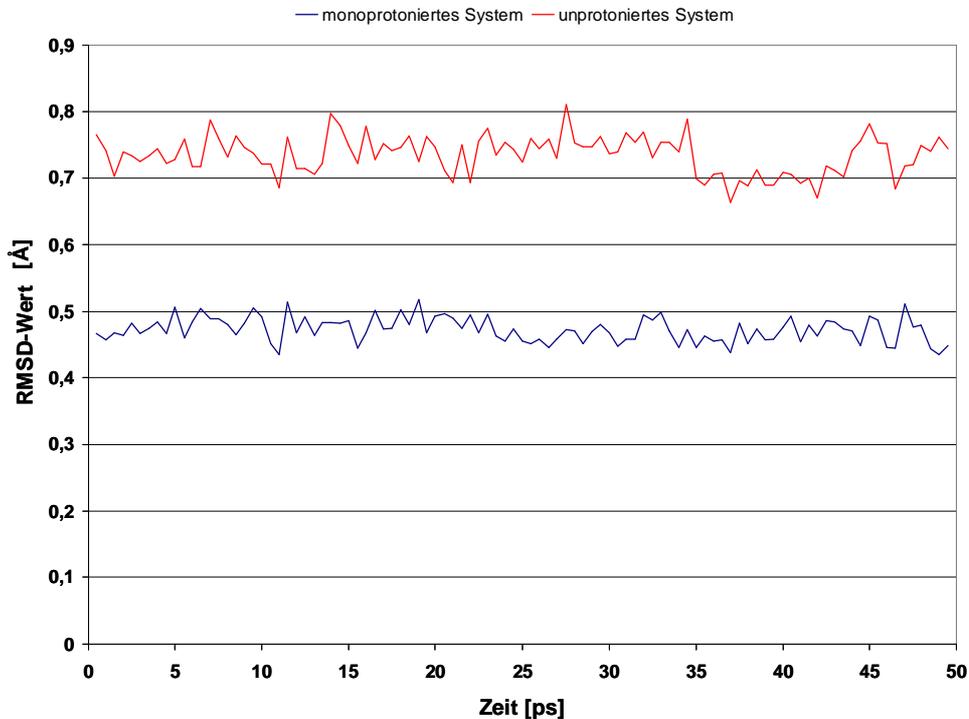


Abbildung 4.2: RMSD-Wert-Analyse über 50 ps der equilibrierten Systeme.

Das Diagramm zeigt, dass die RMSD-Werte im monoprotonierten System wesentlich niedriger sind als im System der unprotonierten Asp25/25'. Die ausgewählten Atome weichen im monoprotonierten System also deutlich weniger von den Positionen in der Kristallstruktur ab. Dadurch werden die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen bestätigt. Die monoprotonierte Dyade aus Asp25 und Asp25' liegt demnach nicht nur bei der Substratspaltung sondern auch im Enzym-Inhibitor-Komplex vor. Daher wurde in den folgenden MD-Simulationen dieser Zustand verwendet.

4.2 Durchführung der Moleküldynamiksimulationen

4.2.1 Modifikation der Liganden in der Kristallstruktur

Für die MD-Simulationen zur Berechnung der relativen Bindungsaffinitäten von AG1224 und AG1254 wurde die Kristallstruktur der HIV-1 Protease im Komplex mit Nelfinavir als Vorlage genutzt. Die große Ähnlichkeit zwischen Nelfinavir und AG1224 sowie AG1254 ermöglichte die Veränderung der Inhibitoren (s. Abbildung 4.3) im aktiven Zentrum. Hierzu wurde Nelfinavir durch den Austausch eines Phenylrestes gegen einen Naphthylrest sowie eines Decahydroisochinolinsystems gegen einen Benzolring in AG1254 umgewandelt. Die Koordinaten von nicht mehr benötigten Atomen wurden

gelöscht und die Positionen der neuen Atome anhand relativer Parameter für Bindungslängen und Bindungswinkel aus dem Kraftfeld erstellt. Das aktive Zentrum besitzt im Bereich des neuen Naphthylsubstituenten genug Raum, um diesen zu binden. Die Änderung vom Decaisochinolin zum einfachen Aromaten führte zu einer Verkleinerung der Inhibitoren an der entsprechenden Position.

Die Veränderung von AG1254 zu AG1224 erfolgte durch den Austausch einer Hydroxylgruppe gegen eine Nitrogruppe am Aromaten. Die modifizierten Ringsysteme befinden sich nicht in Bereichen funktioneller Gruppen, die wichtige Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Enzym ausbilden, sondern in Regionen mit vornehmlich hydrophoben Wechselwirkungen.

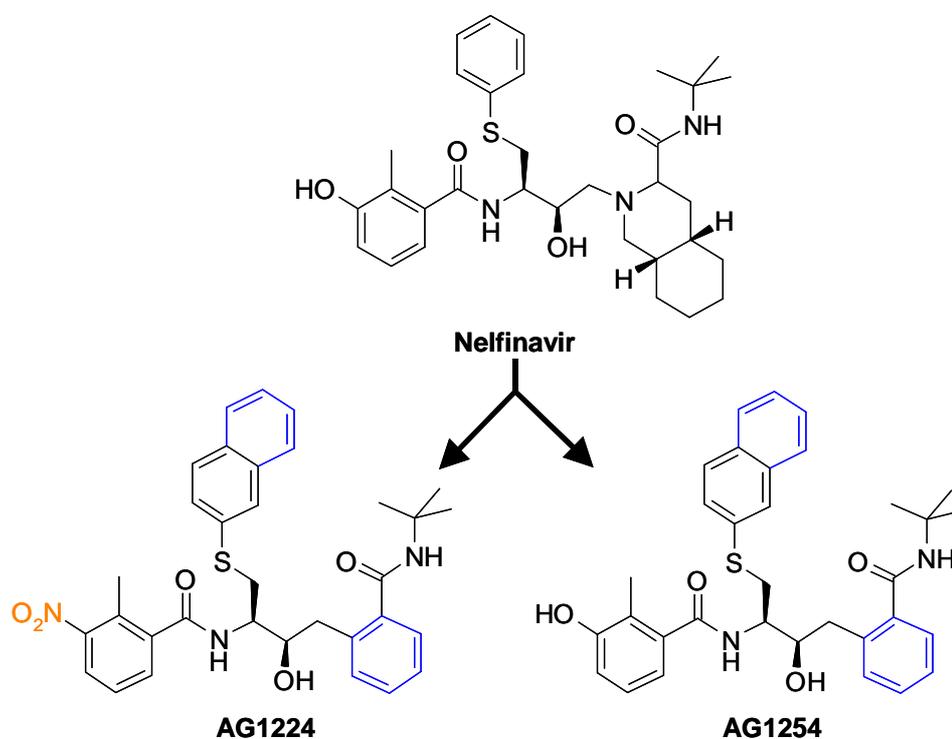


Abbildung 4.3: Umwandlung von Nelfinavir in AG1224 und AG1254. Die Unterschiede zu Nelfinavir sind blau dargestellt. Die zusätzlich benötigten Koordinaten wurden mit Hilfe relativer Bindungs- und Winkelparameter des Kraftfeldes erstellt. Bei AG1224 wurde zusätzlich eine Nitrogruppe (orange) anstelle der Hydroxylgruppe eingeführt.

4.2.2 Definition der QM- und MM-Regionen

Zur Durchführung der QM/MM-MD-Simulationen wurde zunächst eine Systempartitionierung vorgenommen. Zur möglichst genauen Bestimmung der relativen Bindungsaffinität zwischen AG1224 und AG1254 ist es sinnvoll, die gesamten Inhibitoren jeweils quantenmechanisch zu behandeln. Auf diese Weise lassen sich die Vorteile von QM/MM-Verfahren nutzen. Der Grenzverlauf

beider Regionen quer durch eine kovalente Bindung würde die Anwendung von Näherungsverfahren zur Absättigung der Valenzen der QM-Atome erfordern [100][124], wodurch es zu Fehlern kommen kann. Ein Nachteil der gewählten Einteilung ist der enorme Zeitbedarf für die Simulationen, da mit jedem QM-Atom der Rechenaufwand exponentiell zunimmt.

4.2.3 Erstellung einer Referenzstruktur

4.2.3.1 Addition von Wasserstoffatomen

Vor dem Start der Simulationen wurden jedem System die durch Röntgenkristallografie gewöhnlich nicht detektierbaren Wasserstoffatome hinzugefügt. Ihre Positionen an den Aminosäuren des Proteins wurden durch relative Koordinaten des CHARMM22-Kraftfelds für Aminosäuren definiert [80][81]. Die Wasserstoffatome der 51 mitkristallisierten Wassermoleküle wurden durch die HBUILD-Funktion ergänzt [125].

Eine Relaxation der Kristallstruktur erfolgte im Anschluss durch kurze Energieminimierungen. Dabei wurden zuerst die Positionen der Schweratome fixiert, um nur die neu hinzugefügten Wasserstoffatome über 500 Schritte mit der SD-Methode und über 100 Schritte mit der ABNR-Methode zu optimieren. Im Anschluss wurde eine kurze Minimierung (200 Schritte SD- und 100 Schritte ABNR-Methode) aller Atome durchgeführt, wobei Rückhaltekräfte auf den Schweratomen lagen. Als Ergebnis dieser Minimierungen ergaben sich energetisch günstige Konformationen. Die Positionsänderungen der Schweratome waren im Vergleich zur Kristallstruktur nur minimal.

4.2.3.2 Solvation der Enzym-Inhibitor-Komplexe

Zur Berechnung der relativen Bindungsaffinitäten in möglichst physiologischer Umgebung wurde jedem System eine kugelförmige Wasserhülle aus 6840 Molekülen hinzugefügt. Sie wurde auf den jeweiligen Liganden zentriert. Davon wurden 1200 Wassermoleküle, deren Positionen mit den ursprünglichen Atomen überlappten bzw. weniger als 2,8 Å von ihnen entfernt lagen, gelöscht. Des Weiteren wurden 4666 Wassermoleküle (incl. drei Kristallwassern) entfernt, die sich außerhalb eines Radius von 25 Å befanden.

Es erfolgte erneut eine kurze Energieminimierung. Zuerst wurden nur die Wasserstoffatome der addierten Wassermoleküle (500 Schritte SD- und 100 Schritte ABNR-Methode) optimiert, daran anschließend das Gesamtsystem (200 Schritte SD- und 100 Schritte ABNR-Methode) mit Rückhaltekräften auf den Schweratomen.

Die solvatisierten Enzym-Ligand-Komplexe bestehen aus ca. 6280 Atomen. Die Addition der Wasserhülle ermöglicht es, sowohl die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Enzym als auch mit der wässrigen Umgebung möglichst realitätsnah wiederzugeben.

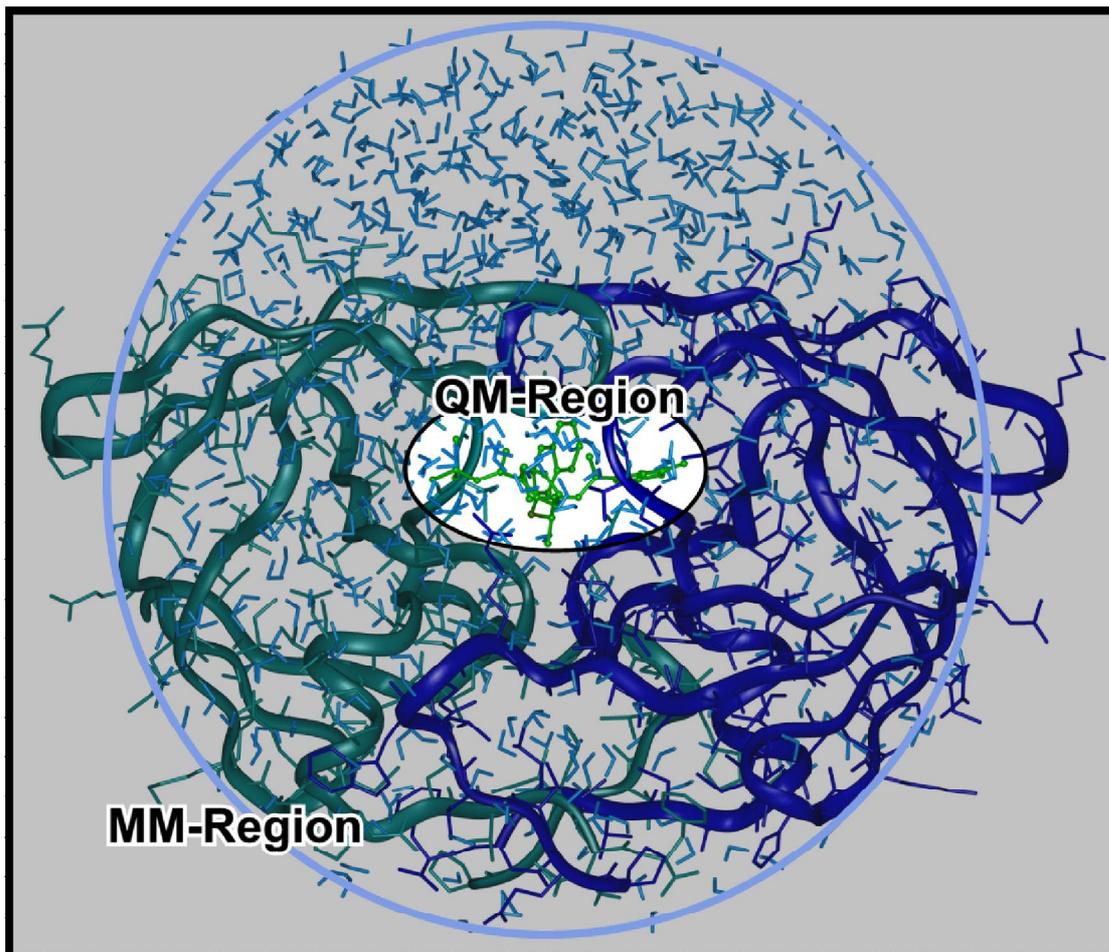


Abbildung 4.4: Referenzstruktur von AG1254 im Komplex mit der HIV-1 Protease. Im Zentrum liegt die QM-Region, bestehend aus dem Inhibitor (grün). Atome im grauen Bereich gehören zur MM-Region. Der blaue Kreis zeigt den Radius der hinzugefügten Wassersphäre, zentriert auf den Inhibitor.

Die nach der beschriebenen Prozedur entstandenen Strukturen dienen in den anschließenden MD-Simulationen als Referenzstruktur für die Definition der Randbedingungen von Langevin-Dynamiken (s. Kapitel 4.2.4). Die Abbildung 4.4 zeigt den entsprechenden Komplex von AG1254 und der HIV-1 Protease.

4.2.4 Definition der Randbedingungen

Für die Durchführung der MD-Simulationen wurden die solvatisierten Enzym-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit vom Abstand zum Zentrum des jeweiligen Liganden in drei Regionen unterteilt (s. Abbildung 4.5).

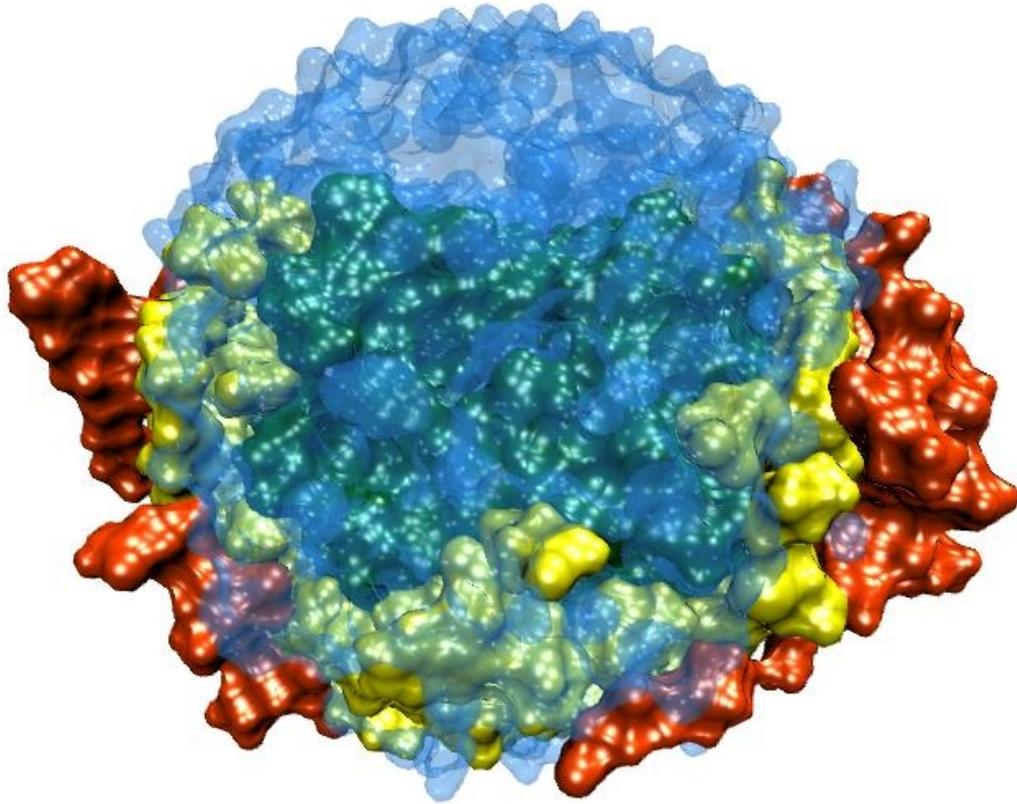


Abbildung 4.5: Einteilung der solvatisierten HIV-1 Protease. Die Oberflächen der Aminosäuren sind in grün, gelb und orange entsprechend ihrer Entfernung vom aktiven Zentrum dargestellt. Die Wasserhülle ist als transparente blaue Kugel zu erkennen. Der grüne Bereich kennzeichnet Aminosäuren vom Zentrum bis zu einem Radius von 20 Å. Die gelben Aminosäuren entsprechen der Langevin-Region im Bereich von 20-25 Å. Die orange-gefärbten Aminosäuren sind mehr als 25 Å vom Zentrum entfernt.

Die innere kugelförmige Zone (grün) besitzt einen Radius von 20 Å. Zu dieser Region gehören neben dem jeweiligen Liganden u.a. alle Aminosäuren des aktiven Zentrums. Für Atome dieser Region handelt es sich um eine freie Dynamiksimulation ohne Rückhaltekräfte (s. Kapitel 3.2). Daran angrenzend liegt eine Pufferregion (gelb), zu der alle Aminosäuren im Bereich von 20 bis 25 Å vom Zentrum gehören. Die Bewegungsfreiheit der Schweratome dieser Region wurde während der Simulationen mit Hilfe von harmonischen *restraints*¹ (s. Gleichung (4.2)) eingeschränkt, wodurch sie in der Nähe ihrer Referenzkoordinaten gehalten wurden. Zu diesem Zweck wurde das Quadrat der Positionsdifferenz mit einer Kraftkonstanten k_{r_i} (schrittweiser Anstieg im Bereich von 20 bis 25 Å von 0,0 bis 0,5) multipliziert und der Gesamtenergie

¹ restraint (engl.): Beschränkung

des Systems hinzugefügt. Je größer die Abweichung zwischen der aktuellen Atomposition und der Referenzstruktur war, desto höher wurde der addierte Energiebetrag, wodurch für das entsprechende Atom ein Zwang entstand, sich wieder in Richtung der ursprünglichen Position zu bewegen.

$$E_{Harm} = \sum_i k_{r_i} (x_i - x_i^{ref})^2 \quad (4.2)$$

x_i : aktuelle Koordinaten des *restrained* Atoms i

x_i^{ref} : Referenzkoordinaten des *restrained* Atoms i

k_{r_i} : Kraftkonstante des *restrained* Atoms i

Die Wasserhülle (blau) besitzt einen Radius von 25 Å. Aufgrund der Gestalt der HIV-1 Protease und der Zentrierung der Sphäre auf den Liganden, existieren einige äußere Aminosäuren, die nicht von Wassermolekülen umgeben sind. Zur Vermeidung von artifiziellen Strukturen, die durch die Bewegung dieser Aminosäuren unter Vakuumbedingungen entstehen könnten, wurden die entsprechenden Atome in ihrer Position festgehalten. Als Nebeneffekt ergab sich durch die Fixierung eine Verringerung der Rechenzeit, da die Wechselwirkungen zwischen den fixierten Atomen nicht bestimmt wurden. Die Interaktionen mit den restlichen Aminosäuren sowie dem Liganden wurden weiterhin berücksichtigt.

4.2.5 Erwärmung und Equilibrierung des Systems

Im Anschluss an die Aufteilung des Systems wurden die eigentlichen MD-Simulationen durchgeführt, die aus verschiedenen Phasen bestehen. Zu Beginn erfolgte jeweils eine Erwärmung über einen Zeitraum von 12 ps. Dabei wurde ausgehend von der Referenzstruktur alle 0,4 ps die Temperatur durch die Zufuhr von kinetischer Energie schrittweise jeweils um 10 K erhöht, bis die gewünschte Simulationstemperatur von 298 K erreicht wurde. Diese Temperatur wurde festgelegt, um die experimentellen Bedingungen wiederzugeben, bei denen die zur Validierung verwendeten Inhibitionskonstanten bestimmt wurden. Des Weiteren wurde die in den QM/MM-MD-Simulationen verwendete AM1-Methode für Simulationen um 300 K parametrisiert. Die natürliche Umgebung der HIV-1 Protease bzw. des gesamten Virus besitzt eine Temperatur von 310 K, entsprechend der

durchschnittlichen Körpertemperatur des Menschen. Die Abweichung hiervon wurde aber aufgrund der angeführten Tatsachen vernachlässigt.

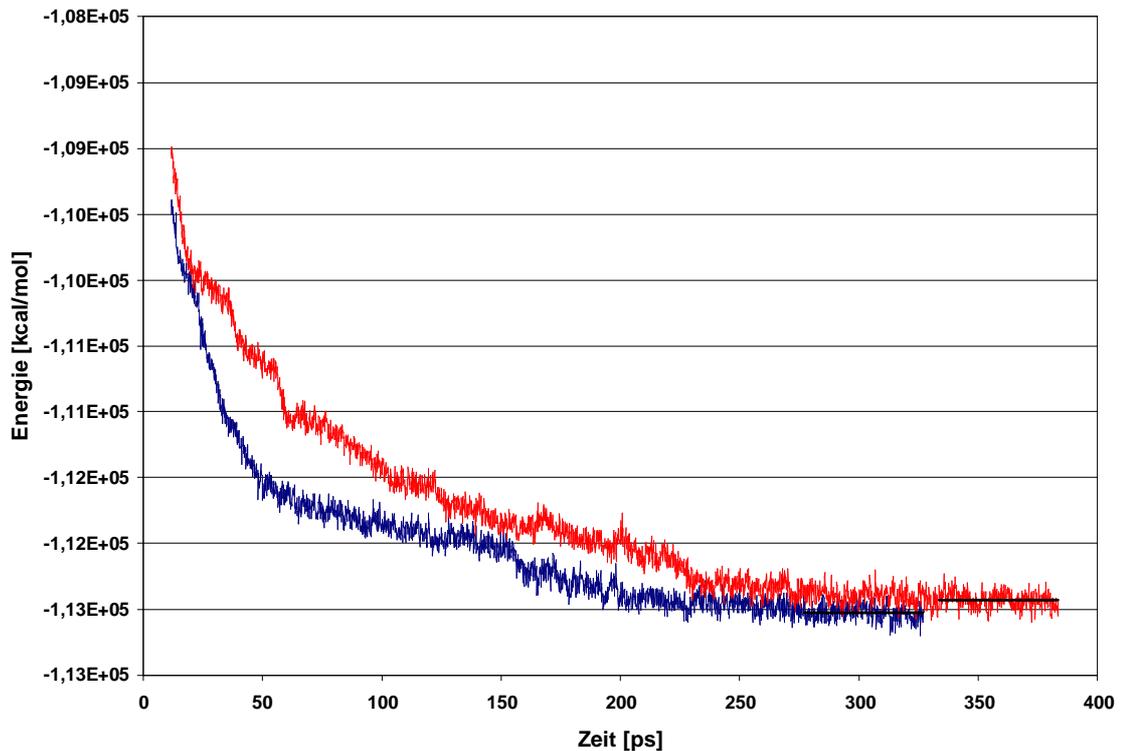


Abbildung 4.6: Verlauf der potenziellen Energie während der Equilibrierungsphasen von AG1224 (rot) und AG1254 (blau) im Komplex mit dem Enzym. Für die letzten 50 ps sind zusätzlich die Mittelwerte dargestellt.

Während der so genannten Equilibrierung im Anschluss an die Erwärmung passen sich die Atome des Systems der neuen Umgebungstemperatur an. Diese Phase dient dazu, das Simulationssystem zu relaxieren, wobei es zu einer Verringerung der Gesamtenergie des Systems kommt. Während der Simulation wird die Solltemperatur durch die Kopplung an ein Wärmebad gehalten. Nach einer gewissen Simulationsdauer stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein, erkennbar an der Fluktuation der Gesamtenergie um einen konstanten Mittelwert. Abbildung 4.6 zeigt den Energieverlauf der Equilibrierungen von AG1224 und AG1254 im Komplex mit der HIV-1 Protease. An den charakteristischen Kurven lässt sich erkennen, dass nach ca. 250 bis 300 ps ein energetisches Gleichgewicht erreicht wurde und im weiteren Verlauf nur noch geringfügige Schwankungen um diesen Wert erfolgen.

Die beschriebene Prozedur der Systeminitialisierung und der Einstellung eines dynamischen Gleichgewichts wurde für die Inhibitoren AG1254 und AG1224 sowohl im Komplex mit der HIV-1 Protease als auch in wässriger Umgebung durchgeführt. Als Ergebnis liegen vier equilibrierte Systeme für die Bestimmung

der relativen Bindungsaffinitätsänderung vor. Exemplarisch ist in Abbildung 4.7 der Inhibitor AG1224 in der wässrigen Umgebung dargestellt.

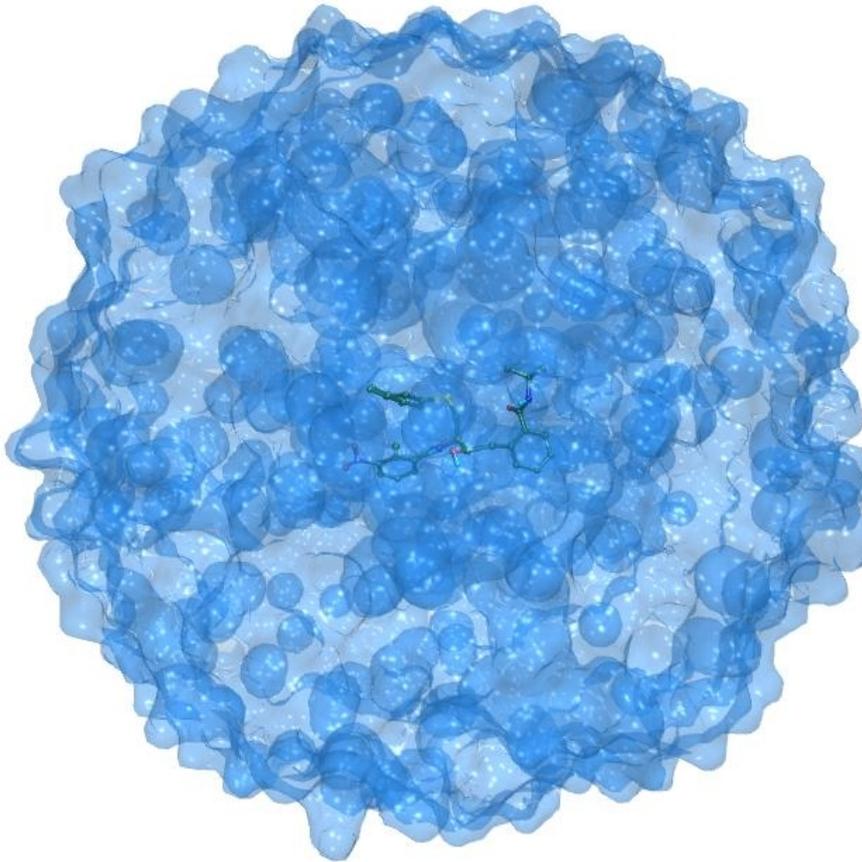


Abbildung 4.7: Inhibitor AG1224 im Zentrum der Wassersphäre. Die Wassermoleküle sind als transparente blaue Atomradien dargestellt.

Das beschriebene Verfahren wurde als Standardmethode zur Generierung von Systemen für MD-Simulationen angewendet, die auf Kristallstrukturdaten beruhen. Als Zusammenfassung zeigt Abbildung 4.8 eine schematische Übersicht der durchgeführten Schritte. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird an den gegebenen Stellen auf die Beschreibung in diesem Kapitel verwiesen, um Wiederholungen zu vermeiden.

1.

Systemgenerierung

Einlesen der Kristallstrukturkoordinaten

- Protein-Schweratome
- Sauerstoffatome der Kristallwasser
- Ligandenatome

Addition fehlender Wasserstoffatome anhand interner Koordinaten

- HIV-1 Protease & Wasser

2.

Relaxation der Kristallstrukturkoordinaten

Minimierung der Wasserstoffatome

- SD-Minimierung (500 Schritte)
- ABNR-Minimierung (100 Schritte)

kurze Relaxation mit Rückhaltekräften auf den Schweratomen

- SD-Minimierung (200 Schritte)
- ABNR-Minimierung (100 Schritte)

3.

Erstellung der Referenzstruktur

Zentrierung des Systems auf den Liganden

Addition einer Wasserhülle mit einem Radius von 25 Å

- Entfernung von überlappenden Wassermolekülen

Minimierung der Wasserstoffatome

- SD-Minimierung (500 Schritte)
- ABNR-Minimierung (100 Schritte)

kurze Relaxation mit Rückhaltekräften auf den Schweratomen

- SD-Minimierung (200 Schritte)
- ABNR-Minimierung (100 Schritte)

4.

Systemerwärmung & Equilibrierung

Initialisierung der restraints für Aminosäuren im Randbereich

- Abstand vom Zentrum 20 – 25 Å

Fixierung äußerer Aminosäuren

- Abstand vom Zentrum mehr als 25 Å

MD-Simulation zur Erwärmung innerhalb von 12 ps

- alle 0,4 ps Erhöhung der Temperatur um 10 K
- Erreichen der Zieltemperatur von 298 K nach 12 ps

Fortsetzung der MD-Simulation bis zur Einstellung eines dynamischen Gleichgewichts (mindestens 300 ps)

Abbildung 4.8: Schematische Darstellung des Standardverfahrens zur Initialisierung von MD-Simulationen aus Kristallstrukturdaten.

4.3 Bestimmung der Bindungsenthalpiendifferenz zwischen AG1254 und AG1224

Der erweiterte thermodynamische Zyklus (s. Kapitel 3.3.2) bildet die Grundlage zur Berechnung der relativen Bindungsenthalpiendifferenz $\Delta\Delta G$ zwischen den beiden Inhibitoren der HIV-1 Protease. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 4.9 die notwendigen Simulationen.

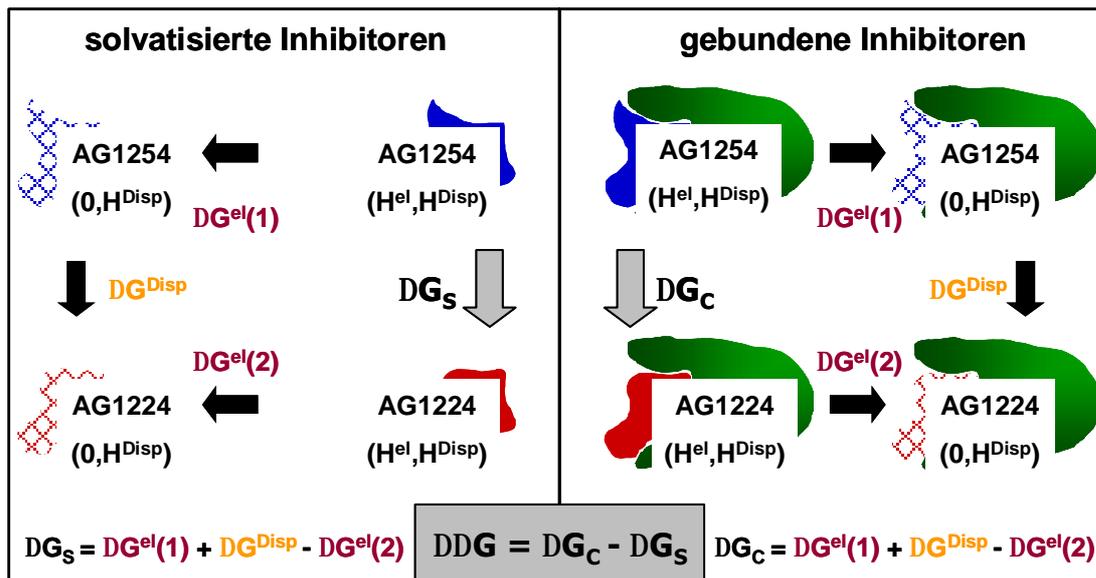


Abbildung 4.9: Schemata zur Berechnung der freien Bindungsenthalpiendifferenz zwischen AG1254 und AG1224.

Um $\Delta\Delta G$ aus ΔG_C und ΔG_S zu berechnen, wurden zunächst in vier QM/MM-MD-Simulationen die elektrostatischen Anteile des relativen Bindungsunterschieds (waagerechte schwarze Pfeile) zwischen AG1254 und AG1224 ermittelt (s. Kapitel 4.3.1). Die Bestimmung der dispersiven Anteile während der Transformation von AG1254 in AG1224 (senkrechte schwarze Pfeile) erfolgte in kraftfeldbasierten MD-Simulationen (s. Kapitel 4.3.2).

4.3.1 Ermittlung der elektrostatischen Anteile der Bindungsenthalpiendifferenz

Mit Hilfe der in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen FEP-Methode ist es möglich, den elektrostatischen Anteil der relativen Bindungsaffinitäten von AG1254 und AG1224 in QM/MM-MD-Simulationen zu berechnen. Entsprechend Abbildung 4.9 wurden beide Liganden in Protein- und Wasserumgebung untersucht.

Zur Bestimmung des elektrostatischen Anteils der freien Enthalpieänderung ΔG^{el} wurden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der QM-Region und der Umgebung schrittweise durch Veränderung der Energiefunktion

abgeschaltet. Die Skalierung der Energiefunktion erfolgte durch einen Kopplungsparameter λ .

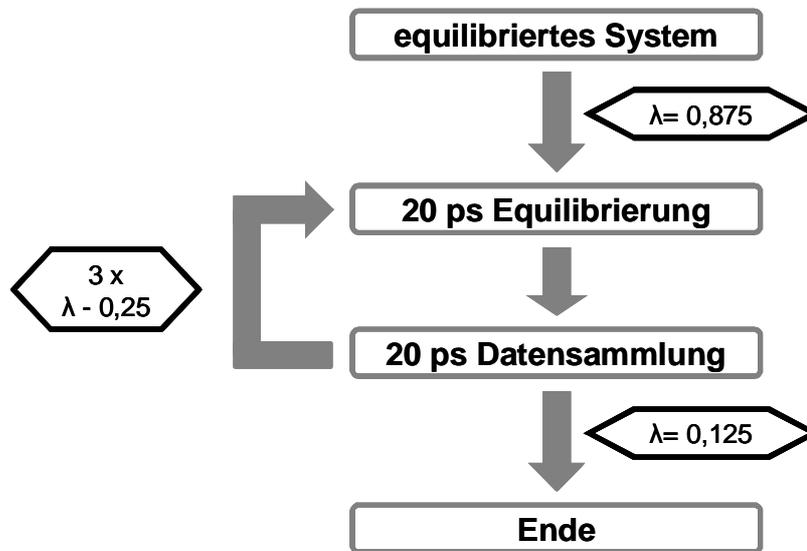


Abbildung 4.10: Schemata zur Durchführung der FEP-QM/MM-MD-Simulationen.

Abbildung 4.10 zeigt schematisch den Ablauf der Simulationen. Nach jeder λ -Änderung ist es aufgrund der geringfügig geänderten Energiefunktion notwendig, eine kurze Equilibrierung durchzuführen. Daher folgt nach jeder Veränderung von λ eine 20 ps lange MD-Simulation zur Einstellung eines neuen Gleichgewichtszustands, bevor in weiteren 20 ps die notwendigen Daten gesammelt werden. Die Anwendung des *double-wide-sampling*-Verfahrens (s. Kapitel 3.3.1.1) ermöglicht es, von jedem λ -Wert (0,875; 0,625; 0,375; 0,125) ausgehend direkt die Enthalpieunterschiede in und entgegen der Simulationsrichtung zu ermitteln ($\Delta I = 0,125$). Die Summe der Einzelterme ergibt ΔG^{el} .

Zuerst wurden die Simulationen von AG1254 und AG1224 im Komplex mit der HIV-1 Protease durchgeführt. Ausgehend von den equilibrierten Systemen wurde λ schrittweise verringert und die relativen Enthalpieänderungen berechnet. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse für jeden λ -Bereich zwischen Eins und Null dargestellt. Die Addition der Teilbeträge ergibt die elektrostatischen Anteile der relativen Bindungsaffinitäten.

Tabelle 4.2: ΔG^{el} (kcal/mol) der Inhibitoren AG1254 und AG1224 im Komplex mit der HIV-1 Protease

λ -Bereich	AG1254	AG1224
1,000 - 0,875	7,86	7,54
0,875 - 0,750	6,98	6,64
0,750 - 0,625	6,19	5,74
0,625 - 0,500	5,35	4,84
0,500 - 0,375	4,09	3,98
0,375 - 0,250	3,19	3,10
0,250 - 0,125	2,44	1,45
0,125 - 0,000	-0,26	0,52
ΔG^{el} :	35,84	33,81

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen eine bedeutende Rolle bei der Bindung dieser Liganden spielen und ihre Deaktivierung die Bindungsaffinität deutlich verringert, was an den positiven Werten ΔG^{el} zu erkennen ist. AG1254 bindet aus elektrostatischer Sicht um 2 kcal/mol besser im Enzym als AG1224. Die Ursache liegt in der sehr stabilen Wasserstoffbrückenbindung des AG1254 zwischen dem Wasserstoffatom der phenolischen Hydroxylgruppe und der Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp30. AG1224 besitzt an dieser Position eine Nitrogruppe. Die erhöhte Elektronendichte bewirkt den ungünstigen Effekt auf die Ligandenbindung.

In zwei weiteren QM/MM-MD-Simulationen wurde mittels der FEP-Methode die Solvation der beiden Strukturen analysiert. Zu diesem Zweck wurden AG1254 und AG1224 im Zentrum einer Sphäre aus 1966 Wassermolekülen untersucht. Ausgangspunkt waren ebenfalls die equilibrierten Systeme. Die Parametereinstellungen der Simulationen entsprachen denen im Komplex mit dem Enzym, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

Tabelle 4.3: ΔG^{el} (kcal/mol) der Inhibitoren AG1254 und AG1224 in wässriger Umgebung

λ -Bereich	AG1254	AG1224
1,000 - 0,875	4,69	5,11
0,875 - 0,750	4,00	4,37
0,750 - 0,625	3,29	3,34
0,625 - 0,500	2,31	2,55
0,500 - 0,375	1,97	1,54
0,375 - 0,250	1,20	0,86
0,250 - 0,125	-0,21	0,21
0,125 - 0,000	-1,04	-0,62
ΔG^{el} :	16,21	17,36

Tabelle 4.7 zeigt die Ergebnisse für beide Inhibitoren. Es fällt auf, dass in wässriger Umgebung die elektrostatischen Anteile der Solvatationsenthalpien in etwa nur halb so groß sind wie die Effekte im aktiven Zentrum. Des Weiteren profitiert AG1224 um 1,2 kcal/mol mehr von der Solvatisierung als AG1254 im Gegensatz zur stärkeren Bindung von AG1254 im Enzym.

4.3.2 Bestimmung der dispersiven Anteile der Bindungsenthalpiedifferenz

Nach der Ermittlung der elektrostatischen Anteile des relativen Bindungsaffinitätsunterschieds zwischen AG1254 und AG1224 fehlen nun noch die eigentlichen Ligandentransformationen im aktiven Zentrum sowie in wässriger Umgebung entlang der experimentell nicht zu untersuchenden Routen (vgl. senkrechte schwarze Pfeile in Abbildung 4.9). Derartige - auch als Mutationen bezeichnete - Strukturveränderungen sind mit den zur Verfügung stehenden quantenmechanischen Verfahren nicht durchführbar. Daher wurde die kraftfeldbasierte BLOCK-Methode (Kapitel 3.3.2.2) benutzt, um die Transformationen von AG1254 in AG1224 zu simulieren. Um dabei nur die Dispersion zwischen den Liganden und der Umgebung zu berücksichtigen, wurden die Partialladungen der Inhibitoratome auf Null gesetzt.

Zur Durchführung der MD-Simulationen wurden zwei Systeme erstellt, in denen entsprechend der dualen Topologie der Inhibitor AG1254 und zusätzlich die

Nitrogruppe von AG1224 vorliegen, die den einzigen Unterschied zu AG1254 ausmacht. Abbildung 4.11 zeigt AG1254/AG1224 im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Aminosäuren Asp30 und Ile47 liegen in direkter Nachbarschaft zur sich verändernden funktionellen Gruppe.

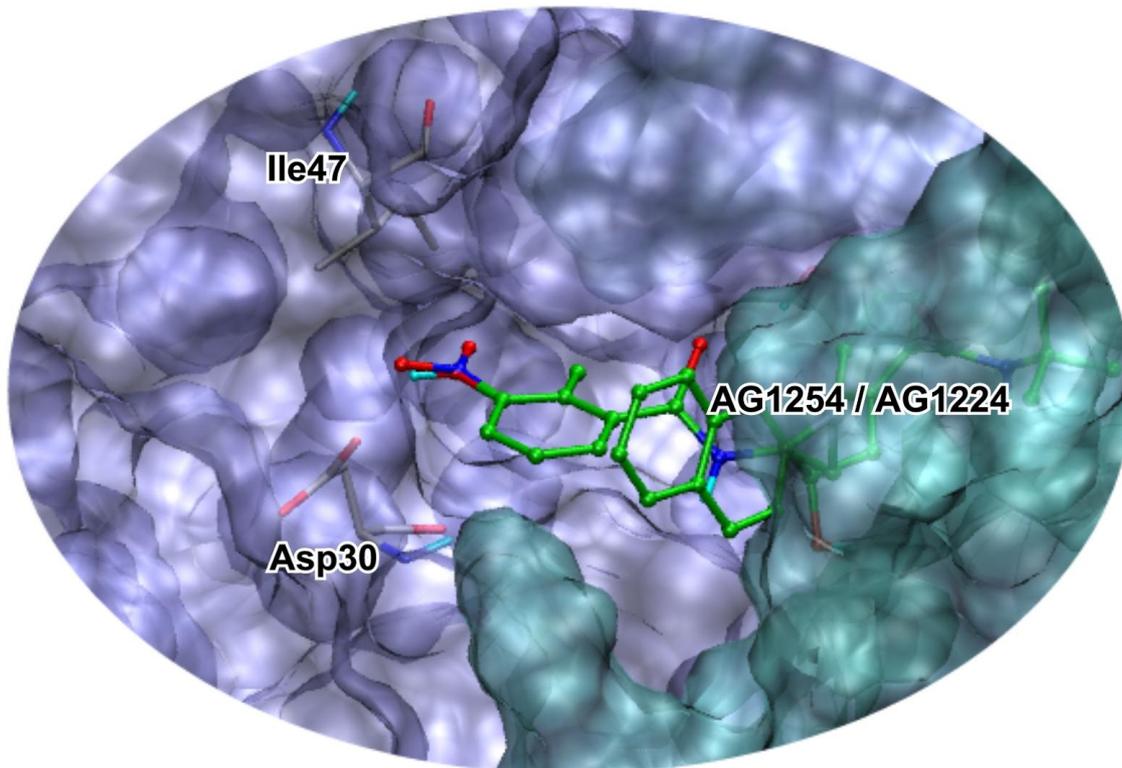


Abbildung 4.11: Blick ins aktive Zentrum der HIV-1 Protease mit gebundenem AG1254/AG1224. Das Protein ist als transparente Oberfläche (gefärbt nach Monomeren) dargestellt. Asp30 und Ile47 sind zur Hydroxyl- bzw. Nitrogruppe direkt benachbart.

Wie bereits beschrieben, bestehen zwischen Ligand und Protein keine elektrostatischen Wechselwirkungen. Daher kann die Transformation formal auch als das Anwachsen eines Wasserstoffatoms zum Sauerstoff und die Entstehung eines weiteren Sauerstoffatoms betrachtet werden. Die Veränderung eines Sauerstoff zum Stickstoff spielt aufgrund der geringen atomaren Unterschiede hier eine eher untergeordnete Rolle. Die größte Schwierigkeit besteht in der Wahl der λ -Werte, an denen die Simulationen durchgeführt werden. Zur Transformation von derartigen Strukturunterschieden hat sich die Thermodynamische Integration (s. Kapitel 3.3.1.2) etabliert [126]-[128]. Aus diesem Grund wurde diese Methode zur Berechnung der Enthalpieunterschiede verwendet.

Ausgangspunkte der Simulationen waren die equilibrierten Systeme mit AG1254/AG1224 in enzymatischer und wässriger Umgebung. Die theoretische Entstehung und Löschung von Atomen an den Endpunkten von λ erfordert es,

dass diese Bereiche intensiver evaluiert werden. Daher wurde die Schrittgröße entsprechend variiert und die MD-Simulationen für die λ -Werte 0,02; 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 0,95; 0,98 durchgeführt. Die Systeme wurden an jedem λ -Punkt für 50 ps equilibriert. In den darauf folgenden 30 ps erfolgte die Datensammlung durch Aufzeichnung der Koordinaten alle 5 fs, wodurch jeweils 6000 Koordinatensätze für die Auswertung zur Verfügung standen. Diese große Anzahl von Strukturen ist notwendig, um dem in den Simulationen verfügbaren Konformationsraum gerecht zu werden und thermodynamische Durchschnittswerte berechnen zu können. Die Ermittlung der Energiedifferenzen zwischen den sich unterscheidenden Segmenten (Hydroxyl- bzw. Nitrogruppe) wurde im Anschluss durchgeführt und ΔG mit Hilfe von Gleichung (3.20) bestimmt.

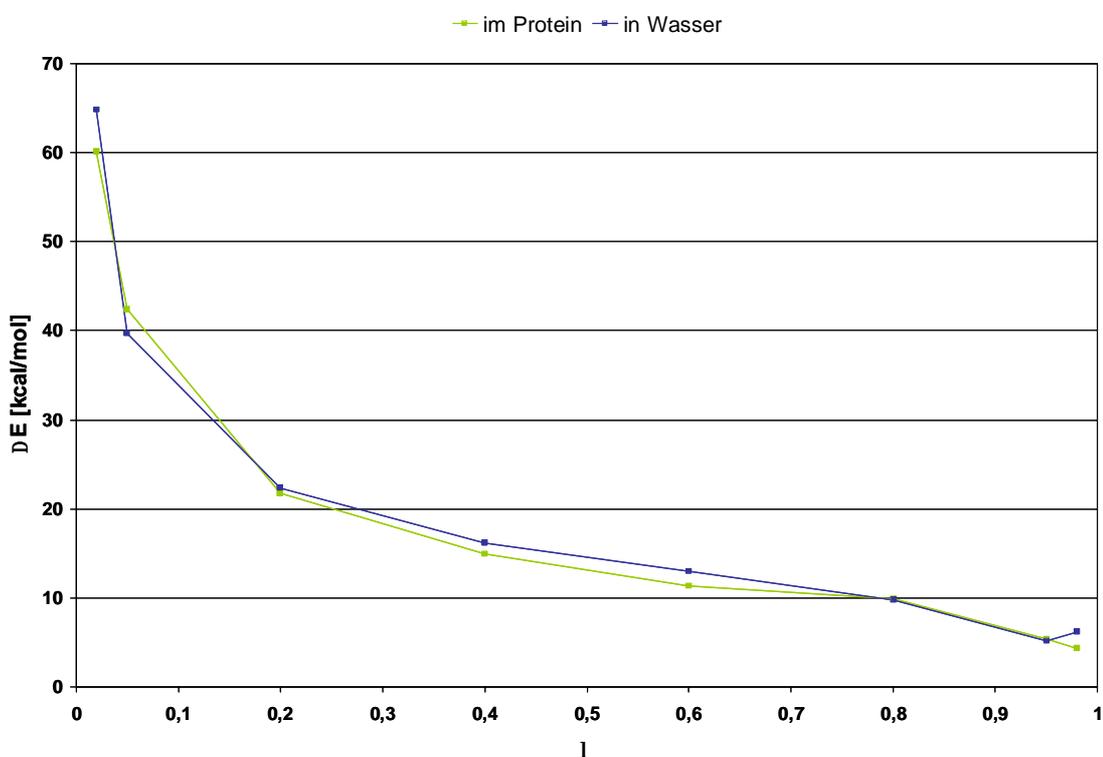


Abbildung 4.12: Energiedifferenzen im Verlauf der Transformation von AG1254 in AG1224.

Die Abbildung 4.12 zeigt den Verlauf der Energiedifferenzen ΔE für die Simulationen im Protein und in wässriger Umgebung. Es ist zu erkennen, dass die Energieunterschiede zu Beginn der Transformationen ($\lambda \approx 0$) sehr groß sind (ca. 60 kcal/mol). Dies ist auf die gerade beginnende Entstehung eines zusätzlichen Sauerstoffatoms der Nitrogruppe zurückzuführen. Wie schon erwähnt, stellt dies bei deaktivierter Elektrostatik den entscheidenden Unterschied zwischen den beiden untersuchten Liganden dar. Im weiteren Verlauf der Transformation verringert sich der Energieunterschied zwischen

Hydroxyl- und Nitrogruppe sowohl im Protein als auch in Wasser deutlich und fällt schließlich unter 10 kcal/mol.

Die Änderung der freien Enthalpie entspricht der Fläche unter der jeweiligen Kurve. Zur Integration wurden die Flächen der einzelnen Abschnitte mit Hilfe der Sehnentrapezformel berechnet:

$$\Delta G_I^{Disp} = (\Delta E_I + \Delta E_{I-\Delta I}) \left(\frac{\Delta I}{2} \right) \quad (4.3)$$

ΔG_I^{Disp} : Teilbetrag der relativen freien Enthalpie

ΔE : Energiedifferenz der Segmente

In Tabelle 4.4 sind die sich ergebenden Beträge der Transformation von AG1254 in AG1224 für beide Simulationen angegeben. Die Energiedifferenzen der λ -Endpunkte Null und Eins wurden durch lineare Extrapolation ermittelt.

Tabelle 4.4: ΔG^{Disp} (kcal/mol) der Transformationen von AG1254 in AG1224 in Protein- und Wasserumgebung

λ -Bereich	HIV-1 Protease	in Wasser
0,00 - 0,02	0,72	0,82
0,02 - 0,05	1,54	1,57
0,05 - 0,20	4,80	4,65
0,20 - 0,40	3,66	3,85
0,40 - 0,60	2,62	2,92
0,60 - 0,80	2,12	2,28
0,80 - 0,95	1,14	1,12
0,95 - 0,98	0,14	0,17
0,98 - 1,00	0,04	0,07
ΔG^{Disp} :	16,78	17,44

Die beiden ΔG^{Disp} unterscheiden sich nur geringfügig, da der Aufwand der Transformationen im Enzym und in Wasser vergleichbar ist, wenn keine elektrostatischen Unterschiede der Hydroxyl- und der Nitrogruppe bestehen.

Die Höhe des Enthalpieunterschieds wird hauptsächlich durch die Entstehung eines neuen Sauerstoffatoms bestimmt.

4.3.3 Berechnung der relativen Bindungsenthalpie

Zur Berechnung der Bindungsenthalpiedifferenz $\Delta\Delta G$ zwischen AG1254 und AG1224 wurden die Ergebnisse der MD-Simulationen zur Ermittlung elektrostatischer und dispersiver Anteile herangezogen (s. Abbildung 4.9). Analog zum thermodynamischen Zyklus ergeben sich aus den einzelnen Werten relative Enthalpieänderungen im Enzym ΔG_C und in wässriger Umgebung ΔG_S .

Tabelle 4.5: Berechnung von ΔG_C und ΔG_S (kcal/mol)

	im Enzym	in Wasser
ΔG_{AG1254}^{el}	35,84	16,21
ΔG_{AG1224}^{el}	33,81	17,36
$\Delta G_{AG1254 \rightarrow AG1224}^{Disp}$	16,78	17,44
	ΔG_C : 18,81	ΔG_S : 16,29

Die zu Grunde liegenden Formeln sind dem thermodynamischen Zyklus in Abbildung 4.9 zu entnehmen.

Die in Tabelle 4.5 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die unphysikalische Mutation von AG1254 in AG1224 in der HIV-1 Protease die freie Enthalpie um ca. 18,8 kcal/mol erhöht. Bei der gleichen Transformation in Wasser ändert sich die freie Enthalpie nur um etwa 16,3 kcal/mol. Die Differenz der beiden Werte entspricht dem Bindungsunterschied $\Delta\Delta G$ der Inhibitoren in der HIV-1 Protease.

Tabelle 4.6: Vergleich von experimenteller und berechneter Bindungsenthalpiedifferenz (kcal/mol)

	Experiment	Berechnung
$\Delta\Delta G$	3,1	2,5

Der experimentelle Wert wurde mittels der Gleichung (3.14) aus den Inhibitionskonstanten bestimmt.

Die Übereinstimmung von Experiment und theoretischer Bestimmung (s. Tabelle 4.6) bestätigt, dass das angewandte Verfahren aus QM/MM-FEP und MM-TI gut dazu geeignet ist, die relative Bindungsenthalpiendifferenz der beiden Liganden zu bestimmen. Die theoretischen Untersuchungen zeigen, dass AG1224 um 2,5 kcal/mol schlechter in der HIV-1 Protease bindet als AG1254. Dieser energetische Unterschied beruht hauptsächlich auf zwei Effekten. Zum einen wird AG1254 durch elektrostatische Wechselwirkungen stärker als AG1224 im Enzym gebunden ($\Delta G^{el} = 35,8$ versus 33,8 kcal/mol). Zum anderen profitiert AG1254 anscheinend weniger als AG1224 von der Solvatisierung ($\Delta G^{el} = 16,2$ versus 17,4 kcal/mol). Die günstigeren Effekte von AG1254 in der Protease lassen sich durch eine stabile Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxylgruppe zu Asp30 erklären. Die Nitrogruppe von AG1224 besitzt hingegen keine Möglichkeit zur Ausbildung derartiger Interaktionen und sie verursacht eine negative Beeinflussung aufgrund der erhöhten Elektronendichte. Dafür wird die Nitrogruppe besser solvatisiert, da genügend Wasserstoffbrückendonatoren für günstige Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Die Transformationen von AG1254 in AG1224 im Protein (16,8 kcal/mol) und in Wasser (17,4 kcal/mol) unterscheiden sich nur geringfügig. Der Aufwand der Umwandlung einer Hydroxylgruppe in eine Nitrogruppe ist also in beiden Umgebungen nahezu identisch. Dies ist nachvollziehbar, wenn man berücksichtigt, dass beide Liganden nur Dispersionswechselwirkungen mit der Umgebung besitzen. Die getrennte Untersuchung der elektrostatischen und dispersiven Einflüsse ermöglicht folglich eine Identifizierung einzelner Einflussfaktoren.

Eine genauere Untersuchung der Ursachen für das unterschiedliche Bindungsverhalten ist an dieser Stelle nicht vorgesehen, da sich beide Inhibitoren insgesamt strukturell sehr ähnlich sind. In den weiteren Kapiteln werden deutlich unterschiedlichere Liganden im aktiven Zentrum untersucht und in diesem Zusammenhang Wechselwirkungsenergien und Stabilisierungseffekte einzelner Aminosäuren analysiert. Derartige Betrachtungen sind mit den hier angewendeten Methoden (FEP und TI) bisher nicht möglich.

4.4 Untersuchung von Polarisierungseffekten der HIV-1 Protease

Im Kapitel 4.3 wurde mit der FEP-Methode ein sehr rechenintensives Verfahren angewandt, um Bindungsaffinitätsunterschiede theoretisch zu bestimmen. Obwohl mit der Methode sehr gute Ergebnisse zu erzielen sind, ist sie nur dazu geeignet, relativ geringe strukturelle Unterschiede zwischen den Liganden zu untersuchen. Beim Entwurf und der Verbesserung von neuen Substanzen mit guten Bindungseigenschaften sind häufig Strukturen zu untersuchen, die deutlich größere Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grund wurde eine weitere Methode angewendet, die zur quantitativen Bestimmung von Enzym-Ligand-Interaktionen geeignet ist (s. Kapitel 3.4). Mit Hilfe dieser Informationen sollten Unterschiede im Bindungsverhalten der ausgewählten Inhibitoren charakterisiert und im Anschluss Verbesserungsmöglichkeiten untersucht werden. Die Anwendung der QM/MM-Methode (s. Kapitel 3.2.3) ermöglicht es, sowohl detaillierte elektrostatische als auch hydrophobe Wechselwirkungen im Verlauf von MD-Simulationen zu ermitteln. Die Methode wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung der Solvation kleinerer Moleküle verwendet [119][129][130]. Im Kontext dieser Arbeit eignet sie sich insbesondere zur Analyse von Polarisierungseffekten der HIV-1 Protease.

Zu Beginn wurden drei hoch affine Inhibitoren (s. Tabelle 4.7) der HIV-1 Protease ausgewählt, um die Wechselwirkungsenergien zu untersuchen. Der bereits therapeutisch genutzte Inhibitor Nelfinavir wurde ausgesucht, da er im aktiven Zentrum ähnlich zum natürlichen Substrat bindet. So werden hier einige Wechselwirkungen mit dem Protein durch ein zusätzliches Wassermolekül vermittelt (s. Kapitel 1.4.2 und Abbildung 1.13). Dieser Bindungsmodus stellt eine Gemeinsamkeit aller bisher zur Behandlung zugelassenen PI dar. Ein Problem dieser Substanzen ist, dass sie auch eine gewisse Affinität zu anderen körpereigenen Aspartylproteasen wie z.B. dem Pepsin besitzen, wodurch es oft zu Nebenwirkungen kommt. Das aktive Zentrum von Pepsin ist jedoch kleiner und es existiert kein Wassermolekül, das ähnliche Wechselwirkungen wie bei der HIV-1 Protease vermittelt. Aus diesem Grund liegt ein Schwerpunkt des Wirkstoffdesigns auf der Suche nach Strukturen, die bei der Bindung am Enzym das beschriebene Wassermolekül aus dem aktiven Zentrum verdrängen. Man erhofft sich sowohl eine erhöhte Bindungsaffinität durch den günstigen entropischen Effekt der Wasserverdrängung als auch eine Verringerung der Nebenwirkungen am Pepsin, da die Substanzen zu groß sind, um dort zu binden. Die zwei modernen nicht-peptidischen Strukturen Mozenavir und

Tipranavir, die eine Wasserverdrängung bei der HIV-1 Protease bewirken, wurden daher neben dem Nelfinavir für die Untersuchung der Polarisierungseffekte ausgewählt. Sie befinden sich zurzeit in klinischen Studien.

Tabelle 4.7: Strukturen der ausgewählten HIV-1 PR-Inhibitoren

Name	K_i [nM]
Nelfinavir	2,0
Mozenavir	0,34
Tipranavir	0,008

Die Inhibitionskonstanten (K_i) wurden folgenden Veröffentlichungen entnommen: [58][131][132] Die Bezifferung dient der Identifizierung von Atomen bei der Beschreibung von Moleküleigenschaften.

4.4.1 Durchführung der MD-Simulationen zur Untersuchung der Bindungseigenschaften

Die durchschnittlichen Wechselwirkungsenergien und ihre einzelnen Komponenten wurden für Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir im Verlauf von MD-Simulationen unter Anwendung eines QM/MM-Potenzials ermittelt. Als Ausgangsstrukturen wurden die Kristallstrukturen der jeweiligen Liganden im Komplex mit der HIV-1 Protease ausgewählt (PDB-Code mit Auflösung: 1OHR

mit 2,1 Å [58], 1DMP mit 2,0 Å [133], 1D4Y mit 1,97 Å [132]). Die Einteilung in QM- und MM-Region erfolgte so, dass die Inhibitoren jeweils vollständig quantenmechanisch behandelt wurden, während das Protein sowie die hinzugefügte Wasserhülle die MM-Region bildeten. Die katalytische Dyade lag in allen Simulationen im monoprotinierten Zustand vor. Jedes System wurde analog zu dem in den Kapiteln 4.2.3 bis 4.2.5 beschriebenen Standardverfahren aufbereitet. Ein equilibrierter Zustand stellte sich bei den MD-Simulationen von Nelfinavir und Tipranavir nach etwa 250 ps, bei Mozenavir nach ca. 400 ps ein (s. Abbildung 4.13).

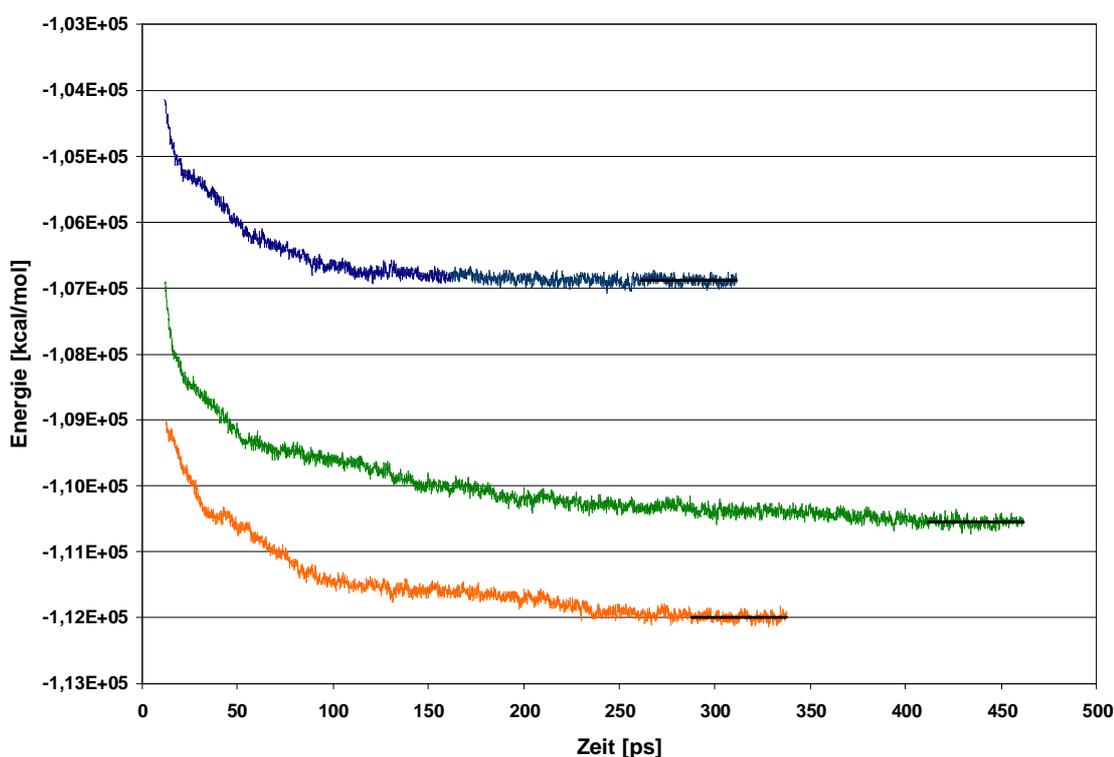


Abbildung 4.13: Verlauf der potenziellen Energie während der Equilibrierungsphase der QM/MM-MD-Simulationen von Nelfinavir (orange), Mozenavir (grün) und Tipranavir (blau). Für die letzten 50 ps ist jeweils zusätzlich der Mittelwert dargestellt.

Ausgehend vom dynamischen Gleichgewichtszustand wurden für jeden Liganden die Daten zur Untersuchung des Einflusses einzelner Aminosäuren in 25 ps langen MD-Simulationen gesammelt (s. Kapitel 4.4.2.2) und im Anschluss in weiteren 10 ps die detaillierten Wechselwirkungsenergien (s. Kapitel 4.4.2.1) sowie die Partialladungen der QM-Atome (s. Kapitel 4.4.2.3) ermittelt.

4.4.2 Ergebnisse der MD-Simulationen

4.4.2.1 Analyse der Wechselwirkungsenergien

Die Wechselwirkungsenergien zwischen der HIV-1 Protease und den Liganden sind in Tabelle 4.8 angegeben. Sie repräsentieren Mittelwerte, die mit Hilfe der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode aus MD-Simulationen über 10 ps ermittelt wurden. Die kurze Simulationsdauer ist für einen Vergleich ausreichend, da die Interaktionen in equilibrierten Systemen bereits konvergiert sind und auch bei längeren Simulationen keine größeren Schwankungen auftreten.

Tabelle 4.8: Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) von Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir mit der HIV-1 PR aus QM/MM-MD-Simulationen

	Nelfinavir	Mozenavir	Tipranavir
ΔE_{Disp}	-62,3 ± 0,8	-57,8 ± 0,7	-67,1 ± 1,5
ΔE_{el}	-68,2 ± 0,6	-39,6 ± 0,7	-62,6 ± 1,1
ΔE_{perm}	-46,3 ± 0,5	-23,8 ± 0,7	-39,3 ± 1,1
ΔE_{pol}	-21,9 ± 0,2	-15,9 ± 0,2	-23,3 ± 0,1
ΔE_{stab}	-43,6 ± 0,4	-31,6 ± 0,3	-46,6 ± 0,3
ΔE_{dist}	21,7 ± 0,2	15,7 ± 0,1	23,3 ± 0,1

Die Tabelle 4.8 zeigt, dass sich die dispersiven Wechselwirkungen ΔE_{Disp} der drei Inhibitoren mit dem Enzym nicht erheblich unterscheiden. Hingegen sind die elektrostatischen Wechselwirkungen ΔE_{el} von Nelfinavir und Tipranavir im Komplex mit der HIV-1 Protease deutlich höher als von Mozenavir. Dieser Unterschied lässt sich durch die Struktur des Liganden erklären, da die aromatischen Ringsysteme eher hydrophobe Interaktionen begünstigen.

Die wichtigste Erkenntnis aus den Ergebnissen in Tabelle 4.8 besteht darin, dass Polarisierungseffekte ΔE_{pol} einen bedeutenden Anteil (16,3 bis 18,0%) an den Gesamtwechselwirkungsenergien zwischen Enzym und Ligand ausmachen. Im Vergleich mit früheren Untersuchungen der Polarisierungseffekte von Wasser und der Dihydrofolat-Reduktase, die vergleichbare Resultate (10 bis 30%) ergaben, zeigt sich erneut ihre Bedeutung [119][134]. Daher ist es bei der Untersuchung Protein-Ligand-Wechselwirkungen als auch bei der

Vorhersage von Bindungsaffinitäten empfehlenswert, die elektrostatische Polarisation explizit zu berücksichtigen. Die Verwendung von nicht-polarisierbaren Kraftfeldern zur Beschreibung von Liganden würde zu unrealistischen Interaktionsenergien führen.

Ein direkter Vergleich der Wechselwirkungsenergien mit den in Tabelle 4.7 angegebenen experimentellen Inhibitionskonstanten ist nicht möglich, da diese in Bezug zur Änderung der freien Enthalpie während des Bindungsprozesses stehen und auch Entropieunterschiede und Solvatationseffekte enthalten. Die in Tabelle 4.8 angegebenen Werte beziehen sich hingegen auf die energetischen Veränderungen vom Vakuum zum Komplex mit dem Enzym und sind daher allein nicht aussagekräftig. Allerdings kann eine Korrelation der Wechselwirkungsenergieunterschiede zwischen den jeweiligen Simulationen im Enzym und in wässriger Umgebung untersucht werden. Zu diesem Zweck sind weitere QM/MM-MD-Simulationen der drei Inhibitoren in wässriger Umgebung notwendig, die in Kapitel 4.6 vorgestellt werden.

Es ist weiterhin interessant, dass die Absolutwerte der Verformungsenergien ΔE_{dist} halb so groß sind wie die Absolutwerte der Polarisationsstabilisierungsenergien ΔE_{stab} . Dieses Ergebnis stimmt mit der *Linear Response Theory* überein und stellt eine Bestätigung der angewandten Methode zur Ermittlung der Wechselwirkungskomponenten dar [120].

4.4.2.2 Analyse des Einflusses einzelner Aminosäuren auf die Ligandenbindung

Eine Aminosäuren-Dekompositionsanalyse wurde zur Untersuchung wichtiger Unterschiede bei der Stabilisierung der Enzym-Inhibitor-Komplexe von Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir durch individuelle Aminosäuren durchgeführt. Dazu erfolgte die Berechnung der durchschnittlichen Beiträge jeder Aminosäure zu den Interaktionen mit dem Liganden aus 50 Koordinatensätzen, die in einer MD-Simulation über 25 ps im Intervall von 0,5 ps gewonnen wurden. Ihre Bestimmung wurde durch die Entfernung¹ des entsprechenden Aminosäurerestes durchgeführt, gefolgt von der Neuberechnung der QM/MM-Energie des restlichen Systems. Die Differenzen aus ursprünglichen und neu berechneten Energien sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Eine positive Energieänderung ergibt sich aus einer Verringerung

¹ Alternativ könnten auch sämtliche Parameter der zu untersuchenden Aminosäure auf Null gesetzt werden, um ihren Beitrag zur QM/MM-Energie zu entfernen.

der Wechselwirkungsenergie aufgrund der fehlenden Interaktionen mit der jeweiligen Aminosäure, das heißt, der jeweilige Rest trägt zur Stabilisierung der Ligandenbindung bei.

Aminosäuren-Dekompositionsanalyse

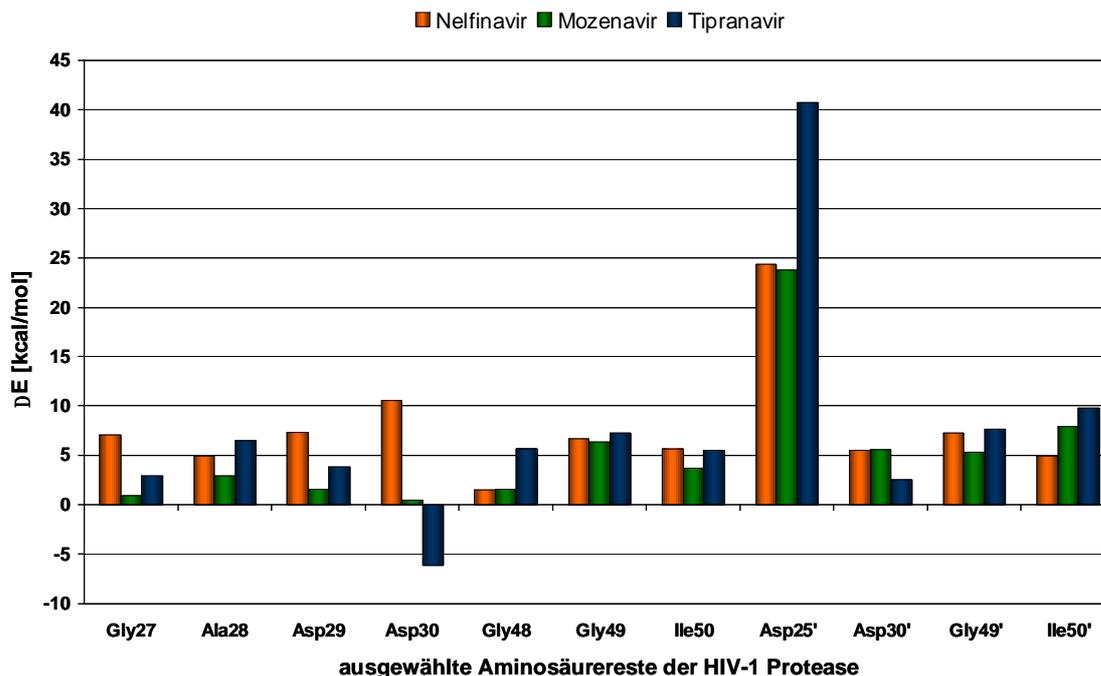


Abbildung 4.14: Beiträge individueller Aminosäuren zur Bindung der Inhibitoren. Positive und negative Energieänderungen zeigen den stabilisierenden oder destabilisierenden Effekt der jeweils angegebenen Aminosäure. Es wurden nur Aminosäurereste mit einem Einfluss von mindestens 5 kcal/mol auf eine der Substanzen ausgewählt.

Die größte Bedeutung für die Liganden besitzt das deprotonierte Asp25'. Es bildet eine stabile Wasserstoffbrücke mit den Hydroxylgruppen der Inhibitoren. Bekanntermaßen ist diese Wechselwirkung ein Schlüsselement aller bisherigen HIV-1 PR-Inhibitoren, um ähnliche Wechselwirkungen zum natürlichen Substrat bzw. einem katalytischen Wassermolekül nachzuahmen (s. Kapitel 1.4.3). Die Ergebnisse zeigen, dass die 4-Hydroxy-Dihydropyron-Grundstruktur des Tipranavir besonders geeignet ist, diese Wasserstoffbrückenbindung auszubilden. Die Wechselwirkungen sind um mehr als 60% (40,7 kcal/mol) stärker als von Nelfinavir (24,3 kcal/mol) und Mozenavir (23,8 kcal/mol), die jeweils nur aliphatische Hydroxylgruppen besitzen. Diese Beobachtung konnte durch eine zusätzliche quantitative Analyse der atomaren Polarisierung der Liganden bestätigt werden (s. Kapitel 4.4.2.3). Interessanterweise leistet das protonierte Asp25 keinen bedeutenden Beitrag zur Inhibitorbindung, jedoch stabilisiert es Asp25' durch eine Wasserstoffbrückenbindung.

Das O_1 -Atom von Mozenavir sowie das O_2 -Atom von Tipranavir (Atomnummerierung s. Tabelle 4.7) bilden jeweils direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amidgruppen des Proteinrückgrates von Ile50 und Ile50' aus. Im Gegensatz dazu werden beim Nelfinavir die Wechselwirkungen zwischen den beiden Aminosäuren und den Atomen O_2 und O_3 über das bereits erwähnte Wassermolekül vermittelt. Die Höhe des stabilisierenden Effekts ist jedoch für Nelfinavir und Mozenavir vergleichbar, aber beim Tipranavir deutlich höher. Ebenso leisten die Aminosäuren Asp28, Gly49 und Gly49' einen jeweils ähnlichen Beitrag zur Bindung im Enzym.

Besonders auffällig sind die gegensätzlichen Effekte von Asp30 auf Nelfinavir und Tipranavir. Auf der einen Seite besitzt Asp30 einen starken stabilisierenden Effekt auf Nelfinavir, schwächt andererseits aber die Bindung des Tipranavir. Die Analyse der MD-Simulationen zeigt, dass Asp30 eine sehr stabile Wasserstoffbrückenbindung zum H_4 -Atom (phenolische Hydroxylgruppe) von Nelfinavir ausbildet. Beim Tipranavir liegen die Sauerstoffatome der Sulfonamidstruktur in unmittelbarer Nähe zu Asp30, wodurch es aufgrund der hohen negativen Ladungsdichte zur Abstoßung kommt, die eine andere Orientierung der Seitenkette von Asp30 im Vergleich zum Nelfinavir bewirkt (s. Abbildung 4.15).

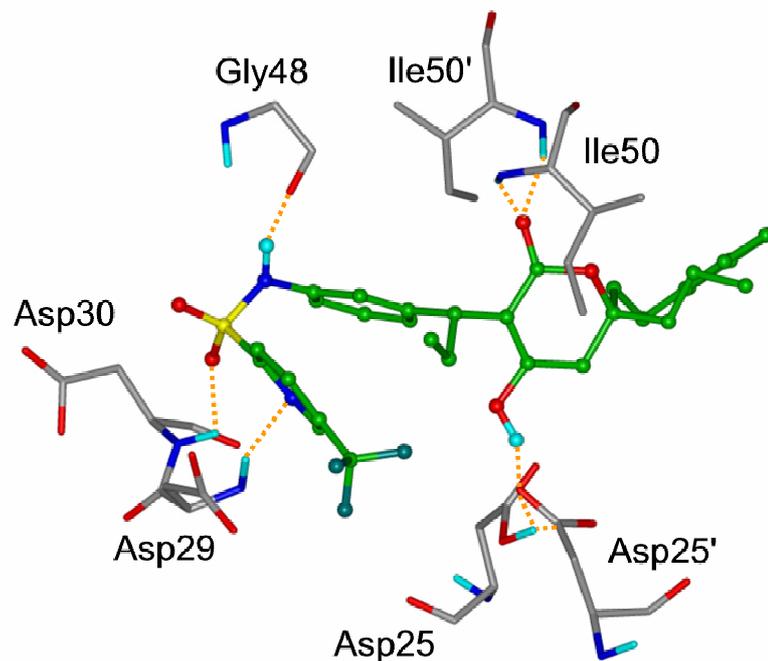


Abbildung 4.15: Tipranavir im aktiven Zentrum der HIV-1 PR.

4.4.2.3 Analyse und Visualisierung der Polarisierung auf atomarer Ebene

In weiteren Untersuchungen wurden die Polarisierungseffekte anhand der Partialladungen der Ligandenatome bestimmt. Dazu wurden die Partialladungen der QM-Atome mit Hilfe einer Mulliken-Populationsanalyse [135] sowohl im Vakuum als auch im Komplex mit der HIV-1 Protease im Verlauf der MD-Simulationen ermittelt.

Es ist anzumerken, dass es sicherlich geeignetere Methoden zur Ladungsberechnung von quantenmechanisch behandelten Atomen gibt. Das Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen bestand jedoch darin, die relativen Veränderungen der Atomladungen aufgrund des Bindungsprozesses zu ermitteln. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch mit der Mulliken-Populationsanalyse aussagekräftige Ergebnisse erhalten werden können [119][134][136].

Um die Polarisierungseffekte des Enzyms auch bildlich darzustellen, wurden zusätzlich die Elektronendichtedifferenzen ausgewählter Strukturen bestimmt. Die durchgeführten Berechnungen erfolgten anhand der unterschiedlichen Elektronendichteverteilungen der Inhibitoren im Protein und Vakuum analog zu früheren Untersuchungen an anderen biologischen Systemen [134][136]. Die Unterschiede der Elektronendichte im Vakuum und im Enzym beruhen auf elektrostatischen Wechselwirkungen der Liganden mit dem Protein. Folglich ergibt die Visualisierung der Elektronendichtedifferenzen Bereiche, in denen es zur Elektronenbewegung durch die Polarisierung gekommen ist.

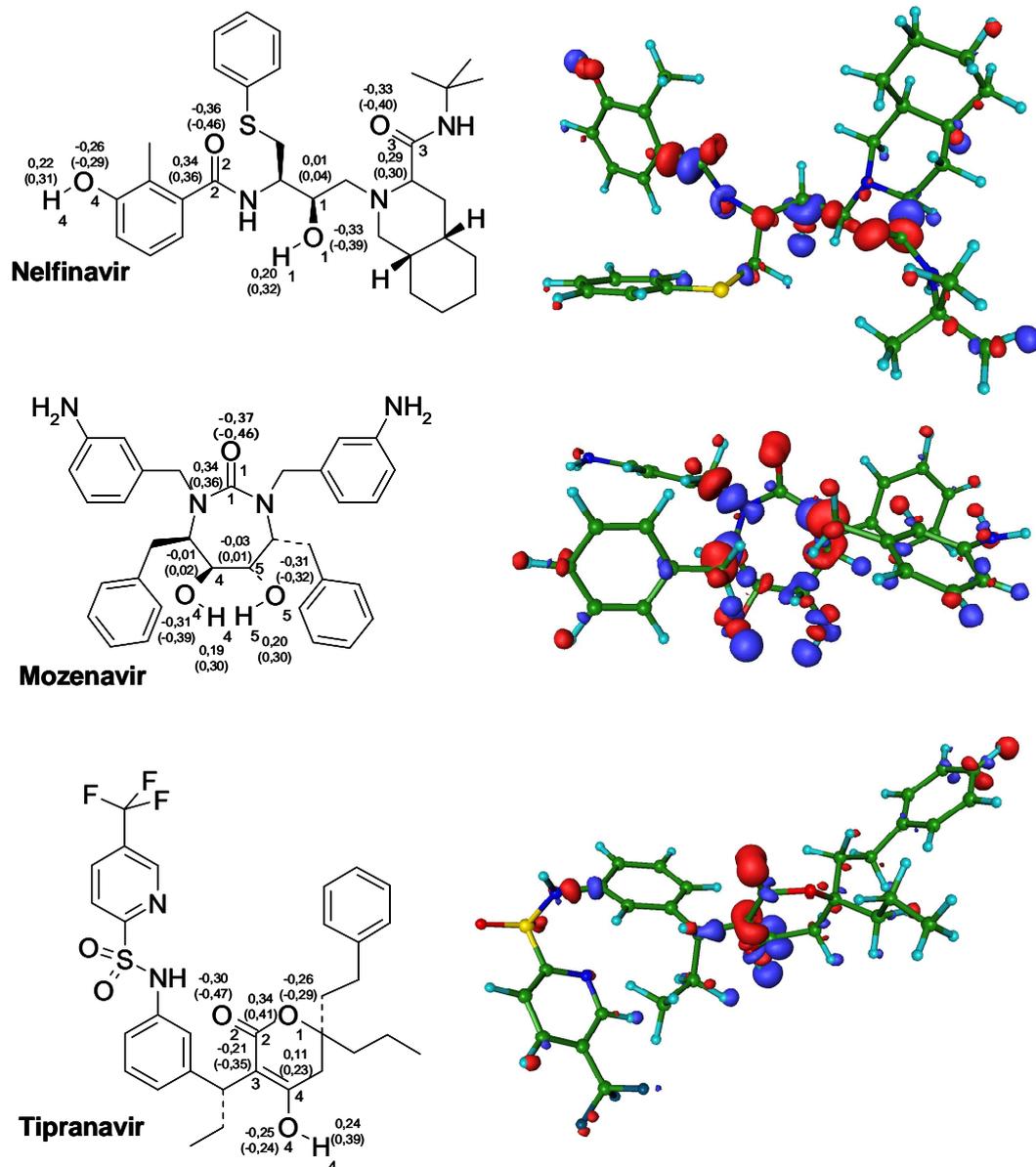


Abbildung 4.16: Atomare Polarisierung von Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir. Links: Durchschnittliche Partiaalladungen im Vakuum und im Enzym (in Klammern). Die Werte sind in Elementarladungen angegeben, deren Standardabweichungen von 0,01 bis 0,03 variiert. Rechts: Grafische Darstellung der Elektronendichtedifferenzen. Blaue Bereiche kennzeichnen eine Verringerung der Elektronendichte, eine Zunahme an Elektronendichte liegt in den roten Regionen vor. Es wurde ein identischer Konturlevel benutzt.

Abbildung 4.16 zeigt im linken Teil die Partiaalladungen von Atomen, die bedeutende elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Protein ausbilden. Die Polarisierung ergibt sich als Differenz der Atomladungen im Enzym (in Klammern) und im Vakuum. Sie entspricht der Änderung der Ladungsverteilung im Enzym, die durch den polarisierenden Effekt des aktiven Zentrums ausgelöst wurde. Im rechten Teil sind die Elektronendichtedifferenzen repräsentativer

Inhibitor-konformationen dargestellt. Rote Bereiche kennzeichnen die Zunahme der Elektronendichte, verursacht durch die Umgebungsänderung vom Vakuum zum aktiven Zentrum der Protease. In den blauen Regionen hat sich eine Verringerung der Elektronendichte durch die Bindung ergeben.

Wie erwartet, sind die größten polarisierten Bereiche an den funktionellen Gruppen lokalisiert, die wichtige elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Enzym eingehen. In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Wechselwirkungen von Asp25' zeigt das H₄-Atom des Tipranavir die größte Polarisierung, abzulesen am starken Anstieg der positiven Ladung (+0,15). Aber auch bei den anderen Verbindungen sind entsprechende blaue Bereiche in der Nähe der Wasserstoffatome der Hydroxylgruppen lokalisiert, die Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp25' eingehen. Die Interaktionen mit Ile50/50' führen zu einer deutlichen Erhöhung der Elektronendichte an den O₂- und O₃-Atomen von Nelfinavir, am O₁-Atom von Mozenavir sowie dem O₂-Atom von Tipranavir.

Es ist weiterhin erkennbar, warum das 4-Hydroxy-Dihydropyron hervorragend zur Bindung in der HIV-1 Protease geeignet ist. Man kann eine Ladungsverschiebung beobachten, die einem push-pull-Mechanismus ähnelt, bei dem Ile50 und Ile50' die Elektronendichte am O₂-Atom erhöhen und Asp25' die Elektronendichte am H₄-Atom verringert. Das konjugierte π-System ermöglicht eine effiziente Ladungsdelokalisation über einen großen Teil des Ringes. Die Elektronenverschiebung ist auch im rechten Teil der Abbildung an den alternierenden roten und blauen Bereichen im Ring erkennbar. Das 4-Hydroxy-Dihydropyron des Tipranavir besitzt deutlich bessere Wechselwirkungsmöglichkeiten als die aliphatischen Hydroxylgruppen von Nelfinavir und Mozenavir. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Dihydropyron-Substruktur durch die mesomere Aktivierung der Hydroxylgruppe ursächlich für die hohe Bindungsaffinität von Tipranavir verantwortlich ist.

Nelfinavir besitzt neben den elektrostatischen Wechselwirkungen mit Asp25' und Ile50/50' eine weitere stabile Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem H₄-Atom und Asp30. Sie führt zu einer starken Polarisierung des H₄-Atoms (+0,09). In Abbildung 4.14 ist der sich daraus ergebende stabilisierende Einfluss von Asp30 ablesbar.

4.5 Suche nach strukturellen Verbesserungen

Die in Kapitel 4.4 vorgestellten Untersuchungen der Wechselwirkungen von Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir mit der HIV-1 Protease führten zu Ergebnissen, die Vorschläge zu strukturellen Verbesserungen der Substanzen ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden zusätzliche umfangreiche QM/MM-MD-Simulationen mit den veränderten Strukturen durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden für Derivate des Mozenavir und Tipranavir vorgestellt. Nelfinavir wurde nicht weiter untersucht, obwohl auch bei diesem Inhibitor strukturelle Verbesserungen möglich wären. Jedoch bindet Nelfinavir deutlich weniger selektiv an der HIV-1 Protease (das *flap-water* wird zusätzlich für die Bindung im aktiven Zentrum benötigt, s. Kapitel 1.4.2 und 1.4.4) als Mozenavir und Tipranavir, sodass kleinere strukturelle Änderungen diesen Nachteil nicht ausgleichen würden.

4.5.1 Mozenavir-Derivate

Das Mozenavir gehört zur Substanzklasse der zyklischen Harnstoffderivate. Sie besitzen fast alle das 5,6-Dihydroxy-1,3-diazepan-2-on (s. Abbildung 4.17) als Grundgerüst. Es wurde mit dem Ziel entworfen, Liganden direkte Interaktionen mit Asp25/25' und Ile50/50' zu ermöglichen. Zusätzlich wird angenommen, dass die meist symmetrischen Substanzen besonders gut im aktiven Zentrum des ebenfalls symmetrischen Homodimers binden.

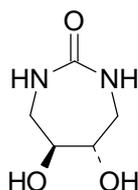


Abbildung 4.17: Grundgerüst der zyklischen Harnstoffderivate.

Die direkten Wechselwirkungen mit den erwähnten Aminosäuren konnten in den durchgeführten QM/MM-MD-Simulationen für Mozenavir bestätigt werden. Allerdings beträgt der stabilisierende Effekt des Asp25' als wichtigste Aminosäure nur 24,1 kcal/mol und ist damit vergleichbar zum Effekt auf Nelfinavir (24,3 kcal/mol, s. Abbildung 4.14). Beide Inhibitoren interagieren über aliphatische Hydroxylgruppen mit Asp25'. Hingegen kommt es beim Tipranavir vermutlich aufgrund der mesomeren Aktivierung der Hydroxylgruppe zu einer deutlich stärkeren Stabilisierung (40,7 kcal/mol) durch Asp25'.

Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist es, die Struktur der zyklischen Harnstoffderivate zu modifizieren, um die Wechselwirkungen zu steigern und

Effekte wie beim 4-Hydroxy-Dihydropyron-Grundgerüst zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde das Mozenavir schrittweise verändert.

4.5.1.1 Entwurf eines neuen Grundgerüsts mit konjugiertem System

Die Aktivierung der Hydroxylgruppe im Tipranavir beruht auf der Möglichkeit einer Ladungsdelokalisation von der Keto- bis zur Hydroxylgruppe. Um einen derartigen Effekt auch beim Mozenavir zu erhalten, wurde ein 1,7-Dihydro-6-hydroxy-2H-azepin-2-on als neues Grundgerüst entworfen (s. Abbildung 4.18). Das wichtigste Strukturelement bildet weiterhin ein siebengliedriger Ring, an dem vier aromatische Substituenten ähnlich zum Mozenavir gebunden sind. Ebenso existiert eine Ketogruppe, die direkt mit Ile50/50' interagieren kann. Das neue Derivat besitzt im Gegensatz zu den zyklischen Harnstoffen nur noch eine Hydroxylgruppe, um mit Asp25/25' in Kontakt zu treten. Wie insbesondere am Tipranavir zu erkennen ist, ergibt sich daraus kein Nachteil für die Wechselwirkungen. Die neue Ringstruktur besitzt als Besonderheit - ähnlich zum Tipranavir - die Möglichkeit zur Aktivierung der Hydroxylgruppe über die konjugierten Doppelbindungen.

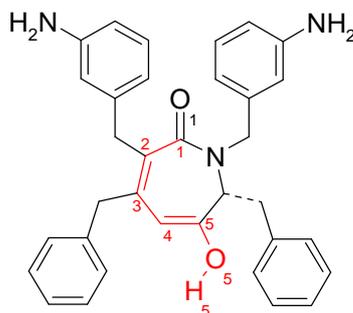


Abbildung 4.18: Mozenavir-Derivat mit modifiziertem Grundgerüst. Das rote dargestellte konjugierte System wurde von der 4-Hydroxy-Dihydropyronstruktur abgeleitet. Die Bezifferung dient der Identifizierung von Atomen bei der Beschreibung von Moleküleigenschaften.

Als Grundlage für die Untersuchungen des Derivats wurde die Kristallstruktur des Mozenavir verwendet. Das neue Grundgerüst wurde mit Hilfe des Programmpakets InsightII [137] erstellt, energieminiert und ins aktive Zentrum integriert. Im Anschluss wurden QM/MM-MD-Simulationen des Liganden im Komplex mit der HIV-1 Protease durchgeführt (vgl. Kapitel 4.4.1). Die darauf folgende Analyse der Wechselwirkungsenergien ergab die in Tabelle 4.9 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 4.9: Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) des Mozenavir-Derivats

Mozenavir-Derivat	
ΔE_{Disp}	-49,9 ± 0,4
ΔE_{el}	-52,7 ± 0,9
ΔE_{perm}	-39,3 ± 0,8
ΔE_{pol}	-13,4 ± 0,2
ΔE_{stab}	-26,7 ± 0,4
ΔE_{dist}	13,3 ± 0,2

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus QM/MM-MD-Simulationen des Enzym-Ligand-Komplexes über 10 ps.

Ein Vergleich der hier dargestellten Werte mit denen des Mozenavir zeigt (s. Tabelle 4.8), dass vor allem die elektrostatischen Wechselwirkungen von -39,6 auf -52,7 kcal/mol zugenommen haben. Bei genauerer Analyse ist festzustellen, dass dieser Zuwachs allein auf der Zunahme der permanenten elektrostatischen Wechselwirkungen von -23,7 auf -39,3 kcal/mol beruht. Die Gründe lassen sich nicht aus den präsentierten Daten ableiten. Es ist weiterhin zu erkennen, dass sich die hydrophoben Interaktionen um etwa 8 kcal/mol verringert haben. Die Ursache kann in der erhöhten Polarisierung des neuen Ringsystems liegen.

Ein Ziel beim Entwurf des Grundgerüsts war die Schaffung eines konjugierten Systems zur Verstärkung der Wechselwirkungen mit Asp25/25' und Ile50/50'. Zur Überprüfung wurde die atomare Polarisierung im Vakuum und im Komplex mit dem Enzym mit Hilfe der Mulliken-Populationsanalyse analog zur Beschreibung in Kapitel 4.4.2.3 ermittelt. Die Abbildung 4.19 zeigt im linken Teil die Partialladungen der an den Wechselwirkungen beteiligten Atome. Die Differenz aus der Atomladung im Enzym und im Vakuum ergibt die atomare Polarisierung aufgrund des Bindungsprozesses wieder und entspricht der Elektronenverschiebung. Die Ergebnisse erfüllen die Erwartungen. Es kommt zur Ausbildung eines push-pull-Systems, wobei Elektronen vom Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe in Richtung der Ketogruppe verschoben werden, erkennbar an der alternierenden Zunahme positiver bzw. negativer Atomladungen. Die grafische Darstellung der Elektronendichtedifferenzen auf

der rechten Seite der Abbildung bestätigt die Ergebnisse qualitativ, zu erkennen an wechselnden blauen und roten Bereichen im Grundgerüst.

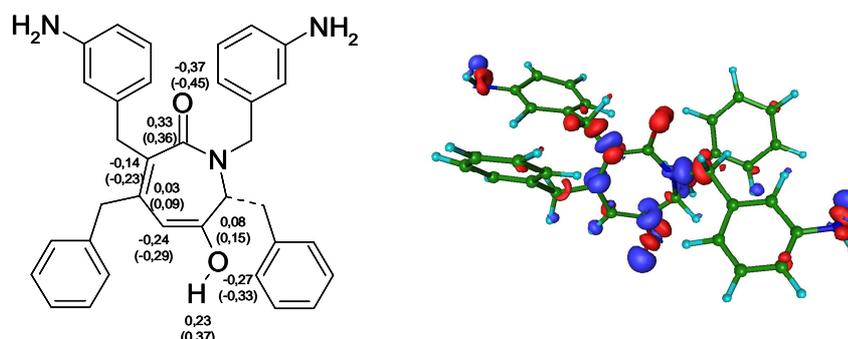


Abbildung 4.19: Die atomare Polarisation des Derivats von Mozenavir. Links: Durchschnittliche Partialladungen im Vakuum und im Enzym (in Klammern). Die Werte sind in Elementarladungen angegeben. Rechts: Grafische Darstellung der Elektronendichtedifferenzen. Blaue Bereiche kennzeichnen eine Verringerung der Elektronendichte, eine Zunahme an Elektronendichte liegt in den roten Regionen vor. Der Konturlevel entspricht vorherigen Untersuchungen.

Eine Aminosäure-Dekompositionsanalyse wurde durchgeführt, um den genauen Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Ligandenbindung zu bestimmen und insbesondere die Interaktionen mit Asp25' näher zu betrachten (s. Abbildung 4.20). Es ist auffällig, dass sich die Einflüsse einiger Aminosäurereste relativ stark verändern. Asp25' stellt weiterhin den wichtigsten Wechselwirkungspartner für den Liganden dar, der positive Effekt hat sich jedoch um 5,8 kcal/mol im Vergleich zum Mozenavir verringert. Eine mögliche Ursache liegt in der nicht ganz idealen Lage des neuen Ringsystems, wodurch sich auch ein verringerter Effekt von Ile50' ergibt. Die deutlich stärkere Stabilisierung des Derivats durch Asp30 ist auf eine leichte Positionsänderung des am sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom gebundenen 4-Aminobenzylrestes zurückzuführen. Beim Mozenavir ist dieser Substituent am Stickstoff des Diazepanringes gebunden. Die verstärkte Interaktion mit Asp29' kommt durch die allgemeine Lageänderung des Ringsystems zustande.

Aminosäuren-Dekompositionsanalyse

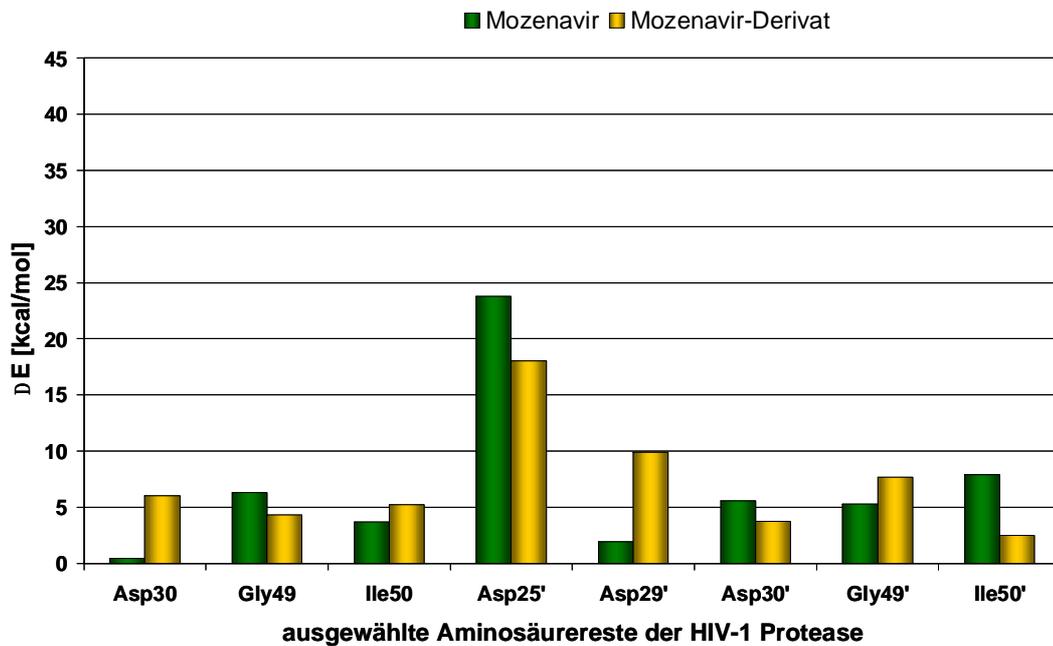


Abbildung 4.20: Einfluss einzelner Aminosäuren. Die positiven Energieänderungen zeigen den stabilisierenden Effekt der jeweils angegebenen Aminosäure auf die Ligandenbindung. Dargestellt sind Aminosäuren, die auf mindestens einen Inhibitor einen Einfluss von mehr als ± 5 kcal/mol besitzen. Die Resultate des Mozenavir sind den Untersuchungen aus Kapitel 4.3.2.2 entnommen.

Die Untersuchung des Wasserstoffbrückenbindungsmusters zeigt zwei konstante Wechselwirkungen des Liganden mit den Sauerstoffatomen von Asp25'. Die Aminosäure Asp25 bildet Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu Asp25' als auch zum Sauerstoff der Hydroxylgruppe aus (s. Abbildung 4.21). Hingegen unterliegen die Interaktionen mit Ile50 und Ile50' kleineren Schwankungen aufgrund der Lageänderung des Ringsystems. Eine weitere stabile Wasserstoffbrückenbindung besteht zwischen der zuvor beschriebenen aromatischen Aminogruppe und Asp30.

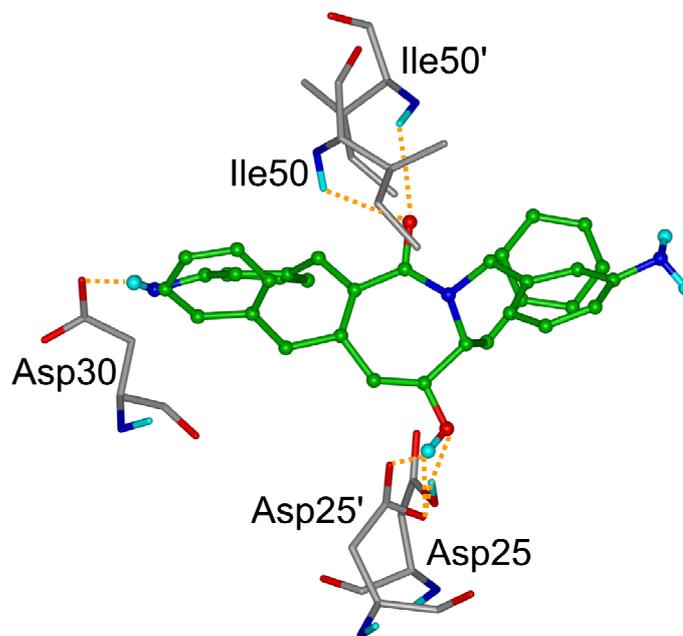


Abbildung 4.21: Mozenavir-Derivat im aktiven Zentrum der HIV-1 PR.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Modifikation des Ringsystems die Möglichkeit bietet, im aktiven Zentrum einen push-pull-Mechanismus ähnlich zum Tipranavir auszubilden. Allerdings scheint das neue Grundgerüst nicht ideal am Wirkort binden zu können. Weiterhin bewirkt das veränderte Ringsystem eine Lageänderung der aromatischen Substituenten, wodurch diese deutlich bessere Interaktionen mit Aminosäuren des aktiven Zentrums eingehen können. Im Endeffekt erhöhen sich die Gesamtwechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym, was auch mit einer Affinitätszunahme korrelieren könnte. Dieser Strukturentwurf scheint also eine geeignete Basis zum Design neuer Substanzen zu sein.

4.5.1.2 Verbesserung der Substituenten

Der Inhibitor A98881 (s. Abbildung 4.22 [138]) hemmt die HIV-1 Protease wesentlich stärker als das Mozenavir. Die Verbindung besitzt im Vergleich zu den ursprünglichen zyklischen Harnstoffderivaten ein leicht verändertes Grundgerüst.

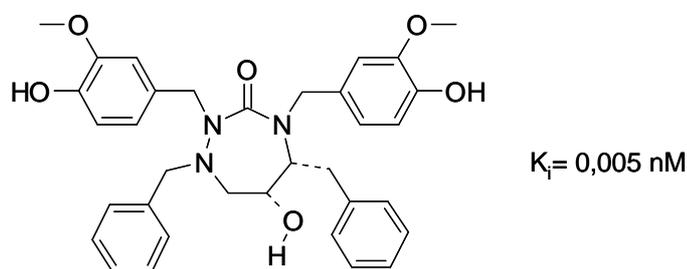


Abbildung 4.22: Inhibitor A98881.

Es fällt auf, dass auch hier nur eine Hydroxylgruppe Wechselwirkungen mit Asp25/25' eingehen kann. Diese Modifikation kann aber nicht die alleinige Ursache für die erhöhte Bindungsaffinität sein. Die Veränderung der Substituenten des Grundgerüsts scheint einen entscheidenden Anteil an der verbesserten Bindung im Enzym zu haben. Aus diesem Grund wurde das Grundgerüst der im vorhergehenden Kapitel untersuchten Verbindung in den Inhibitor A98881 integriert (Abbildung 4.23).

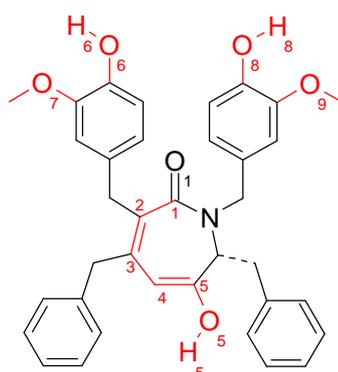


Abbildung 4.23: Derivat des Inhibitors A98881. Die Modifikationen zum Mozenavir sind rot dargestellt. Die Bezifferung dient der Identifizierung von Atomen bei der Beschreibung von Moleküleigenschaften.

Um die Auswirkungen der Modifikationen beurteilen zu können, wurde der Ligand in einer QM/MM-MD-Simulation untersucht. Ausgangspunkt für die Untersuchungen des A98881-Derivats war die Startgeometrie des Mozenavir-Derivats. Die 4-Aminobenzylsubstituenten wurden mit Hilfe des Programms InsightII durch 4-Hydroxy-3-methoxybenzylreste ersetzt. Die weitere Durchführung erfolgte analog zur Beschreibung im Kapitel 4.4.1.

Die Tabelle 4.10 zeigt die Wechselwirkungsenergien des Liganden. Es kommt zu einer weiteren Steigerung der elektrostatischen Interaktionen mit dem Enzym im Vergleich zum Mozenavir (s. Tabelle 4.8) und dem bereits untersuchten Derivat (s. Tabelle 4.9). Die Veränderung der Substituenten vom Mozenavir- zum A98881-Derivat bewirkt eine deutliche Zunahme der elektrostatischen Polarisation von -13,4 auf -19,7 kcal/mol, hingegen steigt die permanente Wechselwirkungsenergie nur geringfügig. Die Dispersionseffekte

mit dem Enzym verringern sich beim neuen Liganden nur begrenzt. Beide Substituenten scheinen vergleichbare Möglichkeiten für hydrophobe Wechselwirkungen zu besitzen.

Tabelle 4.10: Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) des A98881-Derivats

A98881-Derivat	
ΔE_{Disp}	-47,8 ± 1,0
ΔE_{el}	-60,3 ± 0,6
ΔE_{perm}	-40,7 ± 0,5
ΔE_{pol}	-19,7 ± 0,2
ΔE_{stab}	-39,3 ± 0,3
ΔE_{dist}	19,6 ± 0,2

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus QM/MM-MD-Simulationen des Enzym-Ligand-Komplexes über 10 ps.

In Abbildung 4.24 sind die Ergebnisse der atomaren Polarisation gezeigt. Auch in den hier durchgeführten MD-Simulationen ist die Ausbildung eines push-pull-Effekts im Grundgerüst erkennbar, wodurch sich Elektronen vom H₅-Atom in Richtung O₁-Atom bewegen. Zusätzlich sind größere Effekte an den neuen 4-Hydroxy-3-methoxybenzylsubstituenten festzustellen. Besonders das H₆-Atom der phenolischen Hydroxylgruppe scheint aufgrund des starken Ladungsanstiegs direkte Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum auszubilden. Die angegebenen Elementarladungen werden durch die Darstellung der Elektronendichtedifferenzen ergänzt und bestätigt.

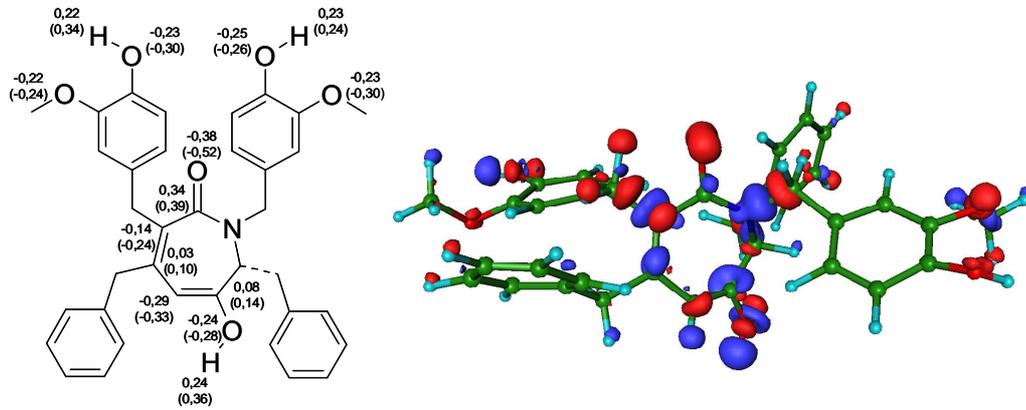


Abbildung 4.24: Atomare Polarisation des Derivats von A98881. Links: Durchschnittliche Partialladungen im Vakuum und im Enzym (in Klammern). Die Werte sind in Elementarladungen angegeben. Rechts: Grafische Darstellung der Elektronendichtedifferenzen. Blaue Bereiche kennzeichnen eine Verringerung der Elektronendichte, eine Zunahme an Elektronendichte liegt in den roten Regionen vor. Der Konturlevel entspricht vorherigen Untersuchungen.

Die Analyse der direkten Wechselwirkungen zwischen Enzym und Ligand offenbart die Eigenschaften der modifizierten Substituenten (s. Abbildung 4.25). Die 4-Hydroxy-3-methoxybenzylreste bilden drei Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken 2, 3 und 7) aus. Die zuvor beschriebenen starken Polarisierungseffekte korrelieren mit den hier dargestellten Ergebnissen.

Daneben treten die bereits bekannten Interaktionen mit Asp25/25' und Ile50/50' auf. Es ist bemerkenswert, dass insbesondere die Wasserstoffbrückenbindungen mit den Isoleucinen im Vergleich zum Mozenavir-Derivat deutlich stabiler sind.

Wasserstoffbrückenbindungsmuster des A98881-Derivats

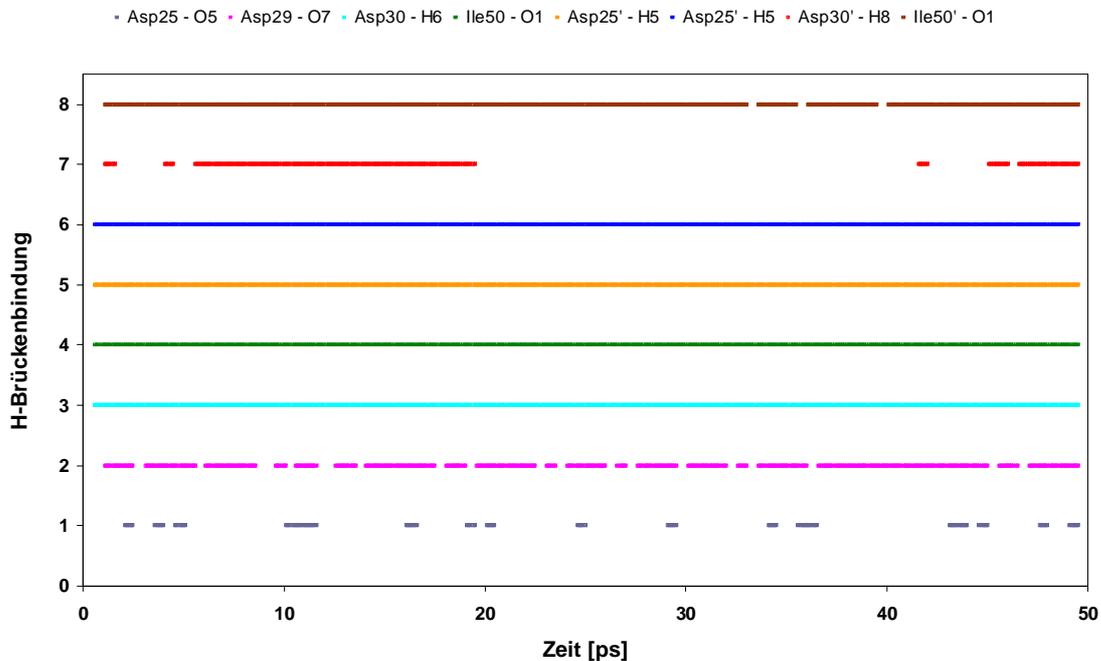


Abbildung 4.25: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem A98881-Derivat und der HIV-1 Protease. Dargestellt sind 50 ps des equilibrierten Systems. Die Atomnummerierung ist Abbildung 4.23 zu entnehmen.

Zur endgültigen Bewertung der Bindungseigenschaften des A9881-Derivats wurde eine Aminosäure-Dekompositionsanalyse durchgeführt (s. Abbildung 4.26). Hierbei zeigt sich, dass der neue Ligand im Vergleich zum zuvor untersuchten Mozenavir-Derivat (s. Abbildung 4.20) deutlich mehr durch Asp25' stabilisiert wird und das Niveau von Mozenavir erreicht. Des Weiteren ist auffällig, dass sich Effekte einiger Aminosäuren umgekehrt haben. So besitzen beim A98881-Derivat Asp30, Gly49' und Ile50 eine größere Wirkung als Asp30', Gly49 und Ile50'. Diese Veränderungen bedeuten keinen Unterschied in der Bindung, sondern sind aufgrund der Symmetrie der HIV-1 Protease möglich. Demzufolge erhöht nur Asp29' die günstigen Wechselwirkungen im aktiven Zentrum.

Aminosäuren-Dekompositionsanalyse

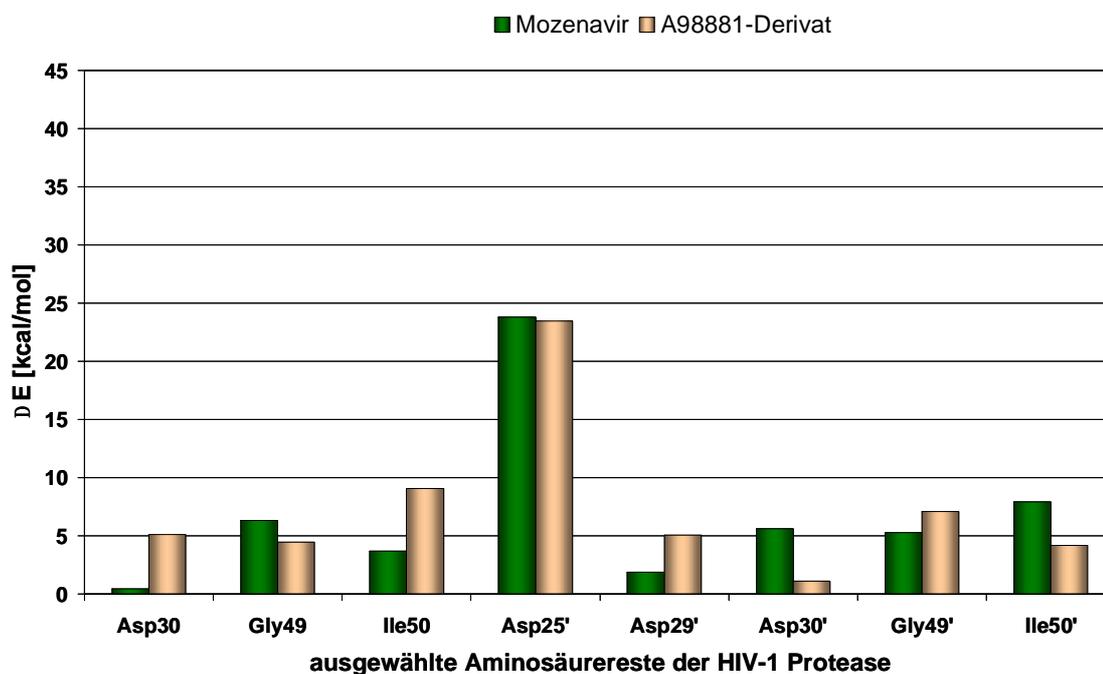


Abbildung 4.26: Einfluss einzelner Aminosäuren. Die positiven Energieänderungen zeigen den stabilisierenden Effekt der jeweils angegebenen Aminosäure auf die Ligandenbindung. Dargestellt sind Aminosäuren, die auf mindestens einen Inhibitor einen Einfluss von mehr als ± 5 kcal/mol besitzen. Die Resultate des Mozenavir sind den Untersuchungen aus Kapitel 4.4.2.2 entnommen.

Als Resümee lässt sich feststellen, dass die Modifikationen der Substituenten einen deutlichen Beitrag zur Erhöhung der elektrostatischen Wechselwirkungsenergien leisten und demzufolge die Bindungseigenschaften im Enzym verbessern. Das wiederholte Auftreten des push-pull-Effektes erfüllt die Erwartungen an das veränderte Grundgerüst, auch wenn der stabilisierende Effekt von Asp25' nicht deutlich gesteigert werden konnte. Folglich kann auch die hier vorgestellte Struktur als Anregung zum Entwurf neuer Hemmstoffe dienen.

4.5.2 Tipranavir-Derivate

Die bereits vorgestellten Ergebnisse für Tipranavir unterstreichen die herausragende inhibitorische Potenz der Substanz ($K_i=0,008$ nM). Der mit Hilfe der Aminosäuren-Dekompositionsanalyse aufgedeckte, besonders starke Stabilisierungseffekt von Asp25' sowie die einem push-pull-Mechanismus ähnliche Ladungsverschiebung legen nahe, dass Tipranavir optimal im aktiven Zentrum der HIV-1 Protease bindet. Eine Modifikationsmöglichkeit bietet lediglich die Sulfonamidstruktur des Tipranavir. Wie in Kapitel 4.4.2.2 beschrieben, führt die erhöhte negative Ladungsdichte der beiden

Sauerstoffatome dieser Partialstruktur zu einer anderen Orientierung der Seitenkette von Asp30 als bei Nelfinavir. Als Folge ergibt sich ein destabilisierender Effekt von mehr als 5 kcal/mol auf die Bindung des Tipranavir. Eine Verbesserung dieser Substruktur könnte die Bindungsaffinität erhöhen.

4.5.2.1 Invertierung des Sulfonamids

Zur Verringerung der Ladungsdichte sowie der ungünstigen Wechselwirkungen mit Asp30 wurde das Sulfonamid invertiert, sodass die Sulfongruppe und das Amin die Positionen wechseln (s. Abbildung 4.27). Es sollte getestet werden, ob der Ersatz eines Wasserstoffbrückenakzeptors durch einen –donator eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp30 ermöglicht und so eine stärkere Bindung im aktiven Zentrum bewirkt. Zur Untersuchung der veränderten Wechselwirkungen wurden QM/MM-MD-Simulationen mit dem Derivat durchgeführt. Die Ausgangskoordinaten wurden der Kristallstruktur von Tipranavir im Komplex mit der HIV-1 Protease entnommen. Im Anschluss wurden nur die Positionen des Sulfonamids mit Hilfe des Programmpakets InsightII verändert. Die Systeminitialisierung, Energieminimierung sowie die MD-Simulationen wurden entsprechend der Beschreibung in Kapitel 4.4.1 durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

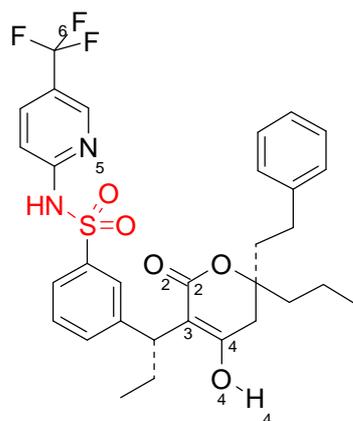


Abbildung 4.27: Derivat des Tipranavir mit inversem Sulfonamid. Die veränderte Substruktur ist in rot dargestellt. Die Bezifferung dient der Identifizierung von Atomen bei der Beschreibung von Moleküleigenschaften.

Nach Erreichen eines equilibrierten Zustandes wurden für die neue Substanz die Wechselwirkungsenergien, Wasserstoffbrückenbindungsmuster und die Effekte der einzelnen Aminosäuren für den modifizierten Protein-Ligand-Komplex untersucht.

Tabelle 4.11: Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) des Tipranavir-Derivats mit modifiziertem Sulfonamid

Tipranavir-Derivat	
mit invertierter Sulfonamidgruppe	
ΔE_{Disp}	-72,4 ± 0,9
ΔE_{el}	-64,1 ± 1,1
ΔE_{perm}	-44,4 ± 0,8
ΔE_{pol}	-19,7 ± 0,3
ΔE_{stab}	-39,3 ± 0,7
ΔE_{dist}	19,5 ± 0,3

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus QM/MM-MD-Simulationen des Enzym-Ligand-Komplexes über 10 ps.

Die Analyse der in Tabelle 4.11 dargestellten Wechselwirkungsenergien ergab mit Tipranavir vergleichbare Werte (s. Tabelle 4.8), wobei es insgesamt zu einer Erhöhung um fast 7 kcal/mol gekommen ist.

Zur Überprüfung des Effektes von Asp30 auf die Inhibitorbindung wurde nach dem in Kapitel 4.4.2.2 beschriebenen Verfahren eine Aminosäure-Dekompositionsanalyse durchgeführt. In Abbildung 4.28 ist zu erkennen, dass sich der Einfluss von Asp30 deutlich verändert hat. Die Destabilisierung von etwa 6 kcal/mol hat sich in einen stabilisierenden Effekt von mehr als 3 kcal/mol umgekehrt. Weiterhin hat sich der Einfluss von Arg8' deutlich erhöht. Die Ursache liegt in einer leichten Positionsänderung des Trifluoromethyl-Pyridin-Substituenten aufgrund der Invertierung des Sulfonamids (vgl. Abbildung 4.29). Die weiteren Aminosäuren besitzen erwartungsgemäß ähnliche Effekte auf die beiden Inhibitoren. Arg87' hat keinen direkten Kontakt zu den Liganden und bildet mit Asp29' eine Salzbrücke. Durch die Entfernung des Wechselwirkungspartners für Asp29' kommt es zu einer erhöhten negativen Ladungsdichte in der Umgebung der Aminosäure, die nicht mehr abgepuffert werden kann. Aus diesem Grund ergibt sich ein scheinbar negativer Effekt auf die Ligandenbindung.

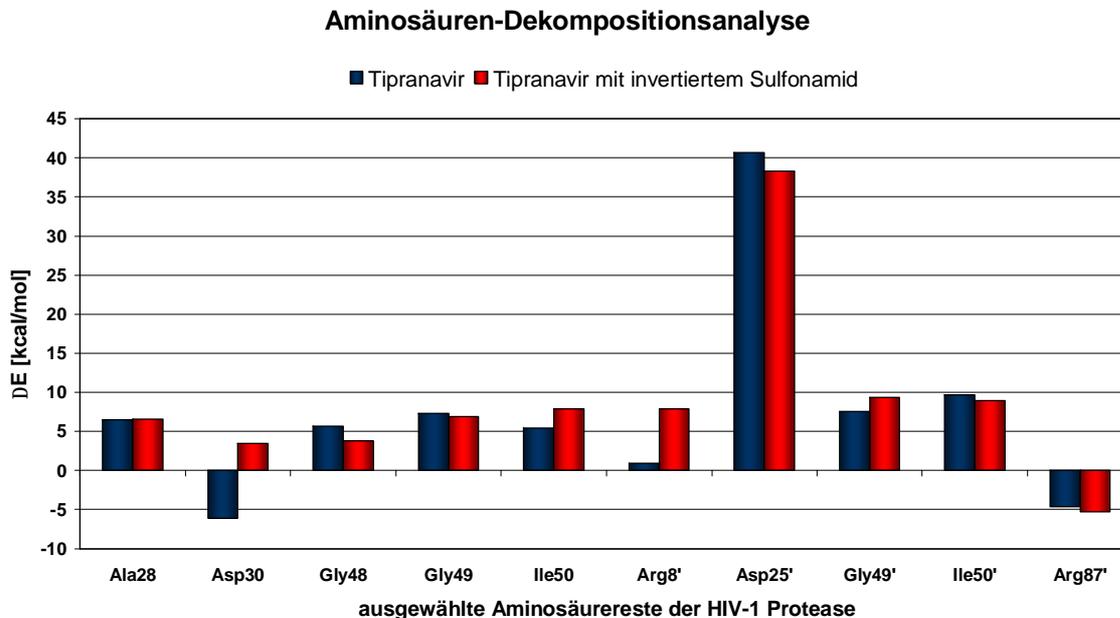


Abbildung 4.28: Beiträge individueller Aminosäuren zur Bindung der Inhibitoren. Positive und negative Energieänderungen zeigen den stabilisierenden oder destabilisierenden Effekt der jeweils angegebenen Aminosäure. Ausgewählt wurden Aminosäuren, die auf mindestens einen Inhibitor einen Einfluss von mehr als ± 5 kcal/mol besitzen. Die Resultate des Tipranavir sind den Untersuchungen aus Kapitel 4.4.2.2 entnommen.

Abbildung 4.29 zeigt eine Überlagerung von Tipranavir (grün) und dem neuen Derivat (magenta) im aktiven Zentrum des Enzyms. Es ist zu erkennen, dass keine direkte Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp30 und dem Wasserstoffatom des Sulfonamids ausgebildet wird. Der mittlere Abstand beträgt ca. 4 Å.

Beim Derivat fehlt auch aufgrund der Invertierung des Sulfonamids eine direkte Wechselwirkung mit Gly48 (zur besseren Übersicht nicht eingeblendet), wie sie beim Tipranavir zu beobachten ist (s. Abbildung 4.15). Daraus ergibt sich auch der etwas geringere Stabilisierungseffekt (vgl. Abbildung 4.28). Eine zusätzliche Wasserstoffbrücke existiert zwischen Arg8' und einem Fluoratom der Trifluormethylgruppe, bedingt durch die Lageänderung des Trifluoromethyl-Pyridin-Substituenten. Die weiteren Wechselwirkungen entsprechen denen des Tipranavir im Komplex mit der HIV-1 Protease.

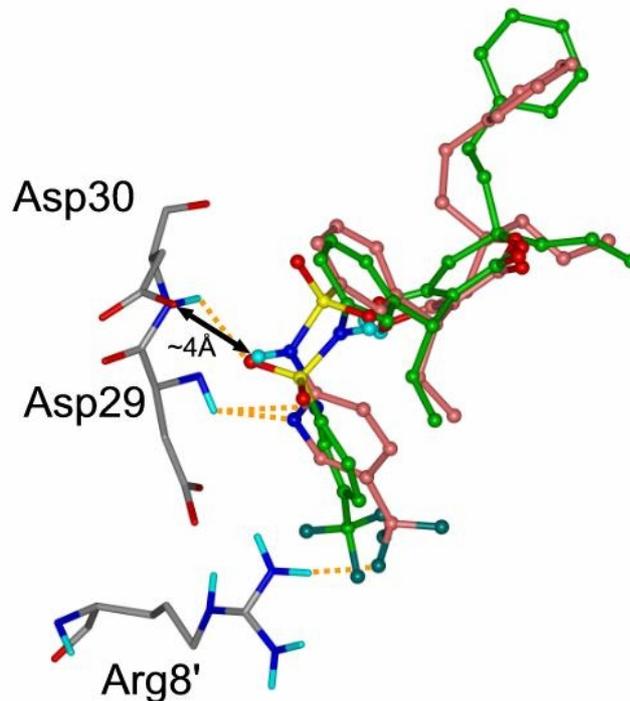


Abbildung 4.29: Überlagerung von Tipranavir (grün) und dem Derivat mit invertierter Sulfonamidgruppe (magenta) im aktiven Zentrum. Zur besseren Übersicht sind nur Aminosäuren eingeblendet, die wichtige Wechselwirkungen mit dem Derivat ausbilden.

Bei der Analyse der atomaren Polarisierung konnte wie beim Tipranavir die Ausbildung des push-pull-Systems beobachtet werden, welches zu besonders starken Wechselwirkungen mit Asp25' und Ile50/50' führt.

Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Invertierung der Sulfonamidstruktur eine Verbesserung der Bindungseigenschaften ermöglicht.

4.5.2.2 Ersatz des Sulfonamids durch Hydroxylgruppen

Die Invertierung der Sulfonamidgruppe verbesserte, wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, die Wechselwirkungen zwischen dem Tipranavir und der HIV-1 Protease. Im Folgenden wird die Untersuchung des Austauschs dieser funktionellen Gruppe durch eine bzw. zwei Hydroxylgruppen beschrieben (s. Abbildung 4.30). Bei der Monohydroxy-Verbindung wurde aufgrund der Gegebenheiten im aktiven Zentrum nur das abgebildete S-Enantiomer evaluiert, da nur in dieser Konfiguration der Wasserstoffbrückendonator in Richtung von Asp30 zeigt. Beim Diol-Derivat wurden beide Enantiomere der zweiten Hydroxylgruppe untersucht. Dabei ergab sich, dass das hier angegebene S-Enantiomer deutlich günstigere Bindungseigenschaften als das R-Enantiomer

besitzt. Aus diesem Grund werden nur die Ergebnisse der in Abbildung 4.30 dargestellten Konfigurationen präsentiert.

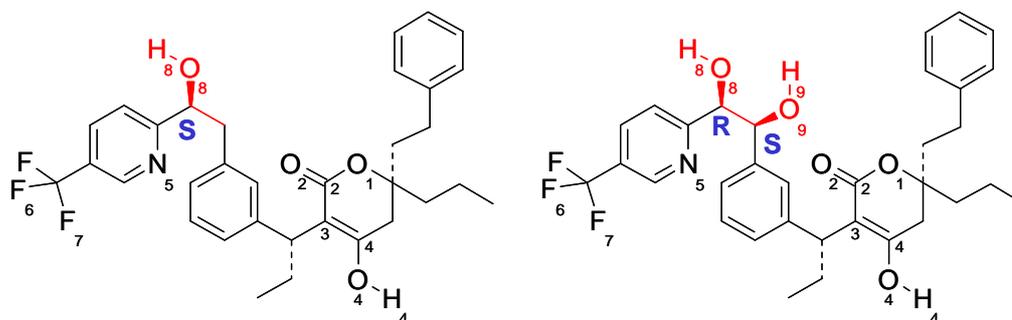


Abbildung 4.30: Hydroxy-Derivate des Tipranavir. Die neuen Strukturelemente sind rot gekennzeichnet. Die Bezifferung dient der Identifizierung von Atomen bei der Beschreibung von Moleküleigenschaften.

Es wurden QM/MM-MD-Simulationen der Liganden im Komplex mit der HIV-1 Protease nach dem Standardverfahren durchgeführt (s. Kapitel 4.4.1). Die berechneten Wechselwirkungsenergien sind in Tabelle 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.12: Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) der Hydroxy-Derivate des Tipranavir

	Monohydroxy-Derivat des Tipranavir	Dihydroxy-Derivat des Tipranavir
ΔE_{Disp}	-70,1 ± 0,9	-62,0 ± 0,8
ΔE_{el}	-55,8 ± 1,2	-70,4 ± 1,2
ΔE_{perm}	-33,6 ± 0,8	-50,3 ± 0,9
ΔE_{pol}	-22,2 ± 0,4	-20,2 ± 0,4
ΔE_{stab}	-44,2 ± 0,8	-40,0 ± 0,8
ΔE_{dist}	22,0 ± 0,4	19,9 ± 0,4

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus QM/MM-MD-Simulationen der Enzym-Ligand-Komplexe über 10 ps.

Die Ergebnisse der beiden Hydroxy-Derivate unterscheiden sich relativ stark voneinander. Die elektrostatischen Wechselwirkungen der Monohydroxyverbindung sind um mehr als 6 kcal/mol geringer als die des Tipranavir (s. Tabelle 4.8). Die Werte verbessern sich deutlich durch die Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe und übertreffen die des Tipranavir um nahezu 8 kcal/mol. Während der Ersatz der Sulfongruppe durch eine Methylengruppe zu höheren hydrophoben Interaktionen des Monohydroxy-

Derivats führt, bewirkt dagegen die Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe eine Verringerung dieser Wechselwirkungen.

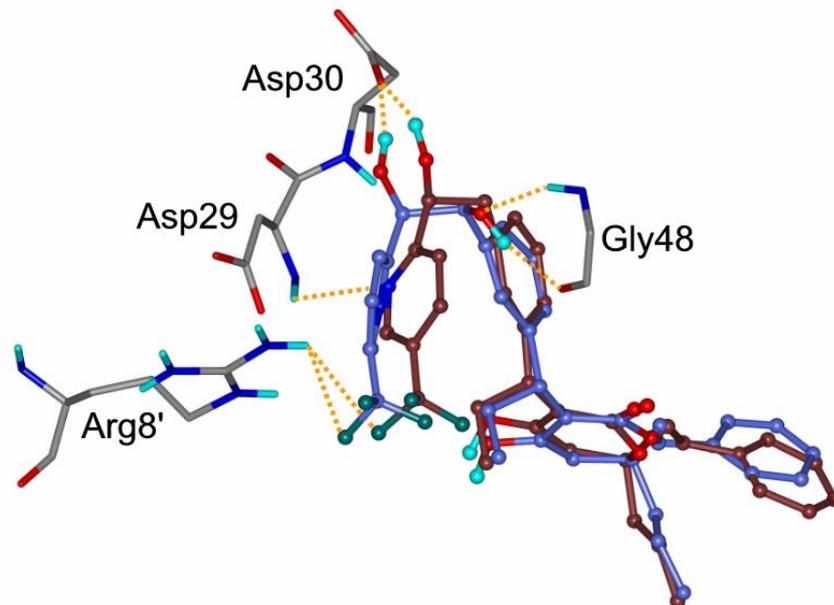


Abbildung 4.31: Überlagerung des Monohydroxy-Derivats (rotbraun) und des Diols (blau) im aktiven Zentrum der HIV-1 Protease. Zur besseren Übersicht sind nur Aminosäuren eingeblendet, die wichtige Wechselwirkungen mit den modifizierten Molekülteilen eingehen.

Anhand von Abbildung 4.31 ist gut nachvollziehbar, wie es zu den beschriebenen Veränderungen der Wechselwirkungsenergien kommt. So besitzt das Diol die Möglichkeit, über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Gly48 zu interagieren.

Erkenntnisse zur Stabilisierung durch einzelne Aminosäuren konnten durch eine entsprechende Dekompositionsanalyse gewonnen werden (s. Abbildung 4.32).

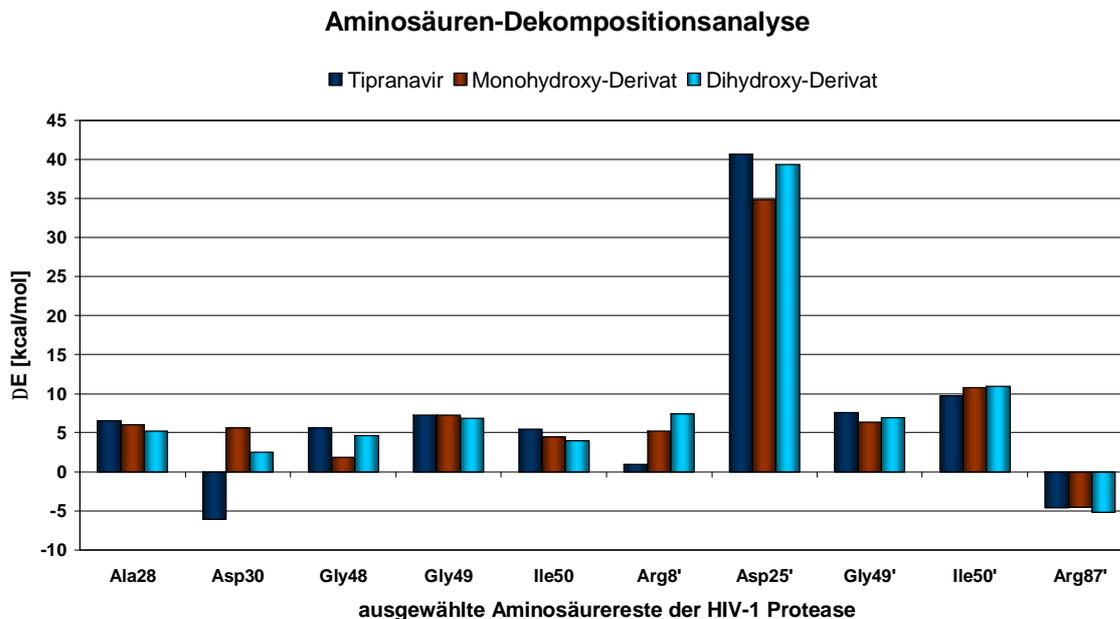


Abbildung 4.32: Beiträge individueller Aminosäuren zur Bindung der Inhibitoren. Positive und negative Energieänderungen zeigen den stabilisierenden bzw. destabilisierenden Effekt der jeweils angegebenen Aminosäure. Dargestellt sind Aminosäuren, die auf mindestens einen Inhibitor einen Einfluss von mehr als ± 5 kcal/mol besitzen. Die Resultate des Tipranavir sind den Untersuchungen aus Kapitel 4.4.2.2 entnommen.

Auch bei diesen Strukturvariationen ist festzustellen, dass sich die Interaktionen mit Asp30 deutlich verbessern. Das Monohydroxy-Derivat wird durch diese Aminosäure um 5,6 kcal/mol und das Diol um 2,5 kcal/mol stabilisiert. Der Einfluss von Arg8' verstärkte sich bei beiden Derivaten um 4,3 bzw. 6,4 kcal/mol durch eine leichte Annäherung des Trifluormethyl-Pyrimidin-Substituenten. Aufgrund eines fehlenden Wechselwirkungspartners reduzierte sich der Effekt von Gly48 auf das Monohydroxy-Derivat um 3,8 kcal/mol. Dagegen ergab der Austausch des Wasserstoffatoms des Sulfonamids durch eine Hydroxylgruppe vergleichbare Ergebnisse. Die Stabilisierung der Liganden durch Asp25' besitzt bei den drei Strukturen die größte Bedeutung, auch wenn sie beim Monohydroxy-Derivat im Vergleich zu den beiden anderen um etwa 5 kcal/mol verringert ist.

Wasserstoffbrückenbindungsmuster der Hydroxy-Derivate des Tipranavir

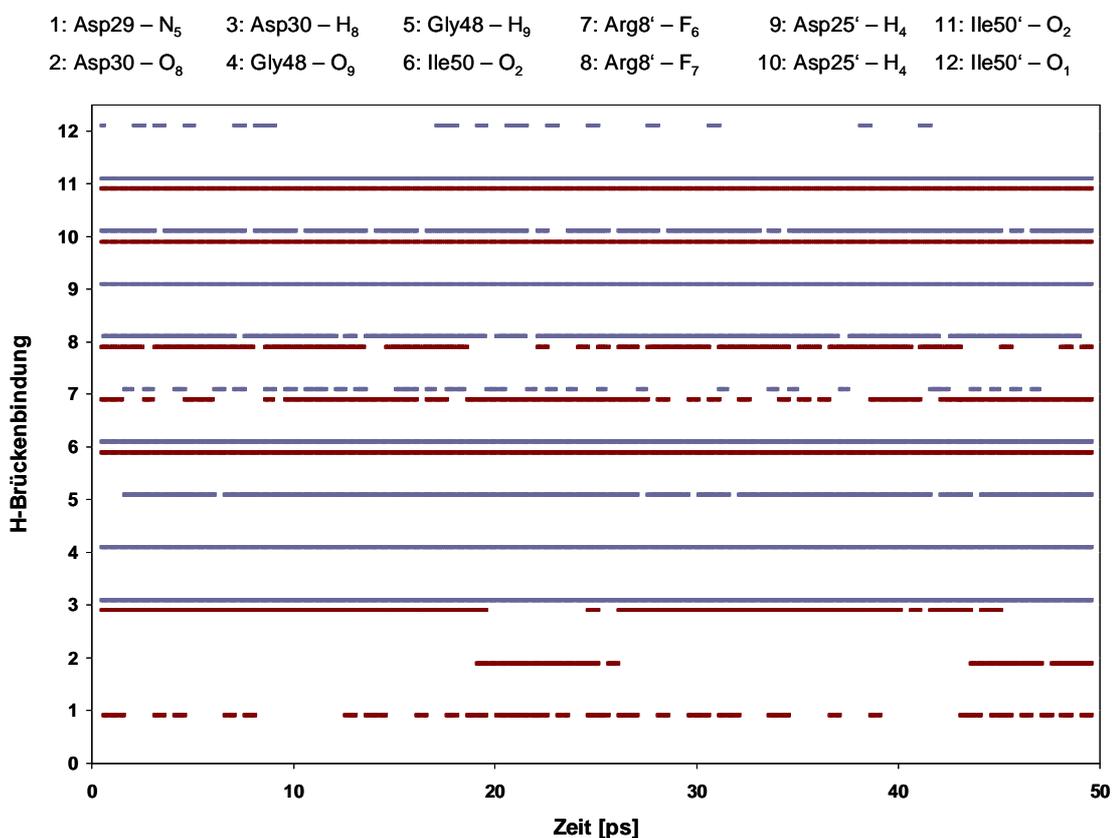


Abbildung 4.33: Vergleich der Wasserstoffbrückenbindungen des Mono- und Dihydroxy-Derivats. Untersucht wurden 50 ps der equilibrierten QM/MM-MD-Simulationen. Die jeweilige Wasserstoffbrückenbindung des Monohydroxy-Derivats (rotbraun) ist unterhalb und die des Dihydroxy-Derivats (blau) oberhalb der Nummer dargestellt. Die Atomnummern der Verbindungen sind Abbildung 4.30 zu entnehmen.

Die Analyse der Wasserstoffbrückenbindungsmuster (s. Abbildung 4.33) bestätigt die Ergebnisse der Aminosäure-Dekompositionsanalyse. Beide Hydroxy-Derivate bilden stabile Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp30 aus (H-Brücken 2 und 3), wobei die Monohydroxy-Verbindung bei den Wechselwirkungspartnern variiert. Die Einführung der Hydroxylgruppe bewirkt im Vergleich zur invertierten Sulfonamidgruppe (s. Kapitel 4.5.2.1) einen noch günstigeren Effekt von Asp30 durch die räumliche Annäherung des Wasserstoffbrückenbindungsdonators an die Seitenketten-Carboxylatgruppe. Das Dihydroxy-Derivat geht zwei weitere direkte Wechselwirkungen mit Gly48 ein (H-Brücken 4 und 5), welche die Monohydroxy-Verbindung aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe nicht ausbilden kann. Die zweite Hydroxylgruppe bewirkt folglich den in Abbildung 4.32 gezeigten günstigen Stabilisierungseffekt durch Gly48. Die H-Brücken 6, 10 und 11 bestätigen, dass die bedeutenden Interaktionen der 4-Hydroxy-Dihydropyron-Substruktur mit Asp25' und Ile50/50' bei beiden Verbindungen ebenfalls vorliegen. Das Dihydroxy-Derivat bildet

zusätzlich zwei Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken 9 und 12) mit Asp25' und Ile50', welche die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien zusätzlich erhöhen. Wie beim Derivat mit invertierter Sulfonamidgruppe bestehen bei beiden Hydroxyverbindungen direkte Wechselwirkungen zwischen Arg8' und den Fluoratomen der Trifluormethylgruppen, die auf die geringfügige Lageänderung des Substituenten zurückzuführen sind (H-Brücken 7 und 8).

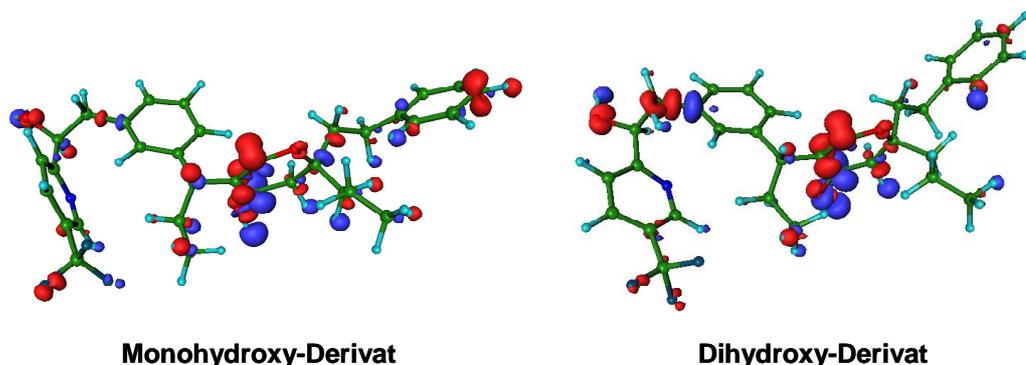


Abbildung 4.34: Grafische Darstellung der Elektronendichtedifferenzen repräsentativer Strukturen der Hydroxy-Derivate des Tipranavir. Blaue Bereiche kennzeichnen eine Verringerung der Elektronendichte, eine Zunahme an Elektronendichte ist in rot dargestellt. Der Konturlevel ist identisch. Die relative Orientierung der Liganden entspricht der in Abbildung 4.30.

Die Untersuchung der atomaren Polarisierung ergab einen nahezu identischen push-pull-Effekt der 4-Hydroxy-Dihydropyron-Substruktur bei den beiden Hydroxy-Derivaten, auch im Vergleich zum Tipranavir. Zusätzlich bestätigen die in Abbildung 4.34 gezeigten Elektronendichtedifferenzen die Ergebnisse. Im Bereich des Ringsystems alternieren die roten und blauen Bereiche als Indiz für die Elektronenverschiebungen. Im jeweils linken Teil der Liganden ist auch die Polarisierung der Hydroxylgruppen durch Asp30 und Gly48 (nur beim Dihydroxy-Derivat) erkennbar. Die Elektronendichte an den zugehörigen Wasserstoffatomen verringert sich (blaue Regionen) durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen. An den beteiligten Sauerstoffatomen nimmt die Ladungsdichte im Enzym-Ligand-Komplex zu (rote Bereiche).

Als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen lässt sich ableiten, dass Hydroxylgruppen eine gute Alternative zur Sulfonamidstruktur darstellen und die Wechselwirkungen mit Asp30 verbessern. Das Dihydroxy-Derivat übertrifft sogar die Gesamtwechselwirkungsenergien des Tipranavir. Nachteilig könnte sich auswirken, dass Verbindungen mit Diolstrukturen in gewissem Umfang oxidationsempfindlich sind. Hingegen ist anzunehmen, dass das Diol aus biotransformatorischer Sicht eine größere Stabilität als das Monohydroxy-

Derivat besitzt. Insgesamt können aber beide Verbindungen als aussichtsreiche Optionen zum Tipranavir angesehen werden.

4.5.3 Vergleich der Elektronenwanderung der untersuchten Strukturen

Aufgrund der Bedeutung des push-pull-Systems werden hier die Atompolarisationen der untersuchten Grundgerüste zusammen in einer Übersicht gezeigt.

Tabelle 4.13: Vergleich der Elektronenbewegung bei den 4-Hydroxypyronen

	Polarisation der Atome					
	O ₂	C ₂	C ₃	C ₄	O ₄	H ₄
Tipranavir	-0,17	0,07	-0,14	0,12	0,01	0,15
Tipranavir mit invertiertem Sulfonamid	-0,14	0,05	-0,12	0,12	-0,03	0,14
Monohydroxy-Tipranavir	-0,14	0,03	-0,14	0,14	-0,03	0,15
Dihydroxy-Tipranavir	-0,13	0,04	-0,15	0,14	-0,03	0,15

Die Polarisation entspricht der Differenz der mittleren Elementarladungen der Atome im Vakuum und Enzym, berechnet in QM/MM-MD-Simulationen über 10 ps. Die Atomnummerierung kann den Abbildungen in den jeweiligen Kapiteln entnommen werden.

In Tabelle 4.13 ist die Polarisierung von Atomen des Ringsystems der untersuchten 4-Hydroxypyronen angegeben. Ausgewählt sind Atome, die an der Elektronenbewegung vom Wasserstoffatom zum Sauerstoff beteiligt sind und zur Verstärkung der elektrostatischen Wechselwirkungen führen. Die alternierende Zu- und Abnahme der Polarisation verdeutlicht den bei allen Liganden auftretenden Effekt. Dabei sind die auftretenden Unterschiede gering.

Die Werte in Tabelle 4.14 bestätigen die erfolgreiche Implementierung eines push-pull-Systems bei den Derivaten der zyklischen Harnstoffe. Insbesondere im Vergleich zum Mozenavir, das kein konjugiertes π -System besitzt, zeigt sich, dass es nur beim Mozenavir- und A98881-Derivat zu einer Elektronenbewegung über das gesamte π -System kommt. Folglich können nur die modifizierten Ringsysteme Wechselwirkungen zwischen Asp25/25' und Ile50/50' vermitteln.

Tabelle 4.14: Vergleich der Elektronenbewegung bei Derivaten der zyklischen Harnstoffe

	Polarisation der Atome							
	O₁	C₁	C₂/N₂	C₃	C₄	C₅	O₅	H₅
Mozenavir	-0,10	0,02	-0,01	-0,02	0,05	0,03	-0,07	0,10
Mozenavir-Derivat	-0,08	0,03	-0,09	0,06	-0,05	0,08	-0,06	0,14
A98881-Derivat	-0,14	0,05	-0,10	0,07	-0,05	0,06	-0,03	0,13

Die Polarisation entspricht der Differenz der mittleren Elementarladungen der Atome im Vakuum und Enzym, berechnet in QM/MM-MD-Simulationen über 10 ps. Die Atomnummerierung kann den Abbildungen im jeweiligen Kapitel entnommen werden.

4.6 Abschätzung von Bindungsaffinitäten

Im Kapitel 4.2 wurde die detaillierte Berechnung von relativen Bindungsaffinitäten mit Hilfe der FEP-Methode beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass es unter Verwendung eines komplexen Verfahrens möglich ist, Bindungsenergieunterschiede zwischen ähnlichen Verbindungen zu ermitteln. Die Methode ist aufgrund des immensen Rechenaufwands und der Anwendungsbeschränkung auf sich nur geringfügig unterscheidende Strukturen nicht geeignet, die Bindungsaffinitäten der in Kapitel 4.4 untersuchten hoch affinen Inhibitoren zu bestimmen. Eine Möglichkeit bieten aber *Quantitative Structure-Activity Relationship*¹-(QSAR)-Methoden, die mit Hilfe von verschiedenen Deskriptoren eine Beziehung zwischen den Strukturen der Verbindungen und ihrer Aktivität herstellen. Obwohl diese Verfahren extrem nützlich sein können, ist es gleichzeitig wünschenswert und auch notwendig, bei der Berechnung von Bindungsaffinitäten u.a. auch die im Verlauf der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes auftretenden Konformationsänderungen durch die explizite Behandlung von Ligand, Protein und wässriger Umgebung zu berücksichtigen [139]. Aus diesem Grund sind MD-Simulationen zur genaueren Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen und zur quantitativen Abschätzung von chemischen und pharmakologischen Eigenschaften gut geeignet. Einen guten Kompromiss zwischen aufwändigen FEP- und QSAR-Methoden bilden Alternativen zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten, die auf der *Linear Response Theory* basieren [140]. Üblicherweise werden in diesen Ansätzen kraftfeldbasierte Energiefunktionen zur Beschreibung von Protein-Ligand- und Ligand-Solvent-Wechselwirkungen verwendet [139][141][142].

Die von Åquist et al. entwickelte *Linear Interaction Energy Method* [142][143] ermöglicht es, anhand von MD-Simulationen eines Liganden in gebundenem und solvatisiertem Zustand Bindungsaffinitäten zu berechnen. Sie diene als Anregung für eine Korrelationsanalyse von relativen Wechselwirkungsenergien mit den Bindungsaffinitäten von Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir. Die dabei angewendete Methode ermöglicht die Zerlegung der Interaktionen in Beiträge aus hydrophoben und permanenten elektrostatischen Wechselwirkungen sowie Polarisierungseffekten (s. Kapitel 3.4). Die Ergebnisse der QM/MM-MD-Simulationen für die drei Inhibitoren im Komplex mit der HIV-1 Protease wurden

¹ quantitative structure-activity relationship (engl.): quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen

bereits in Kapitel 4.4.2.1 präsentiert. Zur Vergrößerung der Datenbasis wurden zusätzlich drei weitere Hemmstoffe ausgewählt (s. Abbildung 4.35).

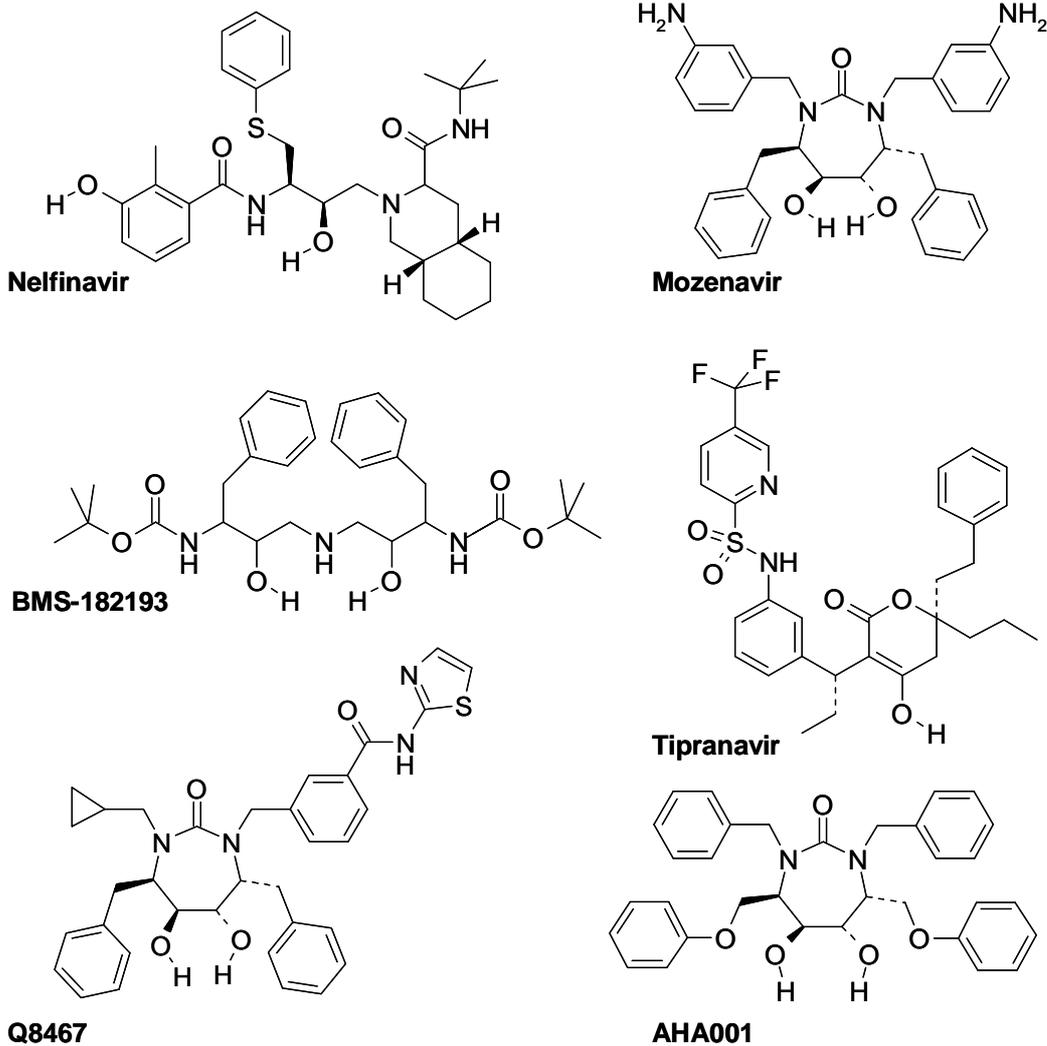


Abbildung 4.35: Ausgewählte HIV-1 PR-Inhibitoren zur Korrelationsanalyse von relativen Wechselwirkungsenergien und Bindungsaffinitäten.

Zusammen mit den zuvor untersuchten Substanzen bilden die sechs Inhibitoren zwar nur eine kleine Auswahl an Hemmstoffen der HIV-1 Protease, weisen aber eine unverkennbare strukturelle Diversität auf. Insbesondere die Wechselwirkungen des symmetrischen BMS-182193 sind aufgrund des von Hydroxylgruppen eingeschlossenen sekundären Amins nicht direkt offensichtlich. Daher zeigt Abbildung 4.37 den Bindungsmodus dieser Verbindung im aktiven Zentrum.

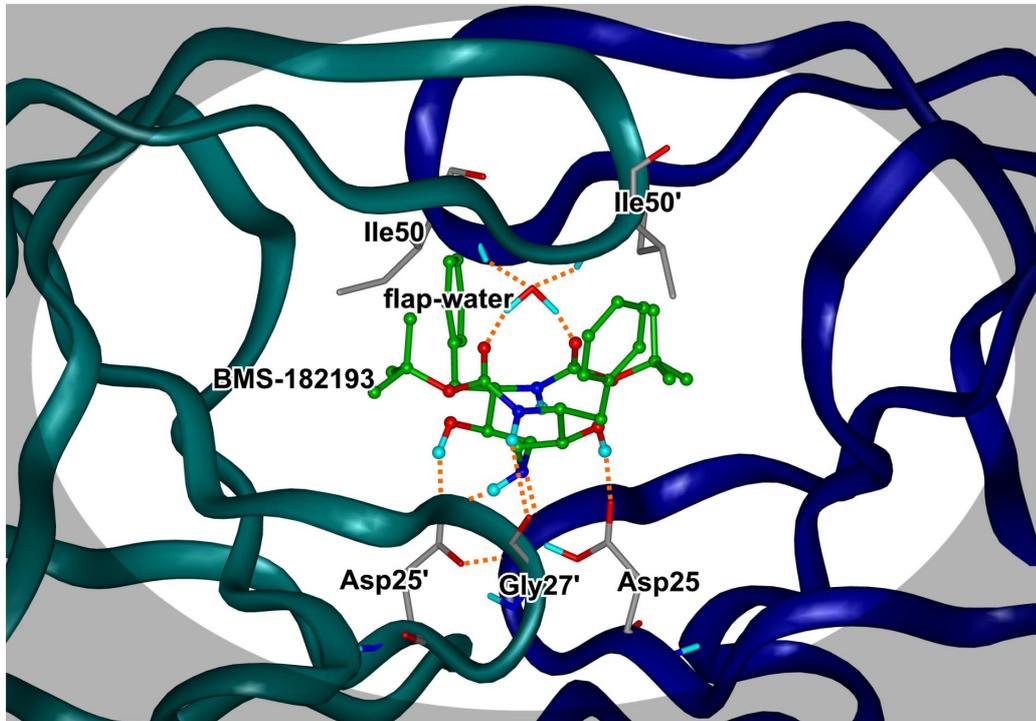


Abbildung 4.36: Bindungsmodus des BMS-182193 in der HIV-1 Protease.

Es ist zu sehen, dass alle drei genannten Wasserstoffbrückendonatoren mit Asp25/25' in Wechselwirkung treten. Des Weiteren liegt wie beim Nelfinavir das *flap-water* im aktiven Zentrum vor, um die Interaktionen der Sauerstoffatome mit Ile50/50' zu vermitteln. Zusätzlich besteht noch ein direkter Kontakt zwischen dem Wasserstoffatom eines Carbaminsäureesters und Gly27'.

In Tabelle 4.15 sind die experimentell ermittelten Inhibitionskonstanten der sechs Verbindungen aufgeführt. Die Reihenfolge entspricht der zunehmenden Hemmwirkung auf die HIV-1 Protease. Die Inhibitionskonstanten unterscheiden sich jeweils um ca. eine Zehnerpotenz.

Tabelle 4.15: Inhibitionskonstanten der ausgewählten Inhibitoren

Name	K _i [nM]	Referenz
BMS-182193	100	[144]
AHA001	12,2	[146]
Nelfinavir	2,0	[58]
Mozenavir	0,34	[131]
Q8467	0,058	[131]
Tipranavir	0,008	[132]

Zur Bestimmung der relativen Wechselwirkungsenergien wurden zunächst mit den neuen Verbindungen BMS-182193, AHA001 und Q8467 QM/MM-MD-Simulationen im Komplex mit der HIV-1 Protease durchgeführt. Als Startpunkte dienten jeweils die Koordinaten der Kristallstrukturen (PDB-Code mit Auflösung: 1ODW mit 2,1 Å [144], 1AJX mit 2,0 Å [146], 1QBU mit 1,8 Å [131]). Die Liganden wurden vollständig quantenmechanisch, die Umgebung aus Protein und Wasserhülle molekularmechanisch behandelt. Die MD-Simulationen wurden analog zu den Untersuchungen in Kapitel 4.4.1 durchgeführt, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

Die Ermittlung der detaillierten Wechselwirkungsenergien wurde bei allen sechs Inhibitoren auf 50 ps ausgedehnt, um für die Korrelationsanalyse repräsentativere Mittelwerte zu erhalten.

Die Analyse der MD-Simulationen ergibt die in Tabelle 4.16 zusammengestellten Ergebnisse. Die präsentierten Daten stehen nicht in direkter Beziehung zu den Bindungsaffinitäten der Inhibitoren. Die Ergebnisse der neuen Verbindungen sind mit den vorherigen Werten vergleichbar und zeigen keine besonderen Auffälligkeiten.

Tabelle 4.16: Interaktionen der Liganden mit der HIV-1 Protease

Name	Wechselwirkungsenergien (kcal/mol)		
	ΔE_{perm}	ΔE_{pol}	ΔE_{Disp}
BMS-182193	-31,8 ± 1,5	-18,0 ± 0,6	-56,2 ± 1,2
AHA001	-29,4 ± 0,5	-16,0 ± 0,3	-55,5 ± 0,9
Nelfinavir	-45,8 ± 0,8	-21,8 ± 0,2	-62,4 ± 0,7
Mozenavir	-23,7 ± 0,7	-15,9 ± 0,1	-57,4 ± 0,8
Q8467	-27,8 ± 1,3	-13,4 ± 0,3	-59,8 ± 1,0
Tipranavir	-39,1 ± 1,2	-23,2 ± 0,2	-67,3 ± 1,2

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus QM/MM-MD-Simulationen der Enzym-Ligand-Komplexe über 50 ps.

Für eine Korrelationsanalyse mit Bindungsdaten muss zusätzlich die Solvation der Liganden berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck wurden sechs Simulationen durchgeführt, in denen sich die Liganden im Zentrum einer Wassersphäre mit einem Radius von 25 Å befinden. Das verwendete Protokoll zur Durchführung der Moleküldynamiken entspricht dem der Simulationen im

Komplex mit der Protease (s. Kapitel 4.4.1). Zuvor wurden alle Aminosäuren sowie Kristallwassermoleküle gelöscht und die Startkonformation der Liganden aus den Kristallstrukturen übernommen. Nach Addition der Wasserhülle und Entfernung überlappender Atome enthielt jedes System ca. 1960 Wassermoleküle.

Im Anschluss an die Systemequilibration wurde eine Polarisationsanalyse durchgeführt. Sie gibt die Interaktionen mit der wässrigen Umgebung wieder. Die Polarisation der Liganden ist bei diesen Untersuchungen auf den Wechsel vom Vakuum zur wässrigen Umgebung zurückzuführen (s. Tabelle 4.17).

Tabelle 4.17: Interaktionen der Liganden mit der Wasserphase

Name	Wechselwirkungsenergien (kcal/mol)		
	ΔE_{perm}	ΔE_{pol}	ΔE_{Disp}
BMS-182193	-35,6 ± 3,1	-14,1 ± 0,8	-35,5 ± 1,1
AHA001	-19,2 ± 1,7	-16,9 ± 1,0	-26,2 ± 1,3
Nelfinavir	-23,3 ± 1,1	-9,9 ± 0,2	-28,1 ± 1,4
Mozenavir	-13,9 ± 0,7	-9,1 ± 0,2	-23,1 ± 1,2
Q8467	-46,5 ± 1,2	-26,2 ± 1,4	-33,5 ± 0,9
Tipranavir	-43,8 ± 2,0	-13,2 ± 0,3	-34,8 ± 0,8

Angegeben sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus QM/MM-MD-Simulationen der Liganden in wässriger Umgebung über 50 ps.

Im Vergleich zu den Interaktionen mit dem Enzym (s. Tabelle 4.16) fällt auf, dass sich bei allen Liganden die hydrophoben Wechselwirkungen deutlich verringert haben. Bei AHA001, Mozenavir und Nelfinavir liegen sie sogar um mehr als 50% unter den Werten der Enzym-Ligand-Komplexe. Die Ergebnisse entsprechen grundsätzlich den Erwartungen und verdeutlichen wiederum den hydrophoben Charakter des aktiven Zentrums der HIV-1 Protease. Die permanenten elektrostatischen Wechselwirkungen zeigen keine klare Tendenz. Die Interaktionen der Liganden AHA001, Nelfinavir und Mozenavir sind mehr als 30% niedrigerer, hingegen kommt es bei BMS-182193, Q8467 und Tipranavir sogar zu einer Steigerung der Werte. Ähnlich verhält es sich bei den Polarisierungseffekten. Sie liegen bei BMS-182193, Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir in wässriger Umgebung zwischen 20% und 55% unter denen im Enzym. Hingegen werden AHA001 und Q8467 durch die Wassermoleküle stärker als durch das Enzym polarisiert.

Aus den Daten lassen sich die relativen Wechselwirkungsenergien ($\Delta\Delta E$) errechnen. Sie stellen die Differenz aus den Interaktionen im gebundenen und solvatisierten Zustand dar (s. Tabelle 4.18).

Zur Vorbereitung der Korrelationsanalyse wurden die experimentell ermittelten Inhibitionskonstanten mit Hilfe der Gleichung (3.13) in relative freie Bindungsenthalpien umgerechnet. Die eingesetzte Temperatur entspricht den Simulationsbedingungen und beträgt 298 K.

Bei der Untersuchung einer Korrelation zwischen den relativen Wechselwirkungsenergien und den experimentell bestimmten relativen freien Bindungsenthalpien muss berücksichtigt werden, dass ΔG genau genommen von ΔH und ΔS abhängig ist. Wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, kann unter der Annahme einer vernachlässigbaren Volumenänderung auch die Änderung der inneren Energie ΔE anstelle von ΔH eingesetzt werden. Allerdings bleiben die Entropieeffekte bei den hier vorgestellten Untersuchungen unberücksichtigt. Man kann jedoch annehmen, dass sie sich bei AHA001, Mozenavir, Q8467 und Tipranavir nur geringfügig unterscheiden, da diese Inhibitoren im aktiven Zentrum unter Verdrängung des *flap-water* binden. BMS-182193 und Nelfinavir benötigen hingegen dieses zusätzliche Wassermolekül, welches daher etwas stärker abweichende Entropieeffekte bewirken könnte. Eine genaue Quantifizierung der Entropieänderungen ist mit den hier angewandten Methoden nicht möglich und stellt auch allgemein ein Problem von theoretischen Untersuchungen zu Bindungsaffinitäten dar. Insofern werden bei der folgenden Korrelationsanalyse die Unterschiede von ΔS vernachlässigt.

Tabelle 4.18: Ausgangsdaten für die Korrelationsanalyse (kcal/mol)

Name	relative Wechselwirkungsenergien			rel. Bindungs- enthalpie
	$\Delta\Delta E_{perm}$	$\Delta\Delta E_{pol}$	$\Delta\Delta E_{Disp}$	ΔG_{exp}
BMS-182193	3,8	-3,9	-20,7	-9,5
AHA001	-10,2	0,9	-29,3	-10,8
Nelfinavir	-22,5	-11,9	-34,3	-11,8
Mozenavir	-9,8	-6,8	-34,3	-12,9
Q8467	18,7	12,8	-26,3	-13,9
Tipranavir	4,7	-10,0	-32,5	-15,1

Die in Tabelle 4.18 angegebenen Daten wurden in einer multiplen linearen Regression analysiert. Die gesuchte Funktion sollte einer Geraden der Gleichung (4.4) entsprechen, das heißt, dass bei einer Bindungsenthalpie von Null auch keine Wechselwirkungsenergiedifferenzen vorliegen.

$$\Delta G_{\text{exp}} = m_1 \Delta \Delta E_{\text{perm}} + m_2 \Delta \Delta E_{\text{pol}} + m_3 \Delta \Delta E_{\text{Disp}} \quad (4.4)$$

m_x : Koeffizienten der Geradengleichung

Tabelle 4.19: Koeffizienten der relativen Wechselwirkungsenergien

m_1	m_2	m_3
$-0,16 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,00$

Angegeben sind die Koeffizienten der Geradengleichung und deren Standardabweichungen als Ergebnis der linearen Regressionsanalyse.

Tabelle 4.19 präsentiert die Ergebnisse der multiplen linearen Regression. Es sind die Koeffizienten der Geradengleichung angegeben. Sie können auch als Wichtungsfaktoren der einzelnen Energieterme betrachtet werden. Das bedeutet, dass $\Delta \Delta E_{\text{Disp}}$ den größten Einfluss bei der Berechnung der Bindungsaffinität besitzt. Weiterhin ist festzustellen, dass stärkere Polarisierungseffekte im Enzym zu einer wenn auch kleinen Steigerung der Ligandenbindung beitragen. Die Polarisierung hat wie erwartet einen positiven Effekt.

Beim Koeffizienten von $\Delta \Delta E_{\text{perm}}$ zeigt sich ein anderer Zusammenhang. Während des Bindungsprozesses bewegen sich die Verbindungen aus einer hydrophilen Umgebung ins lipophile aktive Zentrum. Permanente Dipole verlieren dabei ihre günstigen Wechselwirkungen mit der Hydrathülle. Bei der Komplexbildung mit der HIV-1 Protease entstehen zwar spezifische elektrostatische Kontakte, sie können aber in Abhängigkeit von der Struktur der Substanzen geringer als in einer polaren Umgebung außerhalb des Enzyms sein. Aufgrund der Eigenschaften des aktiven Zentrums der Protease ergibt sich für den Koeffizienten $\Delta \Delta E_{\text{perm}}$ ein negatives Vorzeichen. Daraus lässt sich ableiten, dass Verbindungen eine sehr hohe Bindungsaffinität aufweisen können, obwohl sie im aktiven Zentrum im Vergleich zur wässrigen Umgebung

geringere permanente elektrostatische Wechselwirkungen besitzen. Dieser für die Bindung an sich negative Effekt wird jedoch durch den deutlichen Zugewinn an dispersiven Wechselwirkungen ausgeglichen, sodass insgesamt eine effektive Inhibition des Enzyms erfolgt. Die Strukturelemente, die permanenten Dipolcharakter besitzen, sind im Übrigen notwendig, um die Löslichkeit der ansonsten sehr lipophilen Inhibitoren in physiologischer Umgebung zu gewährleisten.

Die grafische Darstellung der experimentellen und berechneten Daten ist in Abbildung 4.37 zu sehen.

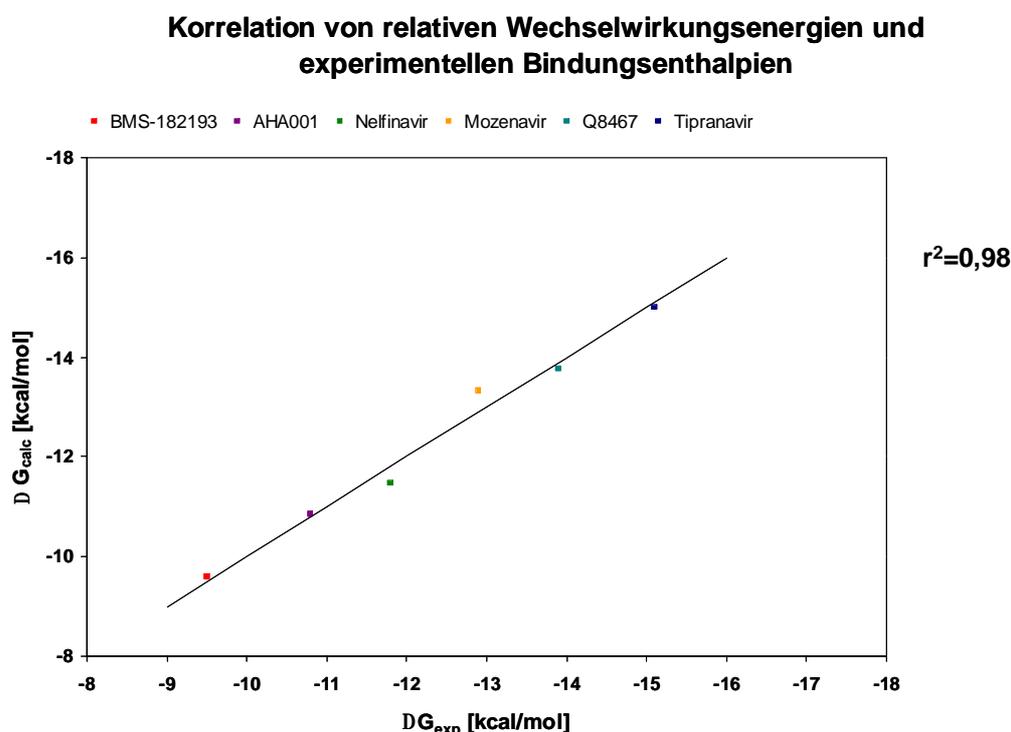


Abbildung 4.37: Grafische Darstellung der Korrelationsanalyse zur Bindungsaffinität ausgewählter HIV-1 Protease-Inhibitoren. Die Linie entspricht der Funktion $y=x$ und zeigt den idealen Verlauf der Werte.

Die vorgestellte Korrelationsanalyse ist mit einem Bestimmtheitsmaß r^2 von 0,98 hervorragend dazu geeignet, die Beziehung zwischen den experimentellen und berechneten Werten wiederzugeben. Zur Überprüfung der Regressionsanalyse wurde ein F -Test¹ durchgeführt. Der berechnete F -Wert beträgt 63,7. Da dieser Wert über dem kritischen F -Wert von 9,28 liegt, ist das gefundene Regressionsmodell für die untersuchten Daten geeignet.

¹ F -Test: statistische Methode zur Überprüfung, ob die Ergebnisse der Regressionsanalyse zufällig sind oder nicht.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden erstmalig explizite Polarisierungseffekte bei der Abschätzung von Bindungsaffinitäten beachtet. Um den Vorteil der getrennten Wichtung von $\Delta\Delta E_{perm}$ und $\Delta\Delta E_{pol}$ beurteilen zu können, wurde auch die Korrelation der summierten elektrostatischen ($\Delta\Delta E_{perm} + \Delta\Delta E_{pol}$) und der dispersiven ($\Delta\Delta E_{Disp}$) Wechselwirkungen untersucht. Anhand des ermittelten Bestimmtheitsmaßes von 0,81 lässt sich erkennen, dass die explizite Berücksichtigung der Polarisierung zu einer Feinjustierung der Ergebnisse führt, wie die Steigerung von r^2 auf 0,98 zeigt.

Aufgrund des kleinen Datensatzes von nur sechs Verbindungen wird auf weitere statistische Untersuchungen verzichtet. Die vorgestellte Korrelation erhebt nicht den Anspruch, für generelle Vorhersagen von experimentellen Bindungsaffinitäten geeignet zu sein. Sie bestätigt jedoch, dass die in den QM/MM-MD-Simulationen ermittelten Daten in Beziehung zu den Bindungsaffinitäten stehen und wertvolle Aussagen zu Bindungseigenschaften ermöglichen. Daher sollte an einem Beispiel exemplarisch überprüft werden, ob für eine der modifizierten Strukturen auch eine günstige Affinität vorhergesagt werden kann. Aufgrund des Rechenaufwands wurde zu diesem Zweck nur das Dihydroxy-Derivat des Tipranavir (s. Kapitel 4.5.2.2) ausgewählt.

Zur Abschätzung der Bindungsaffinität wurde die Bestimmung der Wechselwirkungsenergien im Enzym auf 50 ps ausgedehnt und zusätzlich eine QM/MM-MD-Simulation des Diols in Wasser durchgeführt, um die Solvatationseffekte analog zu den anderen sechs Inhibitoren zu bestimmen. Aus den Ergebnissen dieser beiden Untersuchungen ergeben sich die in Tabelle 4.20 dargestellten relativen Wechselwirkungsenergien.

Tabelle 4.20: Relative Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) des Dihydroxy-Tipranavir

Name	relative Wechselwirkungsenergien		
	$\Delta\Delta E_{perm}$	$\Delta\Delta E_{pol}$	$\Delta\Delta E_{Disp}$
Dihydroxy-Tipranavir	-24,3	-3,4	-32,2

Ein Vergleich mit den Ergebnissen des Tipranavir zeigt, dass $\Delta\Delta E_{Disp}$ dem Wert des Tipranavir in etwa entspricht, da die Unterschiede der hydrophoben Interaktionen zwischen der gebundenen und ungebundenen Form sich um den nahezu gleichen Betrag verringern. Bei der Polarisierung zeigt sich insbesondere durch verringerte Effekte des Diols im Enzym eine geringere Differenz zwischen Enzym- und Wasserumgebung, die aber aufgrund des relativ kleinen

Koeffizienten nur einen geringen Einfluss auf die Abschätzung der Bindungsaffinität besitzt.

Der größte Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Verbindungen besteht bei den permanenten elektrostatischen Wechselwirkungsenergien. Im Protein-Ligand-Komplex besitzt das Dihydroxy-Derivat um ca. 25% stärkere Interaktionen als das Tipranavir. Hingegen übertrifft das Tipranavir in wässrigem Milieu das Diol deutlich (-43,7 versus -25,5 kcal/mol), wodurch sich ein gravierender Unterschied der relativen permanenten elektrostatischen Wechselwirkungsenergien ergibt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das Regressionsmodell - insbesondere aufgrund des kleinen Datensatzes - nur zur groben Abschätzung von Bindungsaffinitäten geeignet ist, lässt sich für das Dihydroxy-Derivat eine Bindungsaffinität von 10,1 kcal/mol vorhersagen.

Dieses insgesamt relativ ungünstige Ergebnis kann u.a. durch die Diolstruktur erklärt werden. Es zeigt sich, dass es in wässriger Umgebung zur – zumindest zeitweiligen – Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen kommt, wodurch sich die möglichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Umgebung im Vergleich zum Tipranavir deutlich verringern, wo derartige Effekte nicht auftreten können. Des Weiteren ist festzustellen, dass die Wassermoleküle wesentlich stärker mit den Sauerstoffatomen der Sulfonamidstruktur als mit den beiden Hydroxylgruppen interagieren und sich daraus eine bessere Solvatation ergibt.

Als Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es beim strukturbasierten Design von neuen Substanzen nicht allein auf die Verbesserung von Effekten im aktiven Zentrum ankommt, sondern auch die sich daraus ergebenden Veränderungen der Solvatation zu berücksichtigen sind.

5 DISKUSSION

5.1 Protonierung der katalytischen Dyade

Zur Untersuchung von Bindungseigenschaften verschiedener Liganden der HIV-1 Protease wurde zunächst der Protonierungsgrad der katalytischen Dyade bestehend aus Asp25/25' analysiert. Unter physiologischen Bedingungen sind die Seitenketten-Carboxylatgruppen von Asparaginsäuren gewöhnlich deprotoniert. Folglich ist zunächst anzunehmen, dass Asp25 und Asp25' in geladener Form vorliegen. Dagegen spricht jedoch u.a. die räumliche Anordnung der beiden Aminosäuren an der Schnittstelle der identischen Monomere, die eine gegenseitige Beeinflussung wahrscheinlich macht. Es besteht die Möglichkeit, dass das Proton eines protonierten Asp25 durch eine Wasserstoffbrückenbindung zum deprotonierten Asp25' stabilisiert wird. Dieser Zustand ist auch Voraussetzung für den bei der Substratspaltung angenommenen Reaktionsmechanismus, der eine Gemeinsamkeit aller Aspartylproteasen darstellt.

In zwei MD-Simulationen der Protease mit Nelfinavir als Ligand wurden die mono- und die unprotonierte Dyade untersucht. Die Analyse der RMSD-Werte bestätigte, dass auch im Enzym-Ligand-Komplex eine Asparaginsäure neben einem Aspartat vorliegt. Zu diesem Ergebnis kamen auch frühere NMR-Untersuchungen [122][123]. Ebenso wurde in anderen theoretischen Studien die Protonierung evaluiert und die monoprotionierte Dyade bestätigt [147].

Für den monoprotionierten Zustand spricht neben der gegenseitigen Beeinflussung auch die hydrophobe Umgebung des aktiven Zentrums. Sie kann zu einer Verringerung der Säurestärke beitragen. Im Übrigen besteht theoretisch auch die Möglichkeit, dass im Virusinneren gegenüber dem physiologischen Milieu ein leicht erniedrigter pH-Wert herrscht und so gewährleistet wird, dass während der Tätigkeit der Protease direkt nach der Virusknospung die monoprotionierte Dyade vorliegt. Einen Anhaltspunkt für diese These geben u.a. Untersuchungen zum pH-Optimum der katalytischen Aktivität, das zwischen pH 5 und 6 liegt [59].

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurde in den folgenden MD-Simulationen im katalytischen Zentrum ein Aspartat und eine Asparaginsäure verwendet.

5.2 Relative Bindungsenthalpie

Die HIV-1 Protease ist ein Enzym, das bereits häufig Gegenstand theoretischer Untersuchungen zur Bindungsaffinität war. Das liegt zum einen an der Vielzahl

von synthetisierten Inhibitoren, deren Strukturen zusammen mit experimentellen Daten frei verfügbar sind und sich somit günstige Bedingungen für die Validierung neuer Methoden bieten. Zum anderen gehört das relativ kleine Enzym bis heute zu den wichtigsten Angriffspunkten im Kampf gegen AIDS und befindet sich daher seit Jahren im Fokus der Forschung.

Zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten wurden verschiedene Ansätze verwendet. Einen Überblick über durchgeführte QSAR-Untersuchungen wurde im letzten Jahr von Kurup et. al. veröffentlicht [148]. Ebenso wurde das Enzym zur Validierung von Docking-Methoden und Scoring-Funktionen genutzt [149][150]. Zu den aufwändigeren Verfahren gehören die Berechnungen von Bindungsenthalpiedifferenzen zwischen Protease-Inhibitoren mittels der FEP-Methodik [151][152]. Sie basieren bisher auf Berechnungen im Kraftfeld. Mit der steigenden Rechenleistung von Prozessoren wurden bei anderen Enzymen auch quantenmechanische Ansätze eingesetzt, die insbesondere in Kombination mit molekularmechanischen Methoden Verwendung finden [153][154].

Am Beispiel von zwei Vorstufen des Nelfinavir wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kombination aus QM/MM-FEP- und MM-TI-Verfahren zur Bestimmung der relativen Bindungsaffinität evaluiert. Die zu diesem Zweck durchgeführten MD-Simulationen ergeben sich aus dem dazu entworfenen erweiterten thermodynamischen Zyklus (s. Abbildung 4.9). Die elektrostatischen Anteile der freien Enthalpieänderungen sind zur Übersicht in Abbildung 5 .1 grafisch dargestellt. Anhand der aufsummierten Kurven kann man allgemein erkennen, dass die elektrostatische Stabilisierung im Protein zu einem etwa doppelt so hohen Enthalpiegewinn führt wie in wässriger Umgebung. Des Weiteren bewirkt der relativ kleine strukturelle Unterschied zwischen Hydroxylfunktion (AG1254) und Nitrogruppe (AG1224) im Enzym einen beachtlichen Bindungsunterschied von 2 kcal/mol allein durch elektrostatische Wechselwirkungen (s. Kapitel 4.3.1). Die Erklärung liegt in den Wechselwirkungen mit der Aminosäure Asp30, die eine sehr feste Wasserstoffbrückenbindung mit der phenolischen Hydroxylgruppe von AG1254 ausbildet. Die sich daraus ergebende Stabilisierung wurde mit Hilfe der Aminosäure-Dekompositionsanalyse für das sehr ähnliche Nelfinavir bestätigt (vgl. Kapitel 4.4.2.2).

Beim AG1224 unterstützt die Nitrogruppe derartige Wechselwirkungen nicht und die ausbleibende Stabilisierung durch Asp30 führt zu einer verringerten Affinität der Verbindung zur Protease. Ein ähnlicher Effekt ist auch beim Tipranavir aufgetreten.

Im Gegensatz dazu wird AG1224 etwas besser solvatisiert. Als Ursache können bessere Wechselwirkungsmöglichkeiten mit den Wassermolekülen angenommen werden.

Bei alleiniger Auswertung der elektrostatischen Interaktionen ergibt sich eine Bindungsenthalpiedifferenz von ca. 3 kcal/mol, die den experimentellen Daten nahe kommt.

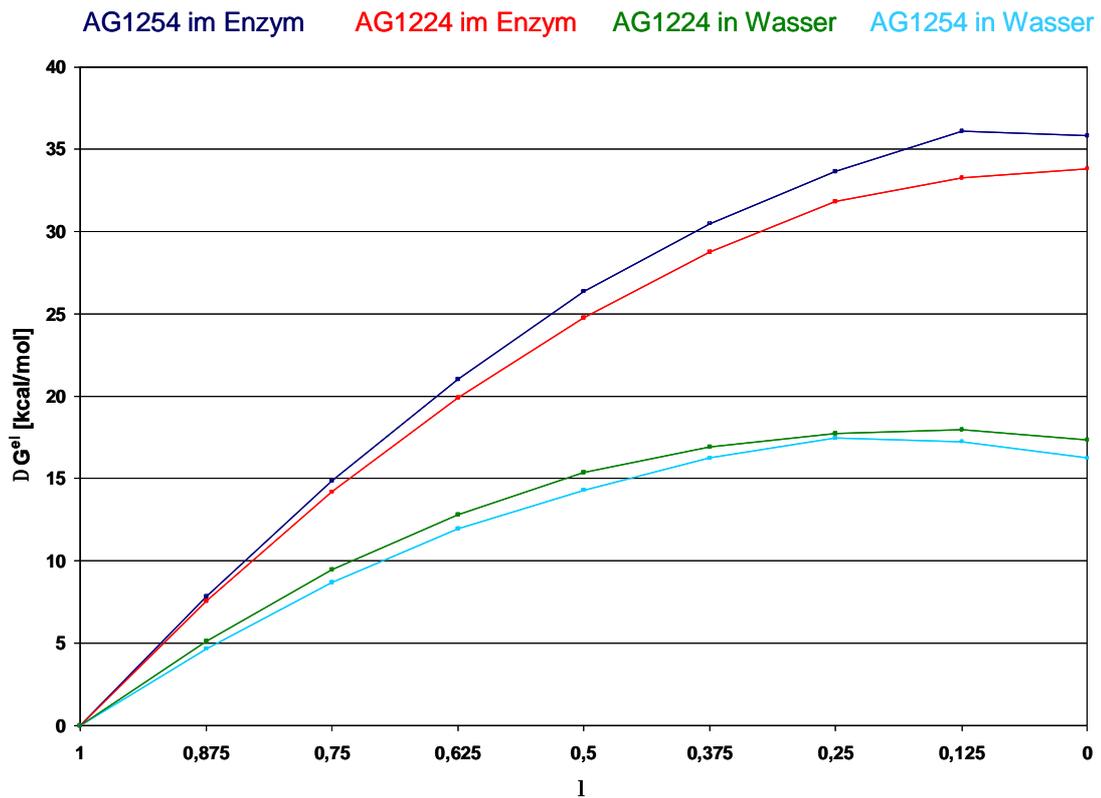


Abbildung 5.1: Summierung von ΔG^{el} in Abhängigkeit von der λ -Änderung.

Bei der Betrachtung der Enthalpieänderung während der Transformationen einer Hydroxylfunktion in eine Nitrogruppe unter alleiniger Berücksichtigung der Dispersionswechselwirkungen zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen der Protein- und der Wasserumgebung (s. Abbildung 5.2). Anhand der Steigung der Kurven ist zu erkennen, dass die Entstehung eines neuen Sauerstoffatoms zu Beginn der Transformation den größten Aufwand darstellt und sich unter den gewählten Bedingungen im Protein und in wässriger Umgebung kaum unterscheidet.

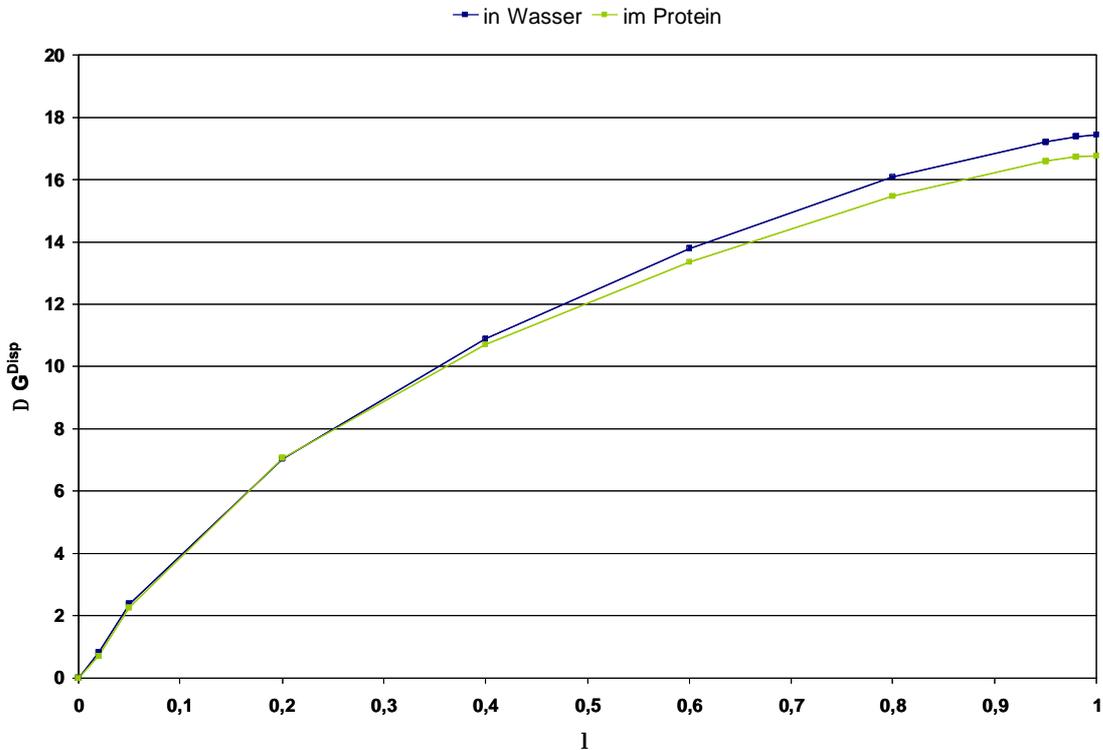


Abbildung 5.2: Summierung von ΔG^{Disp} im Verlauf der Transformationen von AG1254 in AG1224.

Das ermittelte Ergebnis ($\Delta\Delta G = 2,5$ kcal/mol) ist insgesamt mit dem experimentellen Wert ($\Delta\Delta G = 3,1$ kcal/mol) gut vergleichbar. Das angewendete Verfahren ermöglicht es, Bindungsaffinitätsunterschiede aufgrund kleiner molekularer Unterschiede ausreichend genau zu berechnen und erlaubt zusätzlich eine Differenzierung zwischen elektrostatischer und dispersiver Natur der Bindungsunterschiede. Der gewählte Ansatz basiert zudem auf den thermodynamischen Grundlagen. Allerdings sind der rechentechnische Aufwand sowie die Beschränkung auf geringfügige Unterschiede als Kritik anzuführen.

5.3 Polarisierungseffekte der HIV-1 Protease

Zur allgemeineren Untersuchung des aktiven Zentrums und den Eigenschaften verschiedener Enzym-Ligand-Komplexe wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die hoch affinen Inhibitoren Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir untersucht. In MD-Simulationen wurden insbesondere die Interaktionen zwischen dem Enzym und den Liganden analysiert. Die Anwendung einer QM/MM-Methode ermöglichte es, einzelne Komponenten der Wechselwirkungsenergien zu bestimmen. Durch die quantenmechanische Behandlung der Inhibitoren im aktiven Zentrum der HIV-1 Protease konnten hierbei Polarisierungseffekte des Proteins nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ berechnet werden. Die

Ergebnisse der MD-Simulationen zeigen, dass die Polarisation der Liganden einen entscheidenden Beitrag zur Bindung im aktiven Zentrum leistet und bis zu 18% zu den Gesamtwechselwirkungen beiträgt. Eine wichtige Erkenntnis daraus ist, dass die Verwendung von festen Ladungsmodellen unrealistische Wechselwirkungsenergien ergeben würde und die explizite Berücksichtigung von Polarisierungseffekten u.a. für die Vorhersage von Bindungsaffinitäten zu empfehlen ist. Dies wurde bei der Bestimmung der relativen Bindungsenthalpie durch die quantenmechanische Behandlung der Inhibitoren in den QM/MM-MD-Simulationen entsprechend berücksichtigt.

Ein weiterer Vorteil derartiger Verfahren ist die generelle Anwendbarkeit für jede Struktur ohne vorherige Parametrisierung, wie es üblicherweise bei empirischen Methoden notwendig ist. Daher besteht auf einfache Weise die Möglichkeit, die Wechselwirkungsenergien einer größeren Anzahl von Verbindungen zu untersuchen. Die Anwendung eines semiempirischen QM-Modells erlaubt unter den gegebenen technischen Voraussetzungen - wie in dieser Arbeit gezeigt - sogar die Untersuchung von größeren Liganden. Die Genauigkeit von AM1 zur Ermittlung von Polarisierungseffekten und Wechselwirkungsenergien ist für die hier durchgeführten Untersuchungen ausreichend. Die Vergleichbarkeit mit *ab initio* Ergebnissen wurde schon mehrfach beschrieben [119][129][130][134][136] und die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen die Anwendbarkeit der QM/MM-Methode bei der Ermittlung von Enzym-Ligand-Wechselwirkungen und der Berechnung von relativen Bindungsenthalpien. Schwächen der semiempirischen Methode bestehen aber bei der Untersuchung von geladenen Verbindungen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nur neutrale Strukturen zur Untersuchung herangezogen.

Mit Hilfe der Aminosäure-Dekompositionsanalyse konnten einzelne Aminosäuren als bedeutende Wechselwirkungspartner für Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir ermittelt werden. Hierbei zeigt sich, dass das deprotonierte Asp25' den mit Abstand größten stabilisierenden Effekt auf die Liganden besitzt. Dies ist ein Beweis dafür, dass die Imitation des Übergangszustands mit Hilfe einer Hydroxylgruppe hervorragend funktioniert. Ebenso spielen auch Ile50 und Ile50' eine wichtige Rolle bei der Bindung der Liganden. Dabei ist festzustellen, dass die direkte Stabilisierung des Mozenavir (10,9 kcal/mol) und insbesondere des Tipranavir (15,2 kcal/mol) höher als beim Nelfinavir (10,5 kcal/mol) ist. Folglich ergibt sich für die beiden Verbindungen neben dem entropischen auch ein energetischer Vorteil gegenüber dem Nelfinavir, das zur Bindung ein zusätzliches Wassermolekül benötigt. Als Konsequenz lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass bei der Entwicklung neuer Verbindungen

der Schwerpunkt auf Grundgerüste gelegt werden sollte, die direkte Wechselwirkungen mit Ile50/50' ermöglichen. Ein weiterer positiver Aspekt dieser Strukturen könnte eine mögliche Verringerung von Nebenwirkungen an körpereigenen Aspartylproteasen sein, welche die bisher therapeutisch eingesetzten Substanzen häufig auslösen [41]. So ist z.B. im aktiven Zentrum von Pepsin zu wenig Raum für die Bindung der größeren Grundgerüste vorhanden.

Interessant ist auch der gegensätzliche Effekt von Asp30 auf Nelfinavir und Tipranavir. Der Energiegewinn der stabilen Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp30 und Nelfinavir verdeutlicht das Potenzial dieser Aminosäure. Der negative Einfluss von Asp30 auf Tipranavir war der Auslöser für den Entwurf von Derivaten in dieser Arbeit.

Die Mulliken-Populationsanalyse wurde zur Bestimmung der Partialladungen der Inhibitoren im Vakuum sowie im Komplex mit dem Enzym verwendet. Die Ergebnisse verdeutlichen allgemein, dass Atome, die mit der katalytischen Dyade und den gegenüberliegenden Ile50/50' interagieren, am stärksten polarisiert werden.

Die Auswertung der atomaren Polarisierung in Verbindung mit der Aminosäure-Dekompositionsanalyse offenbart, dass das 4-Hydroxy-Dihydropyron des Tipranavir ein sehr günstiges Strukturelement darstellt, das die Polarisierbarkeit der Verbindung erhöht. Anhand der Resultate der atomaren Polarisierung kann auf die Ausbildung eines push-pull-Mechanismus geschlossen werden, wodurch sich die Elektronendichte am Carbonylsauerstoff, der mit Ile50/50' in Kontakt steht, erhöht. Am Wasserstoffatom der aktivierten Hydroxylgruppe, die mit Asp25' interagiert, kommt es hingegen zu einer Verringerung der Elektronendichte und es ergibt sich eine effiziente Elektronendelokalisation über das gesamte konjugierte π -System. Als Folge wird Tipranavir um etwa 60% stärker durch Asp25' stabilisiert als Nelfinavir und Mozenavir, die beide über aliphatische Hydroxylgruppen Wechselwirkungen ausbilden. Ein bedeutender Vorteil dieser erhöhten Stabilisierung durch Asp25' besteht in dem deutlich verringerten Risiko eines möglichen Wirkverlusts durch auftretende Mutationen. Durch intensivere Wechselwirkungen mit dem katalytischen Zentrum verringert sich die Bedeutung von Interaktionen mit anderen Aminosäuren des aktiven Zentrums, die evtl. häufiger von Mutationen betroffen sind. Zwar kann grundsätzlich auch die katalytische Dyade mutieren, dies würde jedoch zum sofortigen Funktionsverlust des Enzyms und damit zu nicht mehr replikationsfähigen Viren führen.

5.4 Vorschläge zur Optimierung von Protease-Inhibitoren

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse über die Bindungseigenschaften von Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir wurde nach Möglichkeiten für strukturelle Verbesserungen gesucht. Dabei wurden aufgrund des direkten Bindungsmodus nur Mozenavir und Tipranavir als Vorlage gewählt.

Beim Mozenavir wurden zuerst Veränderungen des Grundgerüsts betrachtet. Die Implementierung eines konjugierten π -Systems im zentralen siebengliedrigen Zyklus führt zu einer ähnlichen Elektronendelokalisation wie beim Tipranavir. Die Einführung der Doppelbindungen machen aus der Keto- und Hydroxylgruppe eine vinyloge Carbonsäure, bei der auch der Protonierungsgrad von Bedeutung ist. Die Analyse von pK_S -Werten¹ vergleichbarer Carbozyklen zeigt, dass eine starke Abhängigkeit von vorhandenen Substituenten besteht und es mit zunehmender Anzahl von Resten zu einem Anstieg kommt [155]-[159]. Die Werte liegen im Bereich von 6,6 bis 9,1. Folglich besteht bei dem vierfach substituierten Ring grundsätzlich die Möglichkeit, dass die protonierte Form im aktiven Zentrum bindet. Das Mozenavir-Derivat besitzt um 5,2 kcal/mol höhere Gesamtwechselwirkungen mit dem Enzym als Mozenavir, auch wenn dies nicht zu einer erhöhten Stabilisierung durch Asp25' führt.

Beim A98881-Derivat wurden zusätzlich zum Grundgerüst des Mozenavir auch noch die Substituenten modifiziert, um eine weitere Verbesserung der Bindungseigenschaften zu erzielen. Wie anhand der Resultate der MD-Simulationen zu sehen ist, kommt es zu einer Steigerung der Wechselwirkungsenergien um mehr als 10 kcal/mol. Auch hier kann die Elektronenwanderung entlang des konjugierten π -Systems beobachtet werden und die Stabilisierung durch Asp25' entspricht dem Niveau des Mozenavir. Folglich kann dieser Strukturentwurf als sinnvolle Verbesserung angesehen werden.

Tipranavir besitzt eine hervorragende Affinität zur HIV-1 Protease. Wie bereits beschrieben, sind dafür insbesondere die Eigenschaften des 4-Hydroxy-Dihydropyron-Grundgerüsts verantwortlich. Veränderungen dieser Teilstruktur sind daher nicht sinnvoll. Allerdings stellt die Destabilisierung durch Asp30 um 6,1 kcal/mol ein Manko der Verbindung dar. Die räumliche Nähe der Seitenketten-Carboxylatgruppe von Asp30 und der Sauerstoffatome des

¹ Die pK_S -Werte wurden mittels der ACD/Labs Software Solaris V4.67 (©1994-2004 ACD/Labs) berechnet.

Sulfonamids sind durch die erhöhte Elektronendichte hierfür verantwortlich. Durch die Invertierung der Sulfonamidgruppe kommt das Wasserstoffatom der Sulfonamidgruppe als Donator günstiger Wechselwirkungen an die vorherige Position des Sauerstoffs und es ergibt sich eine Stabilisierung des Derivats um 3,5 kcal/mol durch Asp30, auch wenn aufgrund des durchschnittlichen Abstands von 4 Å keine Wasserstoffbrückenbindung möglich ist. Das Derivat mit invertierter Sulfonamidgruppe kann anhand der durchgeführten theoretischen Untersuchungen als geeigneter Inhibitor der HIV-1 Protease angesehen werden. Die Substanz besitzt von allen untersuchten Strukturen die stärksten Wechselwirkungen mit dem Enzym.

Die in zwei weiteren QM/MM-MD-Simulationen untersuchten Hydroxy-Derivate bilden im Vergleich zum Derivat mit invertierter Sulfonamidgruppe direkte Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp30 aus. Dadurch zeigt sich besonders beim Monohydroxy-Derivat eine weiter erhöhte Stabilisierung durch diese Aminosäure. Beim Vergleich der Gesamtwechselwirkungsenergien zwischen Enzym und Liganden fällt auf, dass auch das Diol das Tipranavir übertrifft, aber das Monohydroxy-Derivat etwas zurückbleibt. Die eingeführte Methylengruppe führt allerdings zu einem Anstieg der Dispersion.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Strukturmodifikationen neue Richtungen zum Design neuer selektiver und hoch affiner Inhibitoren der HIV-1 Protease aufzeigen.

5.5 Abschätzung von Bindungsaffinitäten

Zur Verdeutlichung der Aussagekraft der mit Hilfe von QM/MM-MD-Simulationen berechneten Wechselwirkungsenergien wurden zusätzlich zu Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir drei weitere Inhibitoren der HIV-1 Protease ausgewählt und ihre Wechselwirkungsenergien mit dem Enzym auf die gleiche Weise bestimmt. Zusätzlich wurden die Verbindungen in wässriger Umgebung untersucht und im Anschluss eine Abschätzung der Bindungsaffinitäten mittels einer Korrelationsanalyse vorgenommen. Dabei wurden die Differenzen der einzelnen Wechselwirkungsenergiekomponenten zwischen dem Protein und der wässrigen Umgebung verwendet. Das Vorgehen orientiert sich an der ursprünglich von Åqist et al. entwickelten *Linear Interaction Energy Method* [142][143]. Es sind mittlerweile verschiedene Publikationen zu Untersuchungen von Inhibitoren der HIV-1 Protease erschienen, die die Möglichkeiten dieses Ansatzes und seiner Varianten aufzeigen [147][160]. Die Methode repräsentiert sowohl rechen-technisch als auch vom theoretischen Ansatz her einen Mittelweg zwischen den erwähnten reinen QSAR-Untersuchungen und der bereits

durchgeführten FEP. In den bisherigen Veröffentlichungen wurden ausschließlich kraftfeldbasierte Ansätze zur Bestimmung der elektrostatischen und dispersiven Wechselwirkungsenergien genutzt. Neben der Einführung von veränderlichen Wichtungsfaktoren wurden auch Variationen vorgestellt, die weitere Parameter wie z.B. die für Wassermoleküle zugängliche Oberfläche berücksichtigen [162].

Im Kontext der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Polarisierungseffekte der HIV-1 Protease als Teil der Wechselwirkungsenergien einbezogen. Zur Korrelationsanalyse standen die relativen elektrostatischen Wechselwirkungsenergien $\Delta\Delta E_{perm}$ und $\Delta\Delta E_{pol}$ sowie die Wechselwirkungsenergiedifferenzen der Dispersion $\Delta\Delta E_{Disp}$ zur Verfügung (s. Tabelle 4.18). Wie anhand der Werte leicht nachzuvollziehen ist, lässt sich keine direkte Korrelation einzelner Komponenten mit der Bindungsaffinität erkennen. Bei Betrachtung der summierten elektrostatischen ($\Delta\Delta E_{perm} + \Delta\Delta E_{pol}$) und der dispersiven Wechselwirkungen ($\Delta\Delta E_{Disp}$) erreicht die Korrelation bereits ein akzeptables Bestimmtheitsmaß r^2 von 0,81. Durch die getrennte Wichtung von $\Delta\Delta E_{perm}$ und $\Delta\Delta E_{pol}$ verbessert sich dieser Wert auf 0,98 und zeigt damit eine hervorragende Übereinstimmung zwischen den berechneten Ergebnissen und den experimentellen Daten.

Anhand der berechneten Wichtungsfaktoren lässt sich erkennen, welchen Einfluss die einzelnen Terme auf die Abschätzung der Bindungsaffinität haben. Den entscheidenden Beitrag zur Bindung der sechs Inhibitoren leistet die Dispersion. Dieses Ergebnis ist aufgrund des lipophilen aktiven Zentrums der HIV-1 Protease gut zu verstehen und wurde auch in früheren Untersuchungen von Zoete et. al. nachgewiesen [147].

Dagegen scheint es zunächst eher unverständlich, dass höhere permanente elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Enzym zu verringerten Bindungsaffinitäten führen. Grundsätzlich gilt, dass stärkere Wechselwirkungen die Basis für eine festere Bindung im Enzym sind. Dennoch wurde auch von Kalra et. al. bei anderen Liganden der Protease ein ähnlicher Effekt für elektrostatische Interaktionen festgestellt [161]. Es muss berücksichtigt werden, dass permanente Dipole im lipophilen aktiven Zentrum im Vergleich zur polaren wässrigen Umgebung ganz allgemein weniger Wechselwirkungsmöglichkeiten besitzen. Dieser Verlust wird aber durch die enorme Steigerung der dispersiven Wechselwirkungen so stark übertroffen, dass die Aktivität der HIV-1 Protease trotzdem effektiv gehemmt wird. Die durch die permanenten Dipole bedingten

Wechselwirkungen sind hingegen für die Löslichkeit in physiologischer Umgebung der ansonsten sehr lipophilen Substanzen essenziell.

Insgesamt muss bei der Analyse natürlich der kleine Datensatz als kritisch angesehen werden. Dennoch ist die strukturelle Diversität der ausgewählten Verbindungen durchaus vergleichbar mit oder sogar größer als bei früheren Untersuchungen [160]-[163].

Als Besonderheit der hier vorgestellten Korrelationsanalyse wurden Polarisationsunterschiede explizit berücksichtigt. Die Regressionsanalyse ergibt, dass eine erhöhte Polarisierung der Liganden im Enzym die Bindungsaffinität steigert. Die Auswirkungen sind allerdings deutlich geringer als bei der Dispersion. Folglich dient die Berücksichtigung der Polarisation letztendlich der Feinjustierung der Ergebnisse, wie die Steigerung des Bestimmtheitsmaßes von 0,81 auf 0,98 bestätigt.

Die exemplarisch durchgeführte Vorhersage der Bindungsaffinität für das Dihydroxy-Derivat des Tipranavir offenbart, insbesondere aufgrund des ernüchternden Ergebnisses, die Bedeutung der Berücksichtigung von Solvatationseffekten beim Entwurf von neuen Strukturen. Erfolgreiche Wirkstoffe sind stets Kompromisslösungen, die sowohl eine hohe Affinität zum aktiven Zentrum als auch günstige Eigenschaften in physiologischer Umgebung besitzen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen die Bindungseigenschaften von Inhibitoren der HIV-1 Protease. Die Hemmung dieses Enzyms stellt eine der essenziellen Behandlungsmethoden dar, die heutzutage im Kampf gegen die erworbene Immunschwächeerkrankung AIDS angewendet werden. Es sind derzeit mehrere Wirkstoffe zur Hemmung der HIV-1 Protease im Einsatz. Im Zuge einer Therapie bilden sich jedoch bei vielen Erkrankten neue Virusvarianten aus, die mutierte Proteasen besitzen. Diese veränderten Enzyme reagieren deutlich weniger empfindlich auf die eingesetzten Substanzen, wodurch es sogar zum vollständigen Therapieversagen kommen kann. Außerdem verursachen die derzeit eingesetzten Protease-Inhibitoren schwere Nebenwirkungen wie z.B. gastrointestinale Störungen, die sich bei neuen Verbindungen verringern lassen könnten. Folglich ist weiterhin die Entwicklung neuer und selektiverer Inhibitoren notwendig.

In Moleküldynamik (MD)-Simulationen wurden unter Anwendung von quantenmechanisch/molekularmechanischen (QM/MM) Hybridmethoden Wechselwirkungsenergien zwischen der HIV-1 Protease und den hoch affinen Inhibitoren Nelfinavir, Mozenavir und Tipranavir bestimmt. Dabei konnten erstmalig Polarisierungseffekte des Enzyms sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden. Mit Hilfe der aminosäurebasierten Analyse der Ligandenstabilisierung und der Bestimmung der atomaren Polarisierung konnte ein push-pull-Mechanismus als Ursache für die exzellente Bindungsaffinität des Tipranavir identifiziert werden.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse wurden Vorschläge für strukturelle Veränderungen gemacht. Die modifizierten Strukturen wurden ebenfalls evaluiert und die Unterschiede aufgezeigt. Neben der erfolgreichen Implementierung eines push-pull-Systems in Derivaten des Mozenavir, konnten auch die Bindungseigenschaften des Tipranavir u.a. durch die Invertierung der Sulfonamidgruppe verbessert werden.

Zur Bestätigung der Aussagekraft der berechneten Wechselwirkungsenergien wurden weitere Liganden zusammen mit den oben erwähnten Inhibitoren in QM/MM-MD-Simulationen sowohl im Protein als auch in wässriger Umgebung untersucht. Die erhaltenen relativen Wechselwirkungsenergien wurden in einer Korrelationsanalyse zur Abschätzung der Bindungsaffinitäten verwendet. Die Ergebnisse zeigen die große Bedeutung der Dispersion für die Bindung in der HIV-1 Protease und bestätigen den positiven Einfluss der berechneten Polarisierungseffekte.

In einem weiteren Ansatz wurde der relative Bindungsenthalpieunterschied zwischen den Inhibitoren AG1254 und AG1224 unter Anwendung eines QM/MM-Verfahrens bestimmt. Dabei konnte dargestellt werden, dass zwar die Dispersion eine entscheidende Rolle bei der Bindung im aktiven Zentrum spielt, aber die unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Protein ursächlich für die relative Bindungsenthalpiedifferenz zwischen den beiden Verbindungen verantwortlich sind.

7 LITERATUR

- [1] Pneumocystis pneumonia—Los Angeles *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* **1981**, 30, 250-252.
- [2] UNAIDS. AIDS Epidemic Update December 2003, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, World Health Organization, Geneva **2003**
- [3] Gottlieb, M.; Schroff, R.; Schlanker, H. M.; Weismann, J. D.; Fan, P. T.; Wolf, R. A.; Saxon, A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305, 1425-1431.
- [4] Clumeck, N.; Mascarot-Lemone, F.; de Maubeuge, J.; Brenez, D.; Marcelis, L. Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans. *Lancet* **1983**, 1, 642.
- [5] Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220, 868-871.
- [6] Popovic, M.; Sarngadharan, M. G.; Read, E.; Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **1984**, 224, 497-500.
- [7] Clavel, F.; Guetard, D.; Brun-Vezinet, F.; Chamaret, S.; Rey, M. A.; Santos-Ferreira, O. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **1986**; 233: 343-346.
- [8] Zhu, T.; Korber, B. T.; Nahmias, A. J.; Hooper, E.; Sharp, P. M.; Ho, D. D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **1998**, 391, 594-597.
- [9] Sharp, P. M.; Bailes, E.; Chaudhuri, R. R.; Rodenburg, C. M.; Santiago, M. O.; Hahn, B. H. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2001**, 356, 867-876.
- [10] Eigen, M. Viral quasispecies. *Sci Am.* **1993**, 269, 42-49.
- [11] Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; Arthur, L. O.; Peeters, M.; Shaw, G. M.; Sharp, P. M.; Hahn, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **1999**, 397, 436-441.
- [12] Hahn, B. H.; Shaw, G. M.; De Cock, K. M.; Sharp, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **2000**, 287, 607-614.
- [13] Gao, F.; Vidal, N.; Li, Y.; Trask, S. A.; Chen, Y.; Kostrikis, L. G.; Ho, D. D.; Kim, J.; Oh, M. D.; Choe, K.; Salminen, M.; Robertson, D. L.; Shaw, G. M.; Hahn, B. H.; Peeters, M. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **2001**, 17, 675-688.
- [14] Hirsch, V. M.; Olmsted, R. A.; Murphey-Corb, M.; Purcell, R. H.; Johnson, P. R. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **1989**, 339, 389-392.
- [15] Gelderblom, H. R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **1991**, 5, 617-637.
- [16] Turner, B. G.; Summers, M. F. Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 1-32.
- [17] Frankel, A. D.; Young, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 1-25.
- [18] Stryer, L. Biochemie, 5. Auflage Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, **1990**

- [19] Clapham, P. R. HIV and chemokines: ligands sharing cell surface receptors. *Trends. Cell. Biol.* **1997**, 7, 264-268.
- [20] Clapham, P. R.; Weiss, R. A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature* **1997**, 388, 230-231.
- [21] Preston, B. D.; Poiesz, B. J.; Loeb, L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **1988**, 242, 1168-1171.
- [22] Perelson, A. S.; Neumann, A. U.; Markowitz, M.; Leonard, J. M.; Ho, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **1996**, 271, 1582-1586.
- [23] Jones, K. A.; Peterlin, B. M. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 717-743.
- [24] Hope, T. J. Viral RNA export. *Chem. Biol.* **1997**, 4, 335-344.
- [25] McCarthy, M. AIDS vaccine fails in Thai trial. *Lancet* **2003**, 362, 1728.
- [26] Semple, M.; Loveday, C.; Weller, I.; Tedder, R. Direct measurement of viraemia in patients infected with HIV-1 and its relationship to disease progression and zidovudine therapy. *J. Med. Virol.* **1991**, 35, 38-45.
- [27] Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U. *Molekulare Virologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford **2003**
- [28] Robbins, B. L.; Srinivas, R. V.; Kim, C.; Bischofberger, N.; Fridland, A. Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1998**, 42, 612-617.
- [29] Tantillo, C.; Ding, J.; Jacobo-Molina, A.; Nanni, R. G.; Boyer, P. L.; Hughes, S. H.; Pauwels, R.; Andries, K.; Janssen, P. A.; Arnold, E. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.* **1994**, 243, 369-87.
- [30] Spence, R. A.; Kati, W. M.; Anderson, K. S.; Johnson, K. A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* **1995**, 267, 988-993.
- [31] Navia, M.A.; Fitzgerald, P. M. D.; McKeever, B. M.; Leu, C. T.; Heimbach, J. C.; Herber, W. K.; Sigal, I. S.; Darke, P. L.; Springe, J. P. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **1989**, 337, 615-620.
- [32] Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B. K.; Baldwin, E.; Weber, I. T.; Selk, L. M.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. B. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **1989**, 245, 616-621.
- [33] Hazuda, D.; Felock, P.; Hastings, J.; Pramanik, B.; Wolfe, A.; Goodarzi, G.; Vora, A.; Brackmann, K.; Grandgenett, D. Equivalent inhibition of half-site and full-site retroviral strand transfer reactions by structurally diverse compounds. *J. Virol.* **1997**, 71, 807-811.
- [34] Gulick, R. M. New antiretroviral drugs. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, 9, 186-193.
- [35] Madani, N.; Perdigoto, A. L.; Srinivasan, K.; Cox, J. M.; Chruma, J. J.; LaLonde, J.; Head, M.; Smith, A. B. 3rd; Sodroski, J. G. Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155. *J. Virol.* **2004**, 78, 3742-3752.

- [36] Trkola, A.; Ketas, T.J.; Nagashima, K. A.; Zhao, L.; Cilliers, T.; Morris, L.; Moore, J. P.; Maddon, P. J.; Olson, W. C. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J. Virol.* **2001**, *75*, 579-588.
- [37] Fujii, N.; Nakashima, H.; Tamamura, H. The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **2003**, *12*, 185-195.
- [38] Lundgren, J. D.; Phillips, A. N.; Pedersen, C.; Clumeck, N.; Gatell, J. M.; Johnson, A. M.; Ledergerber, B.; Vella, S.; Nielsen, J. O. Comparison of long-term prognosis of patients with AIDS treated and not treated with zidovudine. AIDS in Europe Study Group. *JAMA.* **1994**, *271*, 1088-1092.
- [39] Palella, F. J. Jr; Delaney, K. M.; Moorman, A. C.; Loveless, M. O.; Fuhrer, J.; Satten, G. A.; Aschman, D. J.; Holmberg, S. D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 853-860.
- [40] Kakuda, T. N. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin. Ther.* **2000**, *22*, 685-708.
- [41] Nadler, J. New anti-HIV protease inhibitors provide more treatment options. *AIDS Patient Care St.* **2003**, *17*, 551-564.
- [42] Carr, A.; Samaras, K.; Thorisdottir, A.; Kaufmann, G. R.; Chisholm, D. J.; Cooper, D. A. Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study. *Lancet* **1999**, *353*, 2093-2099.
- [43] Perelson, A. S.; Essunger, P.; Cao, Y.; Vesanen, M.; Hurley, A.; Saksela, K.; Markowitz, M.; Ho, D. D. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **1997**, *387*, 188-191.
- [44] Finzi, D.; Blankson, J.; Siliciano, J. D.; Margolick, J. B.; Chadwick, K.; Pierson, T.; Smith, K.; Lisziewicz, J.; Lori, F.; Flexner, C.; Quinn, T. C.; Chaisson, R. E.; Rosenberg, E.; Walker, B.; Gange, S.; Gallant, J.; Siliciano, R. F. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 512-517.
- [45] Lafeuillade, A.; Khiri, H.; Chadapaud, S.; Hittinger, G.; Halfon, P. Persistence of HIV-1 resistance in lymph node mononuclear cell RNA despite effective HAART. *AIDS* **2001**, *15*, 1965-1969.
- [46] Sharkey, M. E.; Teo, I.; Greenough, T.; Sharova, N.; Luzuriaga, K.; Sullivan, J. L.; Bucy, R. P.; Kostrikis, L. G.; Haase, A.; Veryard, C.; Davaro, R. E.; Cheeseman, S. H.; Daly, J. S.; Bova, C.; Ellison, R. T. 3rd; Mady, B.; Lai, K. K.; Moyle, G.; Nelson, M.; Gazzard, B.; Shaunak, S.; Stevenson, M. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 76-81.
- [47] Kulkosky, J.; Nunnari, G.; Otero, M.; Calarota, S.; Dornadula, G.; Zhang, H.; Malin, A.; Sullivan, J.; Xu, Y.; DeSimone, J.; Babinchak, T.; Stern, J.; Cavert, W.; Haase, A.; Pomerantz, R. J. Intensification and stimulation therapy for human immunodeficiency virus type 1 reservoirs in infected persons receiving virally suppressive highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1403-1411.
- [48] Toh, H.; Ono, M.; Saigo, K.; Miyata, T. Retroviral Protease-Like Sequence in the Yeast Transposon Tyl. *Nature* **1985**, *315*, 691-692.
- [49] Copeland, T. D.; Oroszlan, S. Genetic locus, primary structure, and chemical synthesis of human immunodeficiency virus protease *Gene. Anal. Tech.* **1988**, *5*, 109-115.

- [50] Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, 235-242.
- [51] Fitzgerald, P. M.; McKeever, B. M.; VanMiddlesworth, J. F.; Springer, J. P.; Heimbach, J. C.; Leu, C. T.; Herber, W. K.; Dixon, R. A.; Darke, P. L. Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem.* **1990**, 265, 14209-14219.
- [52] Huff, J. R. HIV protease: a novel chemotherapeutic target for AIDS. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2305-2314.
- [53] Pearl, L.; Bundell, T. The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett.* **1984**, 174, 96-101.
- [54] Wlodawer, A.; Erickson, J. W.; Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 543-585.
- [55] Schechter, I.; Berger, A. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 157-162.
- [56] Darke, P. L.; Nutt, R. F.; Brady, S. F.; Garsky, V. M.; Ciccarone, T. M.; Leu, C. T.; Lumma, P. K.; Freidinger, R. M.; Veber, D. F.; Sigal, I. S. HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 156, 297-303.
- [57] Coffin, J. M.; Hughes, S. H.; Varmus, H. E. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY **1997**
- [58] Kaldor, S. W.; Kalish, V. J.; Davies, J. F.; Shetty, B. V.; Fritz, J. E.; Appelt, K.; Burgess, J. A.; Campanale, K. M.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Dressmann, B. A.; Hatch, S. D.; Khalil, D. A.; Kosa, M. B.; Lubbehusen, P. P.; Muesing, M. A.; Patick, A. K.; Reich, S. H.; Su, K. S.; Tatlock, J. H. Viracept (Nelfinavir Mesylate, AG1343): A Potent, Orally Bioavailable Inhibitor of HIV-1 Protease. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3979-3985.
- [59] Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A. Jr.; Roberts, G. D.; Carr, S. A.; Magaard, V. W.; Bryan, H. L.; Fakhoury, S. A.; Moore, M. L.; Minnich, M. D.; Culp, J. S. et al. Human immunodeficiency virus-1 protease. 1. Initial velocity studies and kinetic characterization of reaction intermediates by ¹⁸O isotope exchange. *Biochemistry* **1991**, 30, 8441-8453.
- [60] Abdel-Meguid, S. S. Inhibitors of aspartyl proteinases. *Med. Res. Rev.* **1993**, 13, 731-778.
- [61] Böhm, H.-J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford **1996**, 487-504.
- [62] Thaisrivongs, S.; Tomich, P. K.; Watenpaugh, K. D.; Chong, K. T.; Howe, W. J.; Yang, C. P.; Strohbach, J. W.; Turner, S. R.; McGrath, J. P.; Bohanon, M. J. et al. Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3200-3204.
- [63] Hirsch, M. S.; Conway, B.; D'Aquila, R. T.; Hammer, S. M.; Johnson, V. A.; Kuritzkes, D. R.; Loveday, C.; Mellors, J. W.; Clotet, B.; Conway, B.; Demeter, L. M.; Vella, S.; Jacobsen, D. M.; Richman, D. D. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. *JAMA.* **2000**, 283, 2417-2426.
- [64] Schinazi, R. F.; Larder, B.; Mellors, J. W. Mutations in retroviral genes associated with drug resistance - 2000-2001. *Intern. Antiv. News.* **2000**, 5, 129.
- [65] Peiperl, L. Antiretroviral Resistance Mutations. *HIV Clinical Trials.* **2001**, 2, 346-355.
- [66] Shafer, R. Stanford HIV RT and Protease Sequence Database **1998-2003**

- [67] Nijhuis, M.; Schuurman, R.; de Jong, D.; Erickson, J.; Gustchina, E.; Albert, J.; Schipper, P.; Gulnik, S.; Boucher, C. A. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* **1999**, 13, 2349-2359.
- [68] Pieniazek, D.; Rayfield, M.; Hu, D. J.; Nkengasong, J.; Wiktor, S. Z.; Downing, R.; Biryahwaho, B.; Mastro, T.; Tanuri, A.; Soriano, V.; Lal, R.; Dondero, T. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *AIDS* **2000**, 14, 1489-1495.
- [69] McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; and Karplus, M. *Nature* **1977**, 267, 585-590.
- [70] Schrödinger, E. *Sci. Prog (Oxford)* **1929**, 24, 146.
- [71] Born, M.; Oppenheimer, J. R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1927**, 84, 457-484.
- [72] Roothan, C. C. *J. Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 69.
- [73] Stewart, J. J. P. Semiempirical Molecular Orbital Methods. *Rev. Comp. Chem.* **1990**, 1, 45-81.
- [74] Zerner M. C. Semiempirical Molecular Orbital Methods. *Rev. Comp. Chem.* **1991**, 2, 313-365.
- [75] Lewars, E. Computational Chemistry: Introduction to the Theory and applications of Molecular and Quantum Mechanics, Kluwer Academic Publications, Boston, **2003**, 339-383.
- [76] Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909.
- [77] Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G. Extension of AM1 to the halogens. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1988**, 180, 1-21.
- [78] Stewart, J. J. P.; Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. I. Method. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 209-220.
- [79] Stewart, J. J. P.; Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. II. Applications. *J. Comput. Chem.* **1989**, 10, 221-264.
- [80] MacKerell, A. D., Jr.; Bashford, D.; Bellott, R. L.; Dunbrack, R. L., Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E., III; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 3586-3616.
- [81] Brooks, B. R.; Brucoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, 4, 187-217.
- [82] Höltje, H.-D.; Sippl, W.; Rognan, D.; Folkers, G. Molecular Modeling Basic Principles and Applications, 2nd edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2003**, 15-17.
- [83] Leach, A. R. Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. In: Molecular Modelling - Principles and Applications, 2nd Edition, Prentice Hall, Harlow, **2001**, 165-252.
- [84] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926-935.

- [85] Boyd, R.H. Method for calculation of the conformation of minimum potential-energy and thermodynamic functions of molecules from empirical valence-force potentials-application to the cyclophanes. *J. Chem. Phys.* **1968**, 19, 2574-2583.
- [86] Gaedt, K.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**
- [87] Schappach, A.; Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2000**
- [88] Leach, A. R. Molecular Dynamics Simulation Methods. In: *Molecular Modelling - Principles and Applications*, 2nd Edition, Prentice Hall, Harlow, **2001**, 353-409.
- [89] Hockney, R. W. The potential calculation and some applications. *Methods Comput. Phys.* **1970**, 9, 136-211.
- [90] Brooks, C.L.; Karplus, M. Deformable Stochastic Boundaries in Molecular-Dynamics. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 6312-6325.
- [91] Brooks, C. L. III; Brünger, A.; Karplus, M. Active site dynamics in protein molecules: a stochastic boundary molecular-dynamics approach. *Biopolymers* **1985**, 24, 843-865.
- [92] Brooks, C. L., III.; Karplus, M. Solvent effects on protein motion and protein effects on solvent motion. Dynamics of the active site region of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1989**, 208, 159-181.
- [93] Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J.C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Comput. Phys.* **1977**, 23, 327-341.
- [94] Hermann, J. C. Kombinierte quanten- und molekularmechanische Untersuchungen zur Acylierung von Klasse A β -Lactamasen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2004**
- [95] Gao, J. Methods and Applications of Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials. *Rev. Comput. Chem.* **1995**, 7, 119-185.
- [96] Gao, J. Hybrid QM/MM Simulations: An Alternative Avenue to Solvent Effects in Organic Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 298-305.
- [97] Gao, J.; Truhlar, D. G. Quantum Mechanical Methods for Enzyme Kinetics. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2002**, 53, 467-505.
- [98] Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1976**, 103, 227-249.
- [99] Singh, U. C.; Kollman, P. A. A combined ab initio quantum mechanical and molecular mechanical method for carrying out simulations on complex molecular systems: applications to CH₃Cl + Cl-exchange reaction and gas phase protonation of polyethers. *J. Comp. Chem.* **1986**, 7, 718-730.
- [100] Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. A Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **1990**, 11, 700-733.
- [101] Lyne, P. D.; Walsh, O. A. Computer Simulation of Biochemical Reactions with QM-MM Methods. In: *Computational Biochemistry and Biophysics*, ed. Becker, O.; MacKerell, Jr., A. D.; Roux, B.; Watanabe, M., Marcel Dekker Inc., New York, **2001**, 221-236.
- [102] Born, M.; Von Karman, T. *Physik. Z.* **1912**, 13, 297-309.
- [103] Cramer, C.J.; Truhlar, D. G. Continuum Solvation Models: Classical and Quantum Mechanical Implementations. *Rev. Comput. Chem.* **1995**, 6, 1-72.

- [104] Meyer, W.; Bobrowicz, F. W.; Goddard III, W. A. Methods in Electronic Structure Theory In: *Modern Theoretical Chemistry* (Vol. 3,4) ed. Schäfer, III, H. F., Plenum Press, New York, **1977**
- [105] Szabo, A. & Ostlund, N.S. *Modern Quantum Chemistry*, Dover Publications Inc., New York, **1996**
- [106] Golke, H.; Klebe, G. Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren. *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2764-2798.
- [107] Stryer, L. Die Enzyme: Eine Einführung. In: Biochemie, 5. Auflage Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, **1990**, 185-211.
- [108] Beveridge, D. L.; Di Capua, F. M. Free Energy Via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, 18, 431-492.
- [109] Straatsma, T. P. Free Energy by Molecular Simulation. *Rev. Comput. Chem.* **1996**, 9, 81-127.
- [110] McQuarrie, D. A. *Statistical Mechanics*. New York: Harper & Row **1976**
- [111] Tembe, B. L.; McCammon, J. A. Ligand-Receptor Interactions. *Comput. Chem.* **1982**, 8, 281-283.
- [112] Zwanzig, R. W. High-temperature equation of state by a perturbation method. I. Nonpolar gases. *J. Chem. Phys.* **1954**, 22, 1420-1426.
- [113] Leach, A. R. Four Challenges in Molecular Modelling: Free Energies, Solvation, Reactions and Solid-state Defects. In: *Molecular Modelling - Principles and Applications*, 2nd Edition, Prentice Hall, Harlow, **2001**, 563-569.
- [114] Jorgensen, W. L. Free Energy in Solution. *Encyclopedia of Computational Chemistry*, P. v.R. Schleyer, Ed.; Wiley: New York, 1998; Vol. 2, 1061-1070.
- [115] Kirkwood, J. G. Statistical mechanics of fluid mixtures. *J. Chem. Phys.* **1935**, 3, 300-313.
- [116] Gao, J.; Kuczera, K.; Tidor, B.; Karplus, M. Hidden Thermodynamics of Mutant Proteins: A Molecular Dynamics Analysis. *Science* 1989, 244, 1069-1072.
- [117] Gao, J. Absolute free energy of solvation from Monte Carlo simulations using combined quantum and molecular mechanical potentials. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 537-540.
- [118] Fleischman, S. H.; Brooks, III, C. L. Thermodynamics of aqueous solvation: Solution properties of alcohols and alkanes. *J. Chem. Phys.* **1987**, 87, 3029-3037.
- [119] Gao, J.; Xia, X. A Priori Evaluation of Aqueous Polarization Effects Through Monte Carlo QM/MM Simulations. *Science* **1992**, 258, 631-635.
- [120] Böttcher, C. J. F. *Theory of Electric Polarization*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, **1973**
- [121] Kalish, V. J.; Tatlock, J. H.; Davies, II., J. F.; Kaldor, W.; Dressman, B. A.; Reich, S.; Pino, M.; Nyugen, D.; Appelt, K.; Musick, L.; Wu, B. Structure-Based Drug Design of Nonpeptidic P₂ Substituents for HIV-1 Protease Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 727-732.
- [122] Wang, Y. X.; Freedberg, D. I.; Yamazaki, T.; Wingfield, P. T.; Stahl, S. J.; Kaufmann, J. D.; Kiso, Y.; Torchia, D. A. Solution NMR evidence that the HIV-1 protease catalytic aspartyl groups have different ionization states in the complex formed with the asymmetric drug KNI-272. *Biochemistry* **1996**, 35, 9945-9950.
- [123] Smith, R.; Brereton, I. M.; Chai, R. Y.; Kent, S. B. Ionization states of the catalytic residues in HIV-1 protease. *Nat Struct. Biol.* **1996**, 3, 946-950.

- [124] Gao, J.; Amara, P.; Alhambra, C.; Field, M. J. A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method for the Treatment of Boundary Atoms in Combined QM/MM Calculations. *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 4714-4721.
- [125] Brunger, A. T.; Karplus, M. Polar hydrogen positions in proteins: empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins*, **1988**, 4, 148-156.
- [126] Lau, F.T.; Karplus, M. Molecular recognition in proteins. Simulation analysis of substrate binding by a tyrosyl-tRNA synthetase mutant. *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 1049-1066.
- [127] Michielin, O.; Karplus, M. Binding free energy differences in a TCR-peptide-MHC complex induced by a peptide mutation: a simulation analysis. *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 547-569.
- [128] Yang, W.; Gao, Y. Q.; Cui, Q.; Ma, J.; Karplus, M. The missing link between thermodynamics and structure in F1-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, 100, 874-879.
- [129] Gao, J. The hydration and solvent polarization effects of nucleotide bases. *Biophys. Chem.* **1994**, 51, 253-261.
- [130] Cubero, E.; Luque, F. J.; Orozco, M.; Gao, J. Perturbation Approach to Combined QM/MM Simulation of Solute-Solvent Interactions in Solution. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 1664-1671.
- [131] Jadhav, P. K.; Ala, P.; Woerner, F. J.; Chang, C.-H.; Garber, S. S.; Anton, E. D.; Bacheler, L. T. Cyclic Urea Amides: HIV-1 Protease Inhibitors with Low Nanomolar Potency against both Wild Type and Protease Inhibitor Resistant Mutants of HIV. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 181-191.
- [132] Thaisrivongs, S.; Skulnick, H. I.; Turner, S. R.; Strohbach, J. W.; Tommasi, R. A.; Johnson, P. D.; Aristoff, P. A.; Judge, T. M.; Gammill, R. B.; Morris, J. K.; Romines, K. R.; Chrusciel, R. A.; Hinshaw, R. R.; Chong, K.-T.; Tarpley, W. G.; Poppe, S. M.; Slade, D. E.; Lynn, J. C.; Horng, M.-M.; Tomich, P. K.; Seest, E. P.; Dolak, L. A.; Howe, W. J.; Howard, G. M.; Schwende, F. J.; Toth, L. N.; Padbury, G. E.; Wilson, G. J.; Shiou, L.; Zipp, G. L.; Wilkinson, K. F.; Rush, B. D.; Ruwart, M. J.; Koeplinger, K. A.; Zhao, Z.; Cole, S.; Zaya, R. M.; Kakuk, T. J.; Janakiraman, M. N.; Watenpaugh, K. D. Structure-Based Design of HIV Protease Inhibitors: Sulfonamide-Containing 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as Non-Peptidic Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4349-4353.
- [133] Hodge, C. N.; Aldrich, P. E.; Bacheler, L. T.; Chang, C. H.; Eyermann, C. J.; Garber, S.; Grubb, M.; Jackson, D. A.; Jadhav, P. K.; Korant, B.; Lam, P. Y. S.; Maurin, M. B.; Meek, J. L.; Otto, M. J.; Rayner, M. M.; Reid, C.; Sharpe, T. R.; Shum, L.; Winslow, D. L.; Erickson-Viitanen, S. Improved cyclic urea inhibitors of the HIV-1 protease: synthesis, potency, resistance profile, human pharmacokinetics and X-ray crystal structure of DMP 450. *Chem. Biol.* **1996**, 3, 301-314.
- [134] Garcia-Viloca, M.; Truhlar, D. G.; Gao, J. Importance of substrate and cofactor polarization in the active site of dihydrofolate reductase. *J. Mol. Biol.* **2003**, 327, 549-560.
- [135] Mulliken, R. S. Electronic population analysis on LCAO-MO molecular wave functions .1. *J. Chem. Phys.* **1955**, 23, 1833-1840.
- [136] Mo, Y.; Subramanian, G.; Gao, J.; Ferguson, D. M. Cation- π Interactions: An Energy Decomposition Analysis and Its Implication in δ -Opioid Receptor-Ligand Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4832-4837.
- [137] INSIGHT II 2000, FDISCOVER, Accelrys, San Diego, CA, USA

- [138] Sham, H. L.; Zhao, C.; Stewart, K. D.; Betebenner, D. A.; Lin, S.; Park, C. H.; Kong, X. P.; Rosenbrook, W., Jr; Herrin, T.; Madigan, D.; Vasavanonda, S.; Lyons, N.; Molla, A.; Saldivar, A.; Marsh, K. C.; McDonald, E.; Wideburg, N. E.; Denissen, J. F.; Robins, T.; Kempf, D. J.; Plattner, J. J.; Norbeck, D. W. A novel, picomolar inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 protease. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 392-397.
- [139] Kollman, P. A. Free energy calculations: Applications to chemical biochemical phenomena. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2395-2417.
- [140] Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **2004**, 303, 1813-1818.
- [141] Rizzo, R. C.; Udier-Blagovic, M.; Wang, D.-P.; Watkins, E. K.; Kroeger-Smith, M. B.; Smith R. H., Jr.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Prediction of activity for nonnucleoside inhibitors with HIV-1 reverse transcriptase based on Monte Carlo simulations. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2970-2987.
- [142] Åqvist, J.; Medina, C.; Samuelsson, J. E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* **1994**, 7, 385-391.
- [143] Hansson, T.; Marelus, J.; Åqvist, J. Ligand binding affinity by linear interaction energy methods. *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **1998**, 12, 27-35.
- [144] Kervinen, J.; Zdanov, N. T. A.; Tino, J.; Barrish, J.; Lin, P. F.; Colonno, R.; Riccardi, K.; Samanta, H.; Wlodawer, A. Structural Analysis of the Native and Drug-Resistant HIV-1 Proteinases Complexed with an Aminodiol Inhibitor. *Protein Pept. Lett.* **1996**, 3, 399-406.
- [145] Hulten, J.; Bonham, N. M.; Nillroth, U.; Hansson, T.; Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Aqvist, J.; Classon, B.; Danielson, U. H.; Karlen, A.; Kvarnstrom, I.; Samuelsson, B.; Hallberg, A. Cyclic HIV-1 Protease Inhibitors Derived from Mannitol: Synthesis, Inhibitory Potencies, and Computational Predictions of Binding Affinities. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 885-897.
- [146] Backbro, K.; Lowgren, S.; Osterlund, K.; Atepo, J.; Unge, T.; Hulten, J.; Bonham, N. M.; Schaal, W.; Karlen, A.; Hallberg, A. Unexpected Binding Mode of a Cyclic Sulfamide HIV-1 Protease Inhibitor. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 898-902.
- [147] Zoete, V.; Michielin, O.; Karplus, M. Protein-ligand binding free energy estimation using molecular mechanics and continuum electrostatics. Application to HIV-1 protease inhibitors. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2003**, 17, 861-880.
- [148] Kurup, A.; Mekapati, S. B.; Garg, R.; Hansch, C. HIV-1 protease inhibitors: A comparative QSAR analysis. *Curr. Med. Chem.* **2003** 10, 1679-1688.
- [149] Perola, E.; Walters, W. P.; Charifson, P. S. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins* **2004**, 56, 235-249.
- [150] Vinkers, H. M.; de Jonge, M. R.; Daeyaert, E. D.; Heeres, J.; Koymans, L. M.; van Lenthe, J. H.; Lewi, P. J.; Timmerman, H.; Janssen, P. A. Inhibition and substrate recognition-a computational approach applied to HIV protease. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2003**, 17, 567-581.
- [151] Reddy M. R.; Erion M. D. Structure-based drug design approaches for predicting binding affinities of HIV1 protease inhibitors. *J. Enz. Inhib.* **1998**,14, 1-14.
- [152] McCarrick, M. A.; Kollman, P. A.. Predicting relative binding affinities of non-peptide HIV protease inhibitors with free energy perturbation calculations. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **1999**;13, 109-121.
- [153] Ranaghan, K. E.; Mulholland, A. J. Conformational effects in enzyme catalysis: QM/MM free energy calculation of the 'NAC' contribution in chorismate mutase. *Chem. Commun.* **2004**, 10, 1238-1239.
- [154] Li, G.; Cui, Q. pKa Calculations with QM/MM Free Energy Perturbations. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107, 14521-14528.

- [155] Yin, B.-Z.; Mori, A.; Tadeshita, H. Synthesis of polyacetoxyalkyltropones and polyhydroxyalkyltropones. *Youji Huaxue* **2000**, 20, 522-528.
- [156] Doi, K. Diazo reactions of 4-aminotropolones. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1962**, 35, 67-71.
- [157] Noyori, R.; Makino, S.; Takaya, H. Reaction of α,α' -dibromo ketones with iron carbonyls in the presence of 1,3-dienes. New route to troponoid compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**; 93; 1272-1273.
- [158] Takaya, H.; Hayakawa, Y.; Makino, S.; Noyori, R. Carbon-carbon bond formation promoted by transition metal carbonyls. 18. New synthesis of troponoid compounds via the iron carbonyl promoted cyclocoupling between polybromo ketones and 1,3-dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100; 1778-1785.
- [159] Herndon, J. W.; Zora, M.; Patel, P. P.; Chatterjee, G.; Matasi, J. J.; Tumer, S. U. Preparation of seven-membered rings by the reaction of cyclopropylcarbenetungsten and molybdenum complexes with alkynes. *Tetrahedron* **1993**, 49, 5507-5530.
- [160] Sham, Y. Y.; Chu, Z. T.; Tao, H.; Warshel, A. Examining methods for calculations of binding free energies: LRA, LIE, PDL-D-LRA, and PDL-D/S-LRA calculations of ligands binding to an HIV protease. *Proteins* **2000**, 39, 393-407.
- [161] Kalra, P.; Reddy, T. V.; Jayaram, B. Free energy component analysis for drug design: a case study of HIV-1 protease-inhibitor binding. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4325-4338.
- [162] Carlson, H. A.; Jorgensen, W. L. An Extended Linear Response Method for Determining Free Energies of Hydration. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 10667-10673.
- [163] Kroeger Smith, M. B.; Hose, B. M.; Hawkins, A.; Lipchock, J.; Farnsworth, D. W.; Rizzo, R. C.; Tirado-Rives, J.; Arnold, E.; Zhang, W.; Hughes, S. H.; Jorgensen, W. L.; Michejda, C. J.; Smith, R. H., Jr. Molecular Modeling Calculations of HIV-1 Reverse Transcriptase Nonnucleoside Inhibitors: Correlation of Binding Energy with Biological Activity for Novel 2-Aryl-Substituted. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 1940-1947.

A Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
et al.	<i>et alii</i>
engl.	englisch
evtl.	eventuell
HF	Hartree-Fock
IC	<i>internal coordinates</i>
MD	Moleküldynamik
NMR	„ <i>nuclear magnetic resonance</i> “; Kernresonanzspektroskopie
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen-Konzentration
pk _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
QM/MM	quantenmechanisch/molekularmechanisch
RMS	<i>root mean square</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i>
TI	Thermodynamische Integration
s.	siehe
u.a.	unter anderem
vdW	van der Waals
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
PR	Protease
PI	Protease-Inhibitor
RT	Reverse Transkriptase
IN	Integrase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
K _i	Inhibitionskonstante

Einheiten

Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
nm	Nanometer (1 nm = 10 ⁻⁹ m)
K	Kelvin (0 K = -273,15 °C)
kcal	Kilokalorie (1 kcal = 4,186 kJ)
fs	Femtosekunde (1 fs = 10 ⁻¹⁵ s)
ps	Picosekunde (1 ps = 10 ⁻¹² s)
ns	Nanosekunde (1 ns = 10 ⁻⁹ s)

B Hardware

Silicon Graphics Workstations:

INDIGO² R10000

O2 R12000

Silicon Graphics Origin 2000

mit 38 R10000 Prozessoren

(am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

Netfinity Linux Cluster

mit 76 Intel-Prozessoren zwischen 733 und 1266 MHz

(am Rechenzentrum der Universität von Minnesota, Minneapolis)

C Software

CHARMM	Sehr umfangreiches Molecular-Modelling-Paket der Universität Harvard, das neben reinen Kraftfeldanwendungen auch eine Schnittstelle zum Programm MOPAC beinhaltet und so für QM/MM-Rechnungen zugänglich ist (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics; http://yuri.harvard.edu/)
INSIGHT2000	Grafikmodul des Programmpakets INSIGHTII der Firma Accelrys zum Strukturaufbau und zur Visualisierung
JAGUAR	<i>ab initio</i> – Programm der Firma. SCHRÖDINGER, das sich als besonders schnell bei Anwendungen der Dichtefunktionaltheorie erwiesen hat
MOPAC	semiempirisches Rechenprogramm der Firma SCHRÖDINGER
MS-OFFICE	Microsoft Excel, Powerpoint und Word
SYBYL	Molecular-Modelling-Paket der Firma TRIPOS mit Schnittstellen u.a. zu dem Programm MOPAC
VMD	Visualisierungsprogramm der Universität Illinois (Visual Molecular Dynamics; http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)

D Aminosäuren: Ein- und Dreibuchstabencode

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

E Energieterme des CHARMM-Kraftfeldes

Die Gesamtenergie E_{ges} eines Moleküls ergibt sich im CHARMM-Kraftfeld aus den Standardenergietermen:

$$E_{ges} = E_B + E_W + E_T + E_{Disp} + E_{ele}$$

Dabei werden die einzelnen Terme wie folgt definiert:

Bindungslängen- energie E_B	$E_B = \sum k_d (d - d_0)^2$	k_d	Bindungslängen-Kraftkonstante (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
		d	aktuelle Bindungslänge (Å)
		d_0	Referenz-Bindungslänge (Å)
Bindungswinkel- energie E_W	$E_W = k_q (q - q_0)^2$	k_q	Bindungswinkel-Kraftkonstante (kcal mol ⁻¹ rad ⁻²)
		q	aktueller Bindungswinkel (Grad)
		q_0	Referenz-Bindungswinkel (Grad)
Torsionswinkel- energie E_T	$E_T = \sum k_T [1 + \cos(nj - j_0)]$	k_T	halbe Torsionsbarriere (kcal mol ⁻¹)
		n	Periodizität
		j	aktueller Torsionswinkel (Grad)
		j_0	Referenz-Torsionswinkel (0° oder 180°)
Dispersions- energie E_{Disp}	$E_{Disp} = \sum \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6}$	A_{ij}	Konstante im repulsiven Term (kcal mol ⁻¹ Å ¹²)
		B_{ij}	Konstante im attraktiven Term (kcal mol ⁻¹ Å ⁶)
		r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
Elektrostatische Energie E_{ele} (Coulomb- Potenzial)	$E_{ele} = \sum \frac{q_i q_j}{r_{ij} e}$	q_i, q_j	Ladungen der Atome i, j
		r_{ij}	Abstand zwischen den Atomen i und j (Å)
		e	Dielektrizitätskonstante

F Eingabedateien

F1 CHARMM-Files

Systemgenerierung und Relaxation einer Kristallstruktur

* HIV-Protease AG1254 Setup

*

BOML -1

FASTer ON

set 0 v_coor/

READ RTF CARD NAME "~/parafiles/top_all27_prot_lipid.rtf"

READ RTF CARD APPE NAME "./ag1254-3.rtf"

READ PARA CARD NAME "~/parafiles/par_all27_prot_lipid.prm"

READ PARA CARD APPE NAME "./ag1254-1.prm"

!-----

!coordinates reading

READ SEQU COOR RESI NAME "./acha.crd"

GENE ACHA SETUP

READ SEQU COOR RESI NAME "./bcha.crd"

GENE BCHA SETUP

READ SEQU COOR RESI NAME "./ag1254.crd"

GENE AG54 SETUP

!Protonation of ASP A25 (OD2)

PATCH ASPP ACHA A25 SETUP

READ COOR RESI CARD NAME "./acha.crd"

READ COOR RESI CARD NAME "./bcha.crd"

READ COOR RESI CARD NAME "./ag1254.crd"

AUTOGEN ANGLES DIHEDRALS

READ SEQU COOR RESI NAME "./cwat.crd"

GENE CWAT SETUP NOANGLE NODIHEDRAL

READ COOR RESI CARD NAME "./cwat.crd"

IC FILL PRESERVE

IC PARAMETER

IC BUILD

HBUILD

COOR ORIEN MASS NORO SELE ATOM AG54 888 C3 END

DEFINE HATOM SELE HYDRogen END

! Non-bond interaction option

UPDATES -

ATOM ELEC SWITCH -

VATOM VDW VSHIFT -

NBXMod 5 E14Fac 1.0 -

CDIE EPS 1.0 -

CUTNb 13.0 CTOFnb 12.0 CTONNB 11.0 WMIN 1.2 INBFRQ 25

!-----

! QM initialization (inhibitor)

quantum group sele segid AG54 end AM1 CHARGE 0.0 scfc 0.000001

!-----

! Turn on The SHAKE

SHAKE BONH sele .not. resname TIP3 show end TOL 1.e-6 para

SHAKE FAST WATER sele resname TIP3 show end TOL 1.e-6 para

CONS FIX SELE .NOT. HATOM END

MINI SD NSTEP 500

MINI ABNR NSTEP 100

CONS FIX SELE NONE END

CONS HARM MASS FORCE 1.0 SELE .NOT. HATOM END

MINI SD NSTEP 200

MINI ABNR NSTEP 100

CONS HARM CLEAR

SHAKE OFF

!-----

!Write

OPEN unit 1 write card name @0setup_1_ag54.psf

WRITe psf card unit 1

* AG1254 initial setup

*

CLOSE unit 1

OPEN unit 1 write card name @0setup_1_ag54.crd

WRITe coord card unit 1

* AG1254 initial setup

*

CLOSE unit 1

STOP

Befehle zur Erstellung einer Referenzstruktur mit Wasserhülle

!-----

! find the center of mass of AG1254

DEFIne CNTR SELE segid AG54 show end

scalar x statistics sele cntr end

scalar y statistics sele cntr end

scalar z statistics sele cntr end

! translate the system to origin

COOR stat sele cntr ends

COOR TRANslate xdir -?XAVE ydir -?YAVE zdir -?ZAVE sele all end

! Add the BULK water to the system

OPEN unit 1 read card name @1@w

!READ sequ card unit 1

READ sequ coord unit 1

REWIND unit 1

GENERate BULK noangle nodihedral warn setup

READ coord card unit 1 APPEND

CLOSE unit 1

! Delete BULK water that overlap with protein heavy atoms

DELE atom sele .byres. ((segid BULK .and. type OH2) .and. -

((.not. (segid BULK .or. HYDRogen)) .around. 2.8)) show end

! Delete all water beyond the outer cutoff

delete atom sort select .byres. (.not. (point 0. 0. 0. cut 25.0) -

.and. (segid BULK .OR. segid CWAT .AND. type oh2)) show end

SHAKE BONH sele .not. rename TIP3 end TOL 1.e-6 para

SHAKE FAST WATER sele rename TIP3 end TOL 1.e-6 para

!-----

! QM-initialization (inhibitor)

quantum group sele segid AG54 end AM1 CHARGE 0.0 scfc 0.000001

!-----

!Minimizations

DEFINE HWAT SELE HYDRogen .and. resname TIP3 show END

DEFINE HATOM SELE HYDRogen END

CONS FIX SELE .NOT. HWAT END

MINI SD NSTEP 500

MINI ABNR NSTEP 100

CONS FIX SELE NONE END

CONS HARM MASS FORCE 1.0 SELE .NOT.(HATOM) END

MINI SD NSTEP 200

MINI ABNR NSTEP 100

CONS HARM CLEAR

!-----

!Write

OPEN unit 1 write card name @0setup_2_ag54solv.crd

WRITE coord card unit 1

* AG1254 initial setup

CLOSE unit 1

OPEN unit 1 write card name @0setup_2_ag54solv.psf

WRITE psf card unit 1

* AG1254 initial setup

*

CLOSE unit 1

STOP

Befehle zur Systemerwärmung und -equilibrierung

!-----

!Initial heating, 12ps

set x v_data/heat_0.rst

set v v_data/heat_0

open write unit 33 form name @x

open write unit 32 unform name @v.dcd

set inc 20.0

set ft 0.0

set t 298.0

DYNAmics leap langevin -

start nstep 12000 timestp 0.001 RBUF @inc -

iunrea -1 iunwri 33 iuncrd 32 iunvel -1 kunit -1 -

ilbfrq 5 iseed 645201 firstt @ft finalt @t tbath @t -

teminc 10.0 ihtfrq 400 ieqfrq 0 iasor 0 iasvel 1 iscvl 0 -

ichecw 0 nprint 50 nsavc 500 isvfrq 500 -

twindh 10.0 twindl -10.0 iprfrq 500 echeck 100000 -

inbfrq -1 ihbfrq -1

!-----

! Equilibration run, 300 ps

set x v_data/heat_0.rst

set y v_data/equilib_1.rst

set a v_data/equilib_1.dcd

set r v_data/equilib_1.crd

set u v_data/equilib

open read unit 34 form name @x ! read restart file

open write unit 33 form name @y ! write restart file

open write unit 32 unform name @a ! write dcd file

DYNAmics leap langevin - ! reaction region size rbuf 20.0

restart nstep 300000 timestp 0.001 RBUF @inc -

iunrea 34 iunwri 33 iuncrd 32 iunvel -1 kunit -1 -

ilbfrq 5 iseed 645202 firstt @t finalt @t tbath @t -

teminc 0.0 ihtfrq 0 iasor 0 iasvel 1 iscvcl 0 -
ichecw 0 ieqfrq 0 nprint 100 nsavc 500 isvfrq 500 -
twindh 10.0 twindl -10.0 iprfrq 500 -
inbfrq -1 ihbfrq -1

Initialisierungsbefehle für eine QM/MM-FEP-Simulation des λ -Fensters von 1 bis 0,75

!-----

!Initialisierung des QM-Teils

quantum group sele segid AG54 end AM1 CHARGE 0.0 scfc 0.000001 -

PERT REF0 0.875 PER1 1.0 PER2 0.75 TEMP 298

Beispiel einer Systempartitionierung bei der Thermodynamischen Integration

Parameter für die MM-MD-Simulationen zur Transformation von der Hydroxyl- zur Nitrogruppe
am λ -Punkt 0,2

!-----

!Setup BLOCK-Parameter

DEFINE BLOCK3 sele (ATOM AG24 666 N8 .or. ATOM AG24 666 O8N*) SHOW END

DEFINE BLOCK2 sele (ATOM AG24 666 O8 .or. ATOM AG24 666 H8O) SHOW END

BLOCK 3

CALL 2 SELE BLOCK2 END

CALL 3 SELE BLOCK3 END

CALL 1 SELE .not. (BLOCK2 .or. BLOCK3) END

COEF 1 1 1.0

COEF 1 2 0.98 -

 BOND 1.0 ANGL 1.0

COEF 1 3 0.02 -

 BOND 1.0 ANGL 1.0

COEF 2 2 0.98 -

 BOND 1.0 ANGL 1.0

COEF 2 3 0.

COEF 3 3 0.02 -

 BOND 1.0 ANGL 1.0

END

F2 Python-Script

Script zur Durchführung von Aminosäuren-Dekompositionsanalysen.

Automatisierte Berechnung des energetischen Einflusses einzelner Aminosäuren auf die Ligandenbindung. Die Koordinaten werden direkt aus den Trajektorien der MD-Simulationen ausgelesen. Die Ergebnisse der einzelnen Frames werden in getrennten Dateien ausgegeben, woraus sich im Anschluss gemittelte Werte berechnen lassen.

```
#!/usr/bin/python
import re, os, string

def dateisearep(dateiname,number):
    f = open(dateiname)
    w = open(dateiname+"2","w")
    for zeile in f:
        spalte = zeile.split()
        try:
            if spalte[0] == 'set' and spalte[1] == "frampos":
                w.write(spalte[0]+' '+spalte[1]+' '+str(number)+'\n')
                print spalte[0]+' '+spalte[1]+' '+str(number)
            else:
                w.write(zeile)
        except IndexError:
            w.write(zeile)
    f.close()
    w.close()
    os.rename(dateiname+"2", dateiname)

def inp_dateien(*args):
    filenames = os.listdir(os.curdir) #Dateien aus auktuellen Pfad lesen
    inpfiles = filenames[:]
    for filename in filenames:
        if filename.endswith(".inp"):
            if filename.startswith("resdels_dyn"):
                pass
            else:
                inpfiles.remove(filename)
        else:
            inpfiles.remove(filename)
    inpfiles.sort()
    return inpfiles

def dateien(*args):
```

```
filenames = os.listdir(os.curdir) #Dateien aus auktuellen Pfad lesen
inpfiles = filenames[:]
for filename in filenames:
    x = re.search(".dcd",filename)
    if x:
        pass
    else:
        inpfiles.remove(filename)
inpfiles.sort()
return inpfiles

def inp2(dateiname,dcdname):
    f = open(dateiname)
    w = open(dateiname+"2","w")
    for zeile in f:
        spalte = zeile.split()
        try:
            if spalte[0] == 'set' and spalte[1] == 'runer':
                spalte[2] = dcdname
                zeile = " ".join(spalte)+"\n"
                w.write(zeile)
                print zeile
            else:
                w.write(zeile)
        except IndexError:
            w.write(zeile)
    f.close()
    w.close()
    os.rename(dateiname+"2", dateiname)

def inp3(dateiname,segnam):
    f = open(dateiname)
    w = open(dateiname+"2","w")
    for zeile in f:
        spalte = zeile.split()
        try:
            if spalte[0] == 'set' and spalte[1] == 'namseg':
                spalte[2] = segnam
                zeile = " ".join(spalte)+"\n"
                w.write(zeile)
```

```

    print zeile
else:
    w.write(zeile)
except IndexError:
    w.write(zeile)
f.close()
w.close()
os.rename(dateiname+"2", dateiname)
#-----
print "Autogenerierung von Inputfiles"
print
#Durchsuchen des aktuellen Verzeichnisses & Anzeige der passenden Dateien
searchfiles = inp_dateien()
print "Folgende Datei wird variiert:"
print searchfiles
file = searchfiles[0]
#Abfrage der Strings
os.chdir('../v_data')
searchfiles = dateien()
os.chdir('../v_as_analyse')
print searchfiles
dcd = raw_input("Name des DCD-FILES (\".dcd\"): ")
dcd = dcd + ".dcd"
framestart = raw_input("Startframe?: ")
frameend = raw_input("Endframe?: ")
#Aminosaeuren-Analyse im Enzym
inp2(file,dcd)
for struc in range(int(framestart),int(frameend)):
    try:
        os.remove('resdels_ene'+str(struc)+'.txt')
    except OSError:
        pass
    f = open('resdels_ene'+str(struc)+'.txt','w')
    f.close()
    dateisearep(file,struc)
for segnames in ['ACHA','BCHA','CWAT','BULK']:
    inp3(file,segnames)
    os.system("charrmm < "+file+" > "+file.rstrip("inp")+".out")

```


Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich während der Promotionszeit in Düsseldorf unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich:

Johannes Hermann, mit dem ich mehrere Jahre das Büro geteilt und folglich viel Zeit verbracht habe. Ich konnte durch seine Hilfe meine ersten Schritte auf dem Gebiet des Molecular Modelling machen und lernte von ihm die Anwendung von QM/MM-Methoden. Er war immer meine erste Adresse für vielerlei Fragen. Gemeinsam konnten wir das ein oder andere Problem (z.B. mit CHARMM) lösen, wodurch sich unser Rechenbedarf auf Kosten der Kollegen meist noch mehr erhöhte. Ganz besonders danke ich ihm dafür, dass er die Korrektur dieser Arbeit übernommen hat, obwohl er bereits als Postdoc in Bristol tätig war und sicherlich genug eigenen Stress hatte.

Ich danke auch den Kollegen des ersten Semesters Barbara Gioffreda, Andrea Vollbrecht und Stefan Beyen für ihre nahezu unendliche Flexibilität beim Tausch von Diensten, wodurch mein zweiter Forschungsaufenthalt in Minneapolis überhaupt erst möglich wurde. Unsere Teamwork machte den Ersti-Dschungel meist sehr angenehm.

Ich danke allen Kollegen des Arbeitskreises, insbesondere unserem Systemadministrator Peter Sippel. Er hat immer für optimale technische Bedingungen gesorgt und ist sogar auf „Software-Sonderwünsche“ eingegangen, obwohl dies auch manchmal größeren Arbeitsaufwand nach sich zog. Seine Erlebnisse als Bauherr versuche ich zu beherzigen, falls ich mich selbst mal zu einem solchen Schritt entschließen sollte.

Ein riesiges Dankeschön gilt meinen Eltern, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte und die mir vieles in meinem bisherigen Leben ermöglicht haben.

Es gibt bisher nur wenige Menschen, die jeden Satz meiner Arbeit kennen – Ingrid Martini gehört dazu und ich danke ihr ganz herzlich, dass sie sogar ihren Urlaub zum Korrekturlesen „geopfert“ hat.

Abschließend noch ein ganz liebes Dankeschön an Gabriele. Sie hat mich immer wieder motiviert, wenn es mal nicht so lief. Ich fühle mich einfach wohl, wenn ich mit ihr zusammen bin und ich möchte keine Stunde missen, die ich mit ihr verbracht habe.

Name Christian Hensen

geboren am 08.07.1975

in Perleberg

Schulbildung

1982 – 1990 Polytechnische Oberschule „Jury Gagarin“, Perleberg

1990 – 1991 Erweiterte Oberschule, Wittenberge

1991 – 1995 Gottfried-Arnold-Gymnasium, Perleberg

1995 Abitur

Zivildienst

07/1995 – 07/1996 Deutsches Rotes Kreuz, Perleberg

Studium

10/1996 – 09/2000 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

01/2002 Approbation als Apotheker

Praktisches Jahr

11/2000 – 04/2001 Elch-Apotheke, Neuss

05/2001 – 10/2001 Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit 11/2001 Beginn der vorliegenden Dissertation am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje

Forschungsaufenthalte

09/2003 und Department of Chemistry,

06 – 07/2004 University of Minnesota, Minneapolis