

NMR-Methoden

zur Identifizierung von

Makromolekül-Ligand-Interaktionen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Benjamin Waibel
aus Mutlangen

Würzburg 2008

Eingereicht am

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter

2. Gutachter

der Dissertation

1. Prüfer

2. Prüfer

3. Prüfer

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

*The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins some larger way
Where many paths and errands meet.
And whither then? I cannot say.*

J.R.R Tolkien "The Lord of the Rings"

*Für meine Eltern und
meine Großmutter*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von März 2004 bis Dezember 2007 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter der Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

An dieser Stelle möchte ich ihr für ihre Unterstützung, für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen und das in mich gesetzte Vertrauen danken, das mir die Möglichkeit zur selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeit gab.

Herrn Prof. Dr. G. K. E. Scriba danke ich für die Bereitstellung der Dipeptide und der Elektropherogramme. Ebenso danke ich ihm für zahlreiche Diskussionen und Ratschläge per E-Mail oder auf DPhG-Tagungen, die einen großen Beitrag zum erfolgreichen Abschluss des Cyclodextrin-Projekts geleistet haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Curd Schollmayer, der mir den Einstieg in die Welt der NMR-Spektroskopie ungemein erleichtert hat, für die tatkräftige Mithilfe bei den ^{19}F -Messungen, der Entwicklung der selektiven Pulssequenz und nicht zuletzt für die zahlreichen Diskussionen rund um das Thema Fußball (auch wenn er auf der „Dunklen Seite“ des Fußballs steht).

Herrn Dr. Joseph Scheiber danke ich für die Einführung in das spannende Gebiet der theoretischen Chemie, für das Aufsetzen sämtlicher Simulationen und für die unglaubliche Geduld und Zuversicht in das Gelingen von diesem Teil der Arbeit, auch wenn wir beide manchmal nicht mehr so richtig daran geglaubt haben.

Dr. Matthias Grüne und Frau Elfriede Ruckdeschel danke ich für die ROESY-Messungen und das Prozessieren der Spektren.

Vielen Dank an Verena Hörr, die mir mit zahlreichen Tipps und Tricks zur Bakterienkultivierung und Lebend/Tot-Bestimmung das Arbeiten mit diesen widerspenstigen Biestern ungemein erleichtert hat.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Holger Projahn für seine positive Art, für seine Aufmunterungen während mancher Durststrecken und für seinen außerordentlichen Fußballsachverstand.

Florian Diwischek danke ich für das Asyl in seinem Labor während der Anfangszeit (auch wenn es meine Bakterien nicht sehr genossen haben) und für die vielen Gespräche während der gemeinsamen Praktikumsaufsicht.

Herrn Dr. Mario Fichera danke ich für die Möglichkeit, eine kurze Zeit in ein Festkörper-NMR-Labor reinschnuppern zu dürfen und für den netten „italienischen Abend“ in Berlin.

PD Dr. Darius Zlotos, Dr. Eberhard Heller, Eva Kugelmann und Dr. Franziska Schulz danke ich für die gemeinsame Zeit im Praktikum.

Jessica Klöckner danke ich vielmals für die unzähligen Korrekturen dieser Arbeit und für ihre nette, herzliche Art. Bleib so wie du bist!

Ein ganz besonderer Dank an meinen Laborkollegen Christoph Albert. Nicht nur für das Korrekturlesen, sondern auch für eine tiefe Freundschaft, die sich im Laufe der Jahre entwickelt hat.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meiner Großmutter, meinen Schwiegereltern und meiner gesamten Familie. Des Weiteren allen meinen Freunden (vor allem Christoph, Martin, Denise und Patrick). Ohne euch alle wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.

Michaela, danke für das Ertragen, deine Aufbauarbeit, deine Zuversicht und dein „Für-mich-Dasein“...du bist der Jackpot meines Lebens!

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign	2
1.1.1. Grundlagen.....	2
1.1.2. NMR-Spektroskopie im Wirkstoffdesign	4
1.2. Theoretische Grundlagen der NMR-Spektroskopie	6
1.2.1. Einführung	6
1.2.2. Der Kerndrehimpuls und der magnetische Vektor	7
1.2.3. Die Entstehung des NMR-Signals	10
1.2.4. Das NMR-Spektrometer	12
1.2.5. Grundlagen der verwendeten Screeningparameter.....	14
1.2.5.1. Chemische Verschiebung.....	14
1.2.5.2. Spin-Gitter-Relaxation (Longitudinale Relaxation, T_1 -Relaxation)	17
1.2.5.3. Spin-Spin-Relaxation (Transversale Relaxation, T_2 -Relaxation)	20
1.2.5.4. Kern-Overhauser-Effekt und ROE-Spektroskopie	21
1.2.5.5. Diffusionskoeffizient.....	25
1.2.6. Zielsetzung	26
2. ALLGEMEINER TEIL	29
2.1. Einfluss von Harnstoff auf β-Cyclodextrin-Einschluss-komplexe mit Dipeptiden	30
2.1.1. Cyclodextrine.....	31
2.1.2. Cyclodextrine in der NMR-Spektroskopie.....	33
2.1.3. Kapillarelektrophoretische Trennung von Dipeptiden unter Einsatz von Cyclodextrinen.....	34
2.1.3.1. Allgemeines zur Kapillarelektrophorese	34
2.1.3.2. Kapillarelektrophoretische Untersuchungen von Cyclodextrin-Dipeptid-Einschlusskomplexen in Abwesenheit von Harnstoff	35

2.1.4.	Zielsetzung	37
2.1.5.	“Complexation Induced Chemical Shift” (CICS)-Messungen	38
2.1.5.1.	Referenzierung	38
2.1.5.2.	pH-Einstellung	39
2.1.5.3.	Wasserunterdrückung	40
2.1.5.4.	Ergebnisse der CICS-Messungen	42
2.1.6.	2D-ROESY Messungen	49
2.1.6.1.	Lyophilisation	49
2.1.6.2.	Ergebnisse der ROESY-Messungen	50
2.1.7.	Moleküldynamik-Simulations-Studien	55
2.1.7.1.	Einführung	55
2.1.7.2.	Durchführung der MD-Simulationen	59
2.1.7.3.	Auswertung der Simulationen	61
2.1.7.4.	Ergebnisse und Diskussion der MD-Simulationen	63
2.1.8.	Zusammenfassung und Ergebnis der Untersuchungen über den Einfluss von Harnstoff bei enantioselektiven Trennungen	66
2.2.	Relaxationsstudien von Fluorchinolonen mit <i>Micrococcus luteus</i>	68
2.2.1.	Geschichte der Fluorchinolone	68
2.2.2.	Die Gyrase und die Pharmakologie der Chinolone	72
2.2.2.1.	Pharmakologie der verwendeten Gyrasehemmer	74
2.2.3.	Angewendete NMR-Screening-Techniken	75
2.2.3.1.	Spin-Gitter-Relaxation (T_1)	75
2.2.3.2.	Spin-Spin-Relaxationsrate (T_2)	81
2.2.4.	Zielsetzung	84
2.2.5.	Durchführung und Ergebnisse der Spin-Gitter-Relaxations-messungen von Gyrasehemmern an <i>Micrococcus luteus</i>	84
2.2.5.1.	Beschreibung des Testsystems	84
2.2.5.2.	Bestimmung der Dissoziationskonstante von Fleroxacin	87
2.2.5.3.	^{19}F -Relaxationsstudien von Fleroxacin	92
2.2.5.4.	Relaxationsmessungen von Ofloxacin	95
2.2.5.5.	Relaxationsmessungen von Moxifloxacin	97
2.2.6.	Zusammenfassung	99

2.3. Proteinbindungsstudien von Gyrasehemmern an BSA	101
2.3.1. Albumine	101
2.3.2. Proteinbindung	102
2.3.3. Grundlagen der NMR-Diffusionsmessungen	104
2.3.4. Bestimmung der Messparameter.....	108
2.3.4.1. Gradientenkalibrierung	108
2.3.4.2. Temperaturkalibrierung	109
2.3.4.3. Parameteroptimierung.....	111
2.3.5. K_D -Wert-Bestimmung von Gyrasehemmern an BSA mittels Diffusionsmessung	113
2.3.5.1. Nalidixinsäure	113
2.3.5.2. Ofloxacin	115
2.3.5.3. Gatifloxacin.....	116
2.3.6. K_D -Wert-Bestimmung von Gyrasehemmern an BSA mittels T_1 - Relaxationsmessung	118
2.3.6.1. Nalidixinsäure	118
2.3.6.2. Ofloxacin	119
2.3.6.3. Gatifloxacin.....	121
2.3.7. Bestimmung der „Affinitäts-Indices“	122
2.3.7.1. Nalidixinsäure	123
2.3.7.2. Ofloxacin	124
2.3.7.3. Gatifloxacin.....	125
2.3.8. Zusammenfassung der Bindungsstudien an BSA	126
 3. ZUSAMMENFASSUNG	 129
 4. SUMMARY	 133
 5. EXPERIMENTELLER TEIL	 137
5.1. β-Cyclodextrin-Einschlusskomplexe	138
5.1.1. Geräte	138

5.1.2.	Chemikalien.....	139
5.1.3.	Probenvorbereitung und Messparameter	140
5.1.3.1.	CICS-Messungen „zgpr“-Pulssequenz	140
5.1.3.2.	ROESY-Messungen „roesyph“-Pulssequenz	141
5.1.3.3.	MD-Simulationen	142
5.2.	Relaxationsstudien von Fluorchinolonen mit <i>Micrococcus luteus</i>	143
5.2.1.	Geräte	143
5.2.2.	Chemikalien.....	145
5.2.3.	Bakterienproben	145
5.2.3.1.	Bakterienstämme.....	145
5.2.3.2.	Bestimmung des Lebend/Tot-Verhältnis der Bakterien	146
5.2.3.3.	Probenvorbereitung der Bakterienzellsuspension für die Relaxationsmessung	146
5.2.4.	NMR-Relaxationsmessungen	147
5.2.4.1.	Selektive ^1H T_1 -Relaxationsmessungen	147
5.2.4.2.	^{19}F -Standard-NMR-Messungen	148
5.2.4.3.	^{19}F - T_2 -Relaxationsmessungen	150
5.3.	Proteinbindung von Fluorchinolonen an BSA	152
5.3.1.	Geräte	152
5.3.2.	Chemikalien.....	153
5.3.3.	Probenvorbereitung und Messparameter	154
5.3.3.1.	Temperaturkalibrierung	154
5.3.3.2.	Gradientenkalibrierung	154
5.3.3.3.	Diffusionsmessungen	155
5.3.3.4.	Selektive ^1H - T_1 -Relaxationsmessungen zur K_D -Wert-Bestimmung	157
5.3.3.5.	Selektive ^1H - T_1 -Relaxationsmessungen zur Bestimmung des Affinitätsindex	158
6.	ANHANG	159
6.1.	Publikationsverzeichnis	160
6.1.1.	Originalarbeiten	160

6.1.2.	Posterpräsentationen / Abstracta	160
7.	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....	163
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	164
7.2.	Symbolverzeichnis	166
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	169

1. Einleitung

1.1. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

1.1.1. Grundlagen

Die Geschichte des modernen Wirkstoffdesigns ist gleichzeitig auch die Geschichte der Arzneimittelforschung. Im Laufe der Zeit ergaben sich immer bessere Ansatzpunkte, um neue und wirksamere Arzneimittel zu finden und zu entwickeln. Bis zum heutigen Tag lassen sich vier Abschnitte unterscheiden:

- Die **Volksmedizin** reicht zurück bis zum Beginn der Menschheit. Dabei handelt es sich um das Weitergeben von überliefertem Wissen über Arzneimittel und Heilmethoden. Dieses Wissen wurde meist durch reines Ausprobieren von Pflanzen, Tierprodukten oder Stoffen mineralischen Ursprungs gewonnen oder aus der Beobachtung von Tieren, die bei Krankheit instinktiv bestimmte Pflanzen zu sich nehmen.
- 1806 gelang es *Friedrich Wilhelm Sertürner* aus dem Naturprodukt Opium das Morphin zu isolieren. Dies leitete eine Zeit der **Reinherstellung** und **Synthese** von Naturstoffen, aber auch neuer Analogsubstanzen dieser Stoffe ein. Diese wurden dann systematisch untersucht und in Tierversuchen getestet.
- Mit der Entwicklung von **Zellkultursystemen** in den 70er Jahren konnten Tierversuche teilweise ersetzt werden, um Arzneimittel *in vitro* auf ihre Wirkung zu untersuchen. Immer neuere Entwicklungen dieser Zellsysteme ermöglichen es, so genanntes „*High-Throughput-Screening*“ (HTS) durchzuführen, bei dem in kürzester Zeit tausende Substanzen pharmakologisch getestet werden können.
- In jüngster Zeit hat sich ein Paradigmenwechsel bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe eingestellt.^[1] Die moderne Wirkstoffentwicklung kann durch zwei unterschiedliche Ansatzmöglichkeiten beschrieben werden: das **strukturbasierte** (auch rationales) oder das **kombinatorische Wirkstoffdesign**. Beim kombinatorischen Wirkstoffdesign ist es das Ziel, durch Kombination und Variation verschiedenster Reste an einem chemischen Grundgerüst innerhalb kurzer Zeit möglichst viele Verbindungen zu synthetisieren und anschließend mittels HTS-Methoden zu charakterisieren. Trotz großer Substanzbibliotheken weisen die Moleküle oft nur eine ungenügende Diversität auf, um einen geeigneten Treffer zu finden. Im Gegensatz dazu beginnt das strukturbasierte Wirk-

stoffdesign mit der Suche und der Charakterisierung des Zielsystems (Enzym, Rezeptor), auf dessen Grundlage dann mit unterschiedlichen Techniken neue Leitstrukturen entwickelt werden. Dabei wird ein Zyklus bestehend aus mehreren Schritten durchlaufen (siehe Abbildung 1.1.1-1).

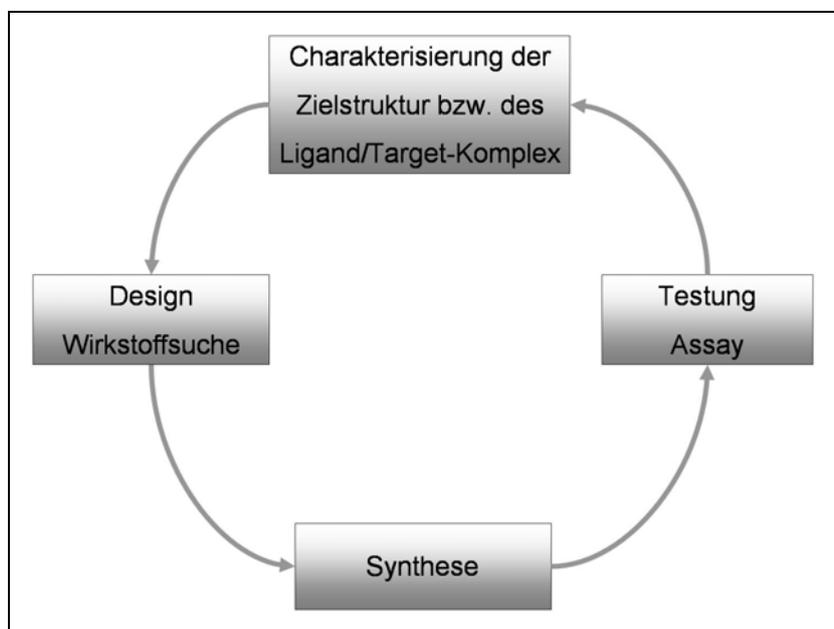


Abbildung 1.1.1-1: Schematische Darstellung der Struktur-basierten Wirkstofffindung

Der dargestellte Prozess beginnt mit der Identifizierung einer geeigneten Zielstruktur oder der Charakterisierung eines bereits bekannten Ligand/Target-Komplexes. Dieser Schritt beinhaltet meist kristallographische oder NMR-Experimente, durch die eine sehr genaue Aussage über die molekulare Anatomie der Zielstruktur gemacht werden kann. Auf dieser Stufe ist das strukturbasierte Design eng mit dem Einsatz modernster Computer-Hard- und Software verbunden. Dabei werden die zu Grunde liegenden Bindungsmechanismen mit computerunterstützten Techniken der Visualisierung, Energieberechnungen und geometrischen Überlegungen verknüpft. Aus den daraus erhaltenen Erkenntnissen können neue Wirkstoffe systematisch gesucht oder synthetisiert werden. Die gefundenen „Treffer“ werden daraufhin mittels verschiedener Assays charakterisiert bzw. beurteilt und auf diesen aufbauend das in Abbildung 1.1.1-1 dargestellte Modell weiter optimiert. Ein enormer Vorteil des rationalen Designs gegenüber dem Screening hunderttausender verschiedener Substanzen ist, dass sich mit wenigen ausgewählten Kandidaten wesentlich aufwändigere Assays durchführen lassen können.

1.1.2. NMR-Spektroskopie im Wirkstoffdesign

Die NMR-Spektroskopie kann in den meisten Phasen der strukturbasierten Wirkstofffindung zum Einsatz kommen. Während früher die NMR-Spektroskopie ausschließlich dazu genutzt wurde, um Liganden bezüglich ihrer drei-dimensionalen Struktur und Moleküldynamik zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren diese Untersuchungen immer mehr auf das Zielsystem ausgedehnt. Auch die Beschreibung des Ligand/Ziel-Komplexes ist mit neueren Messtechniken möglich und wird immer häufiger angewandt. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Möglichkeiten im NMR-Screening gegeben werden.

Charakterisierung des Zielmoleküls:

Für sämtliche Messmethoden, die zur Beschreibung eines Zielmoleküls (meist ein Protein) beitragen sollen, ist es unerlässlich, die Zielstruktur mit verschiedenen Isotopen (^{15}N , ^{13}C oder ^2H) zu markieren („Labeling“) bzw. anzureichern, da aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit dieser Isotope auch die relative Empfindlichkeit bei NMR-Experimenten sehr klein ist (siehe Tabelle 1.2.2-1). Dabei können verschiedene Labeling-Muster angewendet werden.^[2,3,4] Als geläufigste Methode wird das gesamte Zielmolekül markiert. Andere Möglichkeiten bestehen nur in der Markierung der betroffenen Domäne oder einzelner Aminosäuren des Proteins. Diese Labeling-Techniken machten es der NMR-Spektroskopie möglich, eine dritte Dimension zu einem zweidimensionalen ^1H - ^1H -Korrelationspektrum hinzuzufügen, um die Zuordnung der jeweiligen Heterokerne zu ermöglichen.

Nach der Ermittlung der Primärstruktur des Zielproteins können sekundäre Strukturelemente (wie α -Helices und β -Faltblatt) über die skalaren Kopplungen, über die chemischen Verschiebungen oder mit sequentiellen NOE-Messungen bestimmt werden.

Die Tertiärstruktur eines Proteins ist im Allgemeinen erst durch eine sehr große Anzahl von NOE-Kontakten möglich.

Jede der erwähnten strukturellen Informationen, die NMR-spektroskopisch über ein Protein erhalten werden können, ist auch mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse möglich. Die NMR bietet jedoch einige Vorteile gegenüber dieser Analysetechnik:

In der NMR-Spektroskopie liegt das Protein in seiner gelösten Form vor. Dieses gibt die wahren physiologischen Bedingungen viel besser wider als die Untersuchung

eines einzelnen Kristalls. Da außerdem nicht alle Proteine kristallisiert werden können (vor allem glykosylierte Proteine), ist die NMR-Spektroskopie häufig die einzig anwendbare Methode. Mit der NMR lassen sich außerdem moleküldynamische Eigenschaften des Zielmoleküls untersuchen,^[5] was vor allem bei der Flexibilitätsuntersuchung von Kohlenhydratresten von Glycoproteinen zum Einsatz kommt. Diese Proteinarten können bei Röntgenstrukturanalysen meist nur ungenügend aufgelöst werden.

NMR-Screening:

Auch in der Phase des Suchens nach passenden Liganden und in der Beurteilung der Bindung wird sehr häufig die NMR-Spektroskopie genutzt. Mehrere NMR-Screening-Techniken werden zu diesem Zweck eingesetzt, wobei einige von diesen auch im „*High Throughput*“-Verfahren verwendet werden können. Bindet ein Ligand an ein Makromolekül, ändert sich die scheinbare molekulare Masse und der hydrodynamische Radius dieses Liganden dramatisch. Diese Änderungen können durch die Bestimmung verschiedener NMR-Parameter detektiert werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Effekte, die durch die Bindung eines Liganden an ein Makromolekül eintreten: globale und lokale Effekte. Die erstgenannten sind größenabhängig und daher nur zur Beobachtung des Liganden geeignet (siehe Abbildung 1.1.2-1). Lokale Effekte sind begrenzt auf die Bindungsregion und können sowohl für den Liganden als auch für das Zielmolekül erfasst werden.

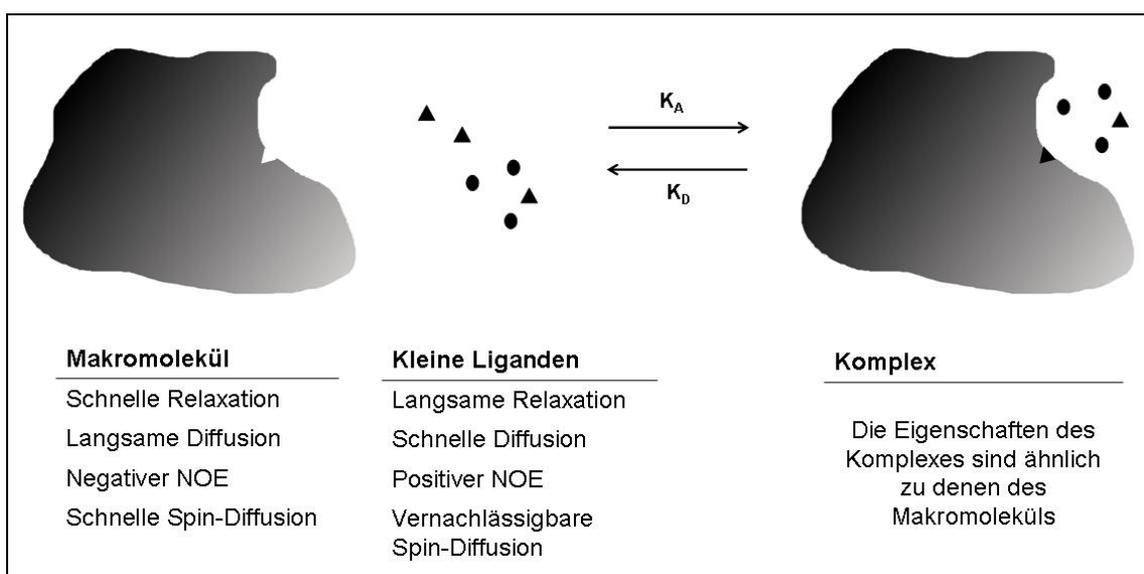


Abbildung 1.1.2-1: Globale Effekte, die durch die Bindung eines Liganden an ein Makromolekül entstehen.

Relaxations- und Diffusionsmessungen können die Bindung charakterisieren, erlauben es aber nicht eine Aussage über die Struktur dieser Bindung zu machen.^[6] Demgegenüber können Transfer-NOE-^[7], SAR^[8] (structure activity relationship)- und STD^[9] (Sättigungstransfer-Differenz)-Experimente nicht nur die Bindung nachweisen, sondern auch genau die Bindungsepitope bestimmen.

1.2. Theoretische Grundlagen der NMR-Spektroskopie

„Commonplace as such experiments have become in our laboratories, I have not yet lost that sense of wonder and of delight, that this delicate motion should reside in all ordinary things around us. Revealing itself only to him who looks for it.”

E. M. Purcell, Rede anlässlich der Nobelpreisverleihung 1952

1.2.1. Einführung

Die NMR-Spektroskopie stellt heutzutage eine der wichtigsten spektroskopischen Methoden dar. Die erste Beobachtung der magnetischen Kernresonanz wurde 1939 durch *Rabi et al.*^[10] gemacht. Das Verfahren der Kernresonanz-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) wurde jedoch erst 1946 von den Arbeitsgruppen um *Bloch*^[11] und *Purcell*^[12] entwickelt, für das sie sich 1952 den Nobelpreis für Physik teilten. Ende der 50er Jahre waren die ersten Spektrometer kommerziell erhältlich. Seit diesen Tagen hat sich die NMR-Spektroskopie zu einem leistungsstarken Werkzeug entwickelt und wird in zahlreichen Bereichen wie z. B. der Physik, der organischen und anorganischen Chemie, der Biochemie, der Medizin, und der Lebensmittelchemie verwendet. Die wichtigsten Entwicklungen umfassen nicht nur die der Hardware – moderne Kryomagnete erreichen eine Flussdichte von über 21 T, während die ersten Spektrometer bei 1,41 T lagen – sondern auch die Messtechniken haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte extrem weiterentwickelt. So löste Mitte der 60er Jahre die Impuls-Spektroskopie (*Pulse Fourier Transform Spectroscopy*, *PFT-Spectroscopy*) die *Continuous Wave* (CW)-Spektroskopie ab, die mit variabler Senderfrequenz ν_1 bei konstanter Feldstärke B_0 arbeitete. Die PFT-Spektroskopie war eng mit den Entwicklungen in der Computertechnik verknüpft, mit der es erstmals möglich war, alle Kerne einer Sorte mit einem Hochfrequenzpuls gleichzeitig

anzuregen und die erhaltene zeitabhängige Antwort mittels Fourier-Transformation in ein Spektrum in der Frequenzdomäne umzuwandeln. *R. R. Ernst*^[13], einer der Pioniere der PFT-Spektroskopie, erhielt 1991 unter anderem für diese Arbeit den Nobelpreis für Chemie. *Ernst* war außerdem an der Entwicklung eines weiteren Meilensteins der NMR-Spektroskopie beteiligt: der multidimensionalen NMR-Spektroskopie bei der neben der eigentlichen Frequenzachse mindestens noch eine weitere besteht, die auch für einen anderen Kern (Heterokern) stehen kann. Die zweidimensionalen Techniken setzen eine Kopplung der Kerne voraus, wobei es sich nicht um eine skalare Kopplung handeln muss, sondern - wie bei den NOE-Experimenten - auch dipolarer Natur sein kann. Diese Techniken führten in den letzten Jahren zu immer genaueren Analysemethoden, mit denen selbst hochkomplexe Molekülstrukturen aufgeklärt werden können (siehe Kapitel 1.1.2).

1.2.2. Der Kerndrehimpuls und der magnetische Vektor

Der Atomkern besteht aus Neutronen und Protonen. Drei wichtige Kennzahlen beschreiben einen Atomkern: die Atomzahl, die Massenzahl und Spinquantenzahl. Die Atomzahl **Z** gibt die Anzahl der Protonen an, die der Kern enthält. Mit dieser und der Massenzahl lässt sich auf die Neutronenzahl schließen. Die Kernspinquantenzahl **I** parametrisiert das Spinnmoment der Kerne und ist gleich oder größer null. Auch ist **I** immer ein Vielfaches von ½.

Alle Kerne mit einer Kernspinquantenzahl von $I > 0$ haben einen Eigendrehimpuls **P**, der gequantelt ist. **P** kann beschrieben werden durch Gleichung 1.2.2-1:

$$\text{Gleichung 1.2.2-1} \quad P = \sqrt{I(I+1)} \cdot \hbar$$

Mit diesem Eigendrehimpuls ist die Ausbildung eines magnetischen Moments **μ** proportional verknüpft:

$$\text{Gleichung 1.2.2-2} \quad \mu = \gamma \cdot P$$

Der Proportionalitätsfaktor γ wird auch als *magnetogyrisches Verhältnis*[†] bezeichnet.

[†] Auch die Bezeichnung *gyromagnetisches Verhältnis* wird oft verwendet, wobei diese Bezeichnung nicht der IUPAC-Empfehlung entspricht.

Kerne mit einer geraden Anzahl an Protonen und Neutronen besitzen die Kernspinzquantenzahl $I = 0$ und zeigen daher auch kein kernmagnetisches Moment (z. B. ^{12}C). Werden magnetische Momentvektoren in ein externes Magnetfeld B_0 gebracht, richten sich die Vektoren relativ zum Feld aus, wobei die diskrete Anzahl an Zustände $(2I+1)$ entsteht. Die magnetische Quantenzahl (oder Orientierungsquantenzahl) m nimmt dabei Werte zwischen $-I$ und $+I$ an. Zur Vereinfachung soll im Folgenden ein Kern mit der Spinzquantenzahl $\frac{1}{2}$ betrachtet werden, für den somit die zwei Zustände $m = +\frac{1}{2}$ und $m = -\frac{1}{2}$ entstehen. Die Komponenten des magnetischen Moments in Feldrichtung z lassen sich damit wie folgt beschreiben:

Gleichung 1.2.2-3
$$\mu_z = m \cdot \gamma \cdot \hbar$$

In vielen Basisdefinitionen zur NMR-Spektroskopie wird der magnetische Vektor mit dem Bild einer Kompassnadel im externen Magnetfeld erklärt, was jedoch nicht die korrekten Zustände des Vektors im magnetischen Feld beschreibt. Die Spinpolarisationsachse präzidiert auf einem Kegel, der immer denselben Winkel zwischen Spinachse und dem externen Feld beibehält (siehe Abbildung 1.2.2-1). Spins verhalten sich auf diese Art und Weise, da sie neben dem Drehimpuls auch noch das magnetische Moment besitzen, dessen dynamische Eigenschaften maßgeblich vom Drehimpuls beeinflusst werden. Die Frequenz, mit der der Vektor präzidiert, wird auch als *Larmorfrequenz* bezeichnet und ist definiert als:

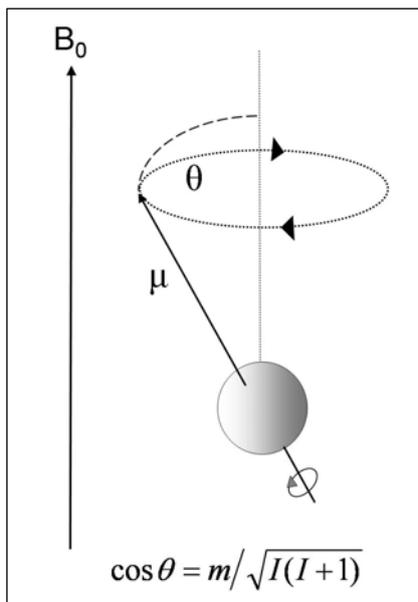


Abbildung 1.2.2-1: Spin-Präzession im magnetischen Feld B_0 für den Spinzustand $m=+\frac{1}{2}$

$$\omega = -\gamma \cdot B_0 \text{ rad s}^{-1} \quad \ddagger$$

Gleichung 1.2.2-4

$$\nu = \frac{-\gamma \cdot B_0}{2\pi} \text{ Hz}$$

Die Energie eines Spins im Magnetfeld ist gegeben durch:

$\ddagger 1^\circ = (\pi/180) \text{ rad}$

Gleichung 1.2.2-5
$$E = -\mu_z \cdot B_0 = -m \cdot \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

Der energetisch günstigere Zustand tritt hier demnach für $m = +\frac{1}{2}$ ein (α -Zustand) entsprechend in Richtung des externen Magnetfelds B_0 , während der energiereichere β -Zustand antiparallel zu B_0 steht. Die Energiedifferenz, die sich für beide Spin-zustände ergibt, beträgt demnach:

Gleichung 1.2.2-6
$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$$

In der NMR-Spektroskopie werden nicht freie Kernmomente untersucht, sondern eine große Anzahl Kerne mit einem magnetischen Moment (makroskopische Magnetisierung). Die Gesamtheit der Kernmomente verteilt sich im äußeren Magnetfeld auf die Energiezustände gemäß der Boltzmann-Verteilung:

Gleichung 1.2.2-7
$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{k \cdot T}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k \cdot T} = 1 - \frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{k \cdot T}$$

k ist die Boltzmann-Konstante ($1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), T die absolute Temperatur in K.

Die Darstellung dieser makroskopischen Magnetisierung M_0 lässt sich als Doppelpräzisionskegel darstellen, bei dem sich die z-Magnetisierung sämtlicher Momentvektoren aufaddiert.

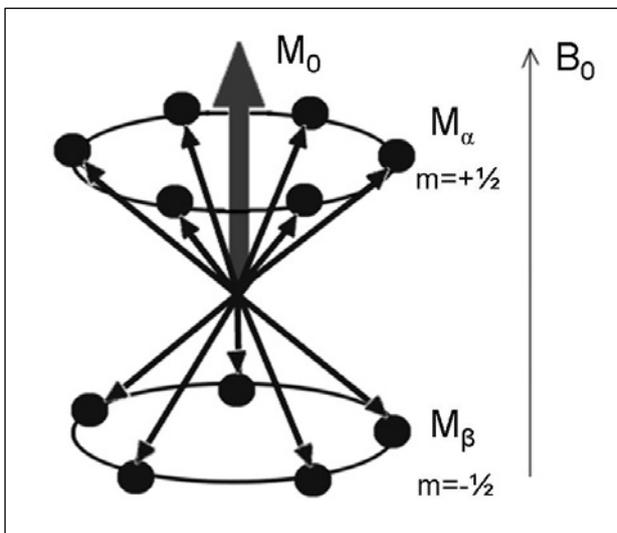


Abbildung 1.2.2-2: Darstellung der Besetzungsverteilung auf dem Doppelpräzisionskegel.

Wie in Gleichung 1.2.2-7 beschrieben, befindet sich stets ein Überschuss an Kernen im energiegünstigen α -Zustand. Daher steht der makroskopische Gesamtvektor genau in Feldrichtung von B_0 .

Bei den Beschreibungen der folgenden Pulsexperimente und den dazugehörigen Vektorverläufen wird immer die Darstellung dieses Gesamtvektors verwendet.

Der Überschuss an Kernen, die im energieärmeren Zustand vorliegen, ist sehr gering. Er liegt auch beim Einsatz von hohen Feldstärken nur im Bereich von $1:10^4$.

Dennoch ist diese Verteilung – neben der natürlichen Häufigkeit des untersuchten Isotops – wesentlich an der Sensitivität des NMR-Signals beteiligt. In der Gesamtheit bedeutet dies, dass je größer das magnetogyrische Verhältnis γ , je größer die Feldstärke B_0 und je geringer die Temperatur ist, desto höher wird die Sensitivität. Die wichtigsten Kerne mit einem Kernspin von $I=1/2$ sind in Tabelle 1.2.2-1 dargestellt.

Tabelle 1.2.2-1: Physikalische Eigenschaften einiger ausgewählter Kerne^[14,15,16]

Kern-Isotop	Natürliche Häufigkeit [%]	Relative Empfindlichkeit [§]	Magnetogyrisches Verhältnis [10 ⁷ rad T ⁻¹ s ⁻¹]	NMR-Frequenz [MHz] bei B ₀ =2,3488 T
¹ H	99,985	1,00	26,7519	100,000
¹³ C	1,108	0,0159	6,7283	25,144
¹⁵ N	0,37	0,00104	-2,7126	10,133
¹⁹ F	100	0,83	25,1815	94,077
²⁹ Si	4,70	0,00784	-5,3190	19,865
³¹ P	100	0,0663	10,8394	40,481

1.2.3. Die Entstehung des NMR-Signals

Für die Entstehung eines NMR-Signals ist ein Zusatzmagnetfeld \mathbf{B}_1 definierter Energie notwendig, wobei B_1 senkrecht (transversal) auf B_0 stehend eingestrahlt wird. Die Spins reagieren auf die Wechselwirkung des statischen Magnetfelds und des transversalen Magnetfelds in bestimmter Art und Weise. Das eingestrahlte Magnetfeld muss dabei die folgende Resonanzbedingung (Gleichung 1.2.3-1) erfüllen:

Gleichung 1.2.3-1
$$\nu_1 = \nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \cdot B_0$$

Strahlt man also ein Wechselfeld ein, das genau der Larmorfrequenz entspricht, wird Energie absorbiert und es werden Übergänge zwischen α -Zustand und β -Zustand induziert.

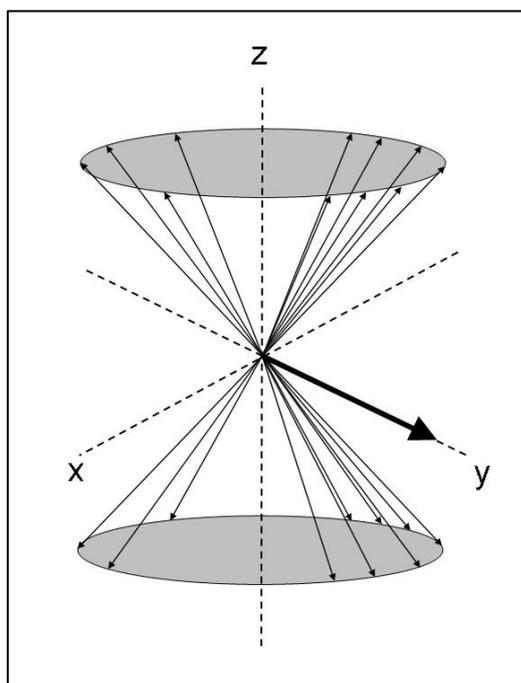
[§] Entnommen aus dem Bruker Almanac 2007, Molare Empfindlichkeit bei gleicher Kernanzahl und gleicher Feldstärke bezogen auf ¹H.

Um die Vorgänge während eines Pulses besser beschreiben zu können, und somit ein einfacheres Vektormodell einer Pulssequenz darzustellen, wird das normale Koordinatensystem (x, y, z) durch eines ersetzt, das mit der Frequenz des B_1 -Feldes um die z -Achse rotiert (x', y', z') . Der Pulswinkel Θ , den der resultierende Magnetisierungsvektor nach dem Puls gegenüber der z -Achse einnimmt, ergibt sich aus der Feldstärke des B_1 -Feldes und der Pulsdauer τ_P .

Gleichung 1.2.3-2
$$\Theta = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau_P$$

Auf zwei der wichtigsten Pulse in der NMR-Spektroskopie soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Der **180°-Puls** kehrt die Besetzungszustände der Spins um, d. h. es befinden sich



nach dem Puls mehr Spins im energiereicheren β -Zustand als im α -Zustand. Der makroskopische Gesamtvektor steht dementsprechend antiparallel zum externen Magnetfeld B_0 .

Nach einem **90°-Puls** befinden sich exakt gleich viele Spins in beiden Energiezuständen, d. h. das System ist in einem gesättigten Zustand. Jedoch entsteht aufgrund der Bündelung der Spins ein makroskopischer Gesamtvektor in der x - y -Ebene. Diese Bündelung der Spins in Phase bezeichnet man als Phasenkohärenz (siehe Abbildung 1.2.3-1).

Abbildung 1.2.3-1: Darstellung der Phasenkohärenz nach einem 90°_x -Puls

Das in einem Spektrometer detektierte Signal hängt von der Quermagnetisierung in der x - y -Ebene ab. Der entstehende FID (*free induction decay*) wird als zeitabhängige, oszillierende Spannung aufgenommen, die aufgrund von Relaxationsprozessen der Spins (siehe Kapitel 1.2.5.2) fortlaufend abnimmt. In dieser zeitabhängigen Form sind die Daten von geringem Nutzen, da der registrierte FID die Überlagerungen der FID's aller magnetisch nicht äquivalenten Kerne darstellt. Aus diesem Grund wird die

Zeit-Domäne [$f(t)$] mittels Fourier-Transformation (siehe Gleichung 1.2.3-3) in eine Frequenz-Domäne [$f(\omega)$] umgewandelt, auf deren Achse dann die Signale der Kerne gemäß ihrer Anregungsfrequenz aufgetragen sind.

Gleichung 1.2.3-3

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{i\omega t} dt$$

Der Term $e^{i\omega t}$ kann auch als $\cos(\omega t) + i \sin(\omega t)$ geschrieben werden, wobei in dieser Form deutlich wird, dass die Umformung in zwei Frequenz-Domänen resultiert, die genau 90° phasenverschoben vorliegen. Diese beiden Domänen bezeichnet man als „realen“ und „imaginären“ Anteil des Spektrums.

1.2.4. Das NMR-Spektrometer

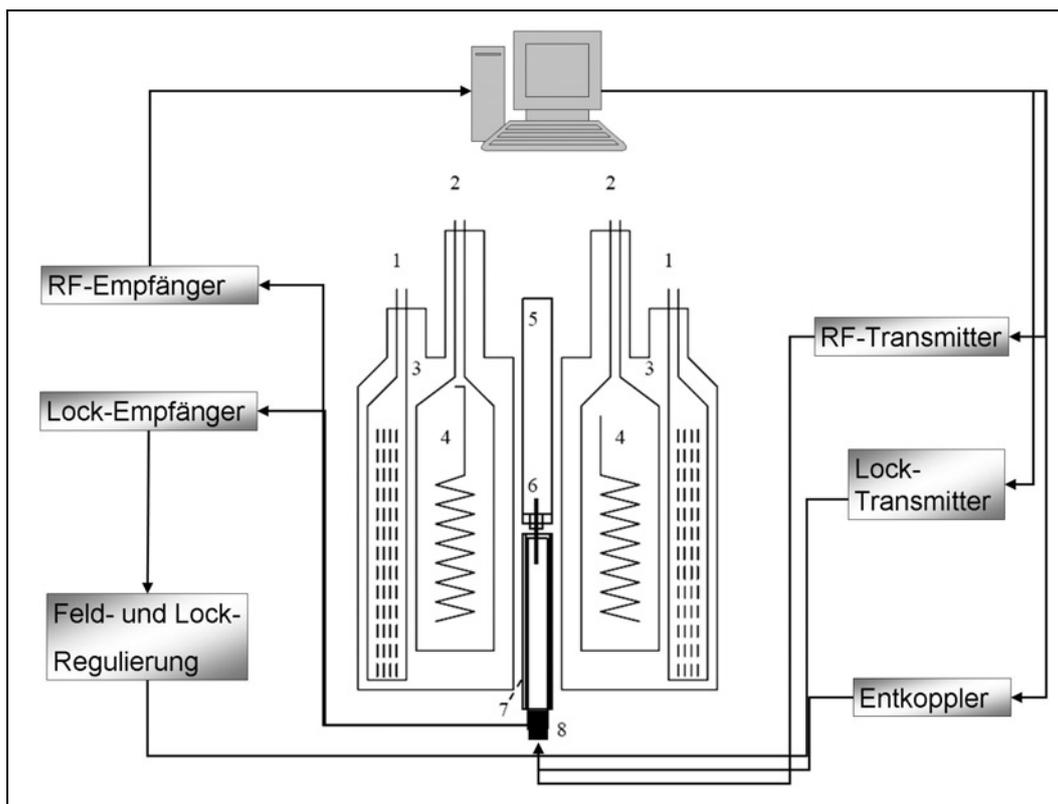


Abbildung 1.2.4-1: Schematischer Aufbau eines NMR-Spektrometers; (1) Einfüllöffnung für flüssigen Stickstoff; (2) Einfüllöffnung für flüssiges Helium; (3) Hochvakuum; (4) Magnetspulen in flüssigem Helium; (5) Probenschacht; (6) Probe; (7) Shim-Einheit; (8) Probenkopf

Der schematische Aufbau eines modernen NMR-Spektrometers ist in Abbildung 1.2.4-1 dargestellt. Die fundamentale Voraussetzung für hochauflösende NMR-

Spektroskopie ist eine supraleitende Magnetspule aus einer Niob-Legierung. Diese Spule ist in einem Heliumbad (4 K) eingelagert, welches durch flüssigen Stickstoff (77 K) gekühlt wird. Das ganze System ist von einem Hochvakuum umgeben. Diese Gesamtheit ist ein extrem effizientes System, das – einmal unter Spannung gesetzt – für viele Jahre ein stabil hohes Magnetfeld aufrechterhalten kann.

Die zentrale Bohrung des Dewars beherbergt den Probenschacht und im unteren Teil weitere Spulen, die als Shim-System bezeichnet werden. Mit diesen Spulen ist es möglich, kleine lokale Magnetfelder zusätzlich auf das große externe Magnetfeld einwirken zu lassen und dieses somit abzugleichen, um störende Magnetfeldinhomogenitäten auszumitteln.

Das Herzstück jedes Spektrometers ist der Probenkopf, der Sender-, Empfänger-, Entkoppler-, Lock- und Gradientenspulen sowie den Vorverstärker enthält. Die Sendeeinheit liefert die für die Experimente benötigten Frequenzen, wobei alle Frequenzen von einer festen, quarzstabilisierten Frequenz abgeleitet sind.

Der Empfänger muss Frequenzen aufnehmen, die im Bereich des NMR-Übergangs von einigen hundert MHz liegen. Aufgrund der chemischen Verschiebung (siehe Kapitel 1.2.5.1) liegen diese Frequenzen jedoch nur wenige kHz auseinander. Da in der NMR-Spektroskopie weniger die absolute Larmor-Frequenz der Kerne interessiert, sondern vielmehr die chemische Verschiebung der Kerne, wird die absolute Frequenz auf ein Referenzsignal bezogen und nur diese Frequenzdifferenz weiter verarbeitet.

Der Lock-Transmitter bzw. der Empfänger sind notwendig, um das Feld auch während sehr langen Messungen konstant zu halten. Dies geschieht in modernen Spektrometern über das Überwachen der Deuterium-Resonanz des Lösungsmittels. Dieses Deuteriumsignal wird durch ein zweites, separates „Spektrometer“ erfasst und verarbeitet. Zu diesem gehören eine ^2H -Sende- und eine ^2H -Empfängereinheit, ein Verstärker und ein Detektor, die parallel zu den Hauptkanälen arbeiten und das Locksignal erstellen. Anhand von Abweichungen dieses Locksignals durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes kann das externe Magnetfeld angepasst und stabilisiert werden. Neben der primären Senderspule existiert in vielen Probenköpfen noch eine zweite (äußere) Spule, um die simultane Anregung eines weiteren anderen Kernes zuzulassen.

Die entstehenden elektrischen, analogen NMR-Signale werden über einen Analog-Digital-Umwandler (ADC) in ein digitales Format gebracht, welches von einem PC verarbeitet werden kann. Der Digitalisierungsprozess des ADC bestimmt maßgeblich die Sensitivität des Systems.

1.2.5. Grundlagen der verwendeten Screeningparameter

1.2.5.1. Chemische Verschiebung

In Molekülen sind alle Atomkerne von Elektronen und anderen Kernen umgeben, die die Resonanzfrequenz des beobachteten Kerns beeinflussen. Dabei handelt es sich um einen zweistufigen Prozess, bei dem das externe Magnetfeld B_0 Ströme der Elektronen erzeugt, die wiederum ein kleines lokales Magnetfeld (induziertes Magnetfeld $B_{\text{induziert}}$) erzeugen. Der Kernspin erfährt daher die Summe aus externem Feld und diesem induzierten Magnetfeld.

$$\text{Gleichung 1.2.5.1-1} \quad B_{\text{effektiv}} = B_0 + B_{\text{induziert}}$$

Typischerweise ist dieses induzierte Feld etwa um den Faktor 10^{-4} kleiner als das B_0 -Feld. Dementsprechend ist die Stärke von $B_{\text{induziert}}$ direkt proportional vom eingesetzten, externen B_0 -Feld. Es gilt folgender Zusammenhang:

$$\text{Gleichung 1.2.5.1-2} \quad B_{\text{induziert}} = \sigma \cdot B_0$$

σ ist die Abschirmungskonstante und charakterisiert die Abschirmung des Kernes durch die Elektronenhülle. Damit wird Gleichung 1.2.5.1-1 zu:

$$\text{Gleichung 1.2.5.1-3} \quad B_{\text{effektiv}} = B_0(1 - \sigma)$$

Durch die Entstehung dieses effektiven Feldes ändert sich auch die Resonanzfrequenz mit Gleichung 1.2.3-1 und Gleichung 1.2.5.1-3 des beobachteten Kernspins zu:

$$\text{Gleichung 1.2.5.1-4} \quad \nu_i = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_{\text{effektiv}} = \frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0(1 - \sigma)$$

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass magnetisch nicht äquivalente Kerne im Spektrum ein getrenntes Resonanzsignal ergeben.

Die Abschirmungskonstante σ lässt sich als Term mit mehreren Beiträgen beschreiben, die im Folgenden genauer erklärt werden sollen.

Einfluss der Ladungsdichte

Bei Kernen mit kugelsymmetrischer Ladungsverteilung lässt sich der Anteil der Ladungsdichte auf die Abschirmung als Modell eines kreisenden Elektrons berechnen (s-Orbital). Dieser Abschirmungsterm wird als diamagnetischer Abschirmungsterm σ_{dia} bezeichnet. Das Modell spiegelt jedoch die Ladungsverteilung in Molekülen nicht wider, da hier keine Kugelsymmetrie vorherrscht (p-Orbitale). Der paramagnetische Anteil σ_{para} korrigiert diese Abweichung, da er den Einfluss der nicht-kugelsymmetrischen Ladungsverteilung berücksichtigt. Beide Anteile besitzen entgegengesetzte Vorzeichen. Bei leichten Atomen überwiegt σ_{dia} , wobei der Einfluss von σ_{para} umso größer wird, je schwerer die Atome werden. σ_{para} bleibt aber stets kleiner als der diamagnetische Anteil, sodass die Gesamtheit der Abschirmungskonstante immer größer null bleibt.

Anisotropieeffekte

Die Elektronenverteilung in einer chemischen Bindung ist von unsymmetrischer Form. Die magnetischen Suszeptibilitäten, d. h. die durch das äußere Magnetfeld induzierte Magnetisierung, sind für die drei Raumrichtungen unterschiedlich. Dies bedeutet, dass die Abschirmung eines Kerns von seiner geometrischen Anordnung innerhalb der Verbindung abhängt. Für Gruppen axialsymmetrischer Ladungsverteilungen, wie es bei Bindungen der Fall ist, existieren zwei magnetische Suszeptibilitäten χ , wobei χ_{\parallel} parallel zur Bindungsachse und χ_{\perp} senkrecht zu dieser Achse steht. Nach *McConell* gilt für den Einfluss des gemittelten Anisotropieeffektes:

$$\text{Gleichung 1.2.5.1-5} \quad \bar{\sigma}_N = \frac{1}{12\pi \cdot r^4} (\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}) \cdot (1 - 3 \cos^2 \Theta)$$

r ist hier der Abstand der Kerne vom Zentrum des Punktdipols, Θ ist der Winkel zwischen der Verbindungslinie Kern-Zentrum und der Richtungsachse des induzierten magnetischen Moments (siehe Abbildung 1.2.5.1-1).

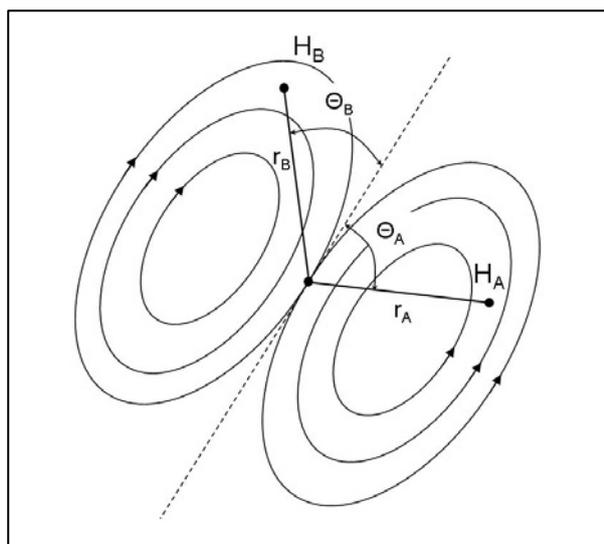


Abbildung 1.2.5.1-1: Abschirmung von den Kernen H_A und H_B im Dipolfeld einer magnetisch anisotropen Nachbargruppe

Daraus lassen sich zwei Erkenntnisse gewinnen. Zum einen hängt der anisotrope Abschirmungseffekt nur von der Geometrie des Moleküls ab und ist unabhängig vom beobachteten Kern. Zum anderen ist bei einem Winkel von $\Theta = 54,7^\circ$ der anisotrope Abschirmungseffekt gleich null. Dies wird in der Festkörper-NMR-Spektroskopie genutzt (*magic angle*), um die Linienbreite, die in der Festkörper-NMR vor allem durch die Anisotropie begründet ist, extrem zu reduzieren und so hochauflösende Spektren zu erhalten.

Ringstromeffekt

Dieser Effekt hat in der ^1H -NMR-Spektroskopie vor allem Einfluss auf Protonen, die an einem aromatischen Ringsystem hängen. Er ist verantwortlich für die geringe Abschirmung dieser Protonen, die damit im Tieffeld bei ca. 7 - 8 ppm erscheinen.

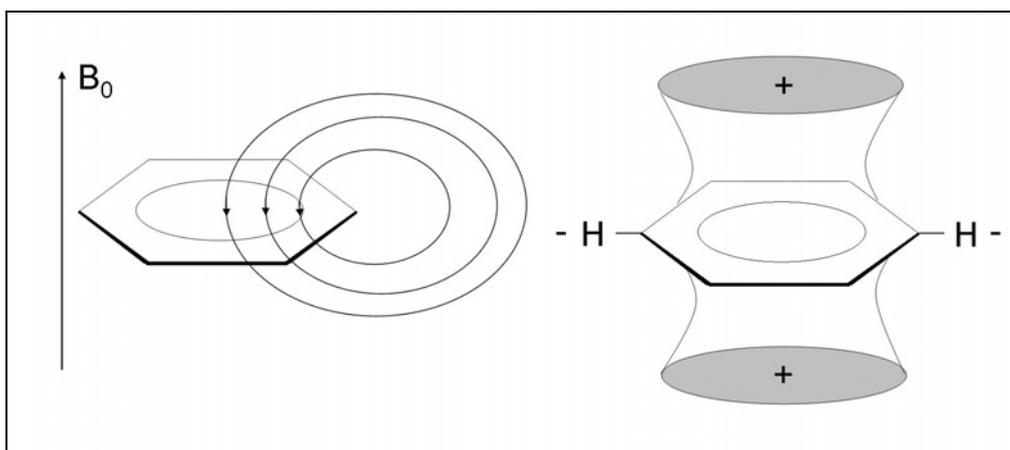


Abbildung 1.2.5.1-2: Schematische Darstellung des Ringstromeffektes in aromatischen Verbindungen mit Bereichen höherer (+) und niedrigerer (-) Abschwächung

Das äußere Magnetfeld B_0 induziert einen ringförmigen Strom des aromatischen π -Elektronensystems, welches wiederum ein Magnetfeld erzeugt. Dieses Magnetfeld

steht ober- und unterhalb des Ringes dem äußeren Magnetfeld entgegen, wobei es dieses am Ort der Protonen verstärkt.

Elektrischer Feldeffekt

Sind polare Gruppen im Molekül vorhanden (z. B. Carbonyl- oder Nitrogruppen), kommt es zum Aufbau eines intramolekularen elektrischen Feldes und somit zu Veränderungen der Elektronendichte um den betreffenden Kern. Diese Veränderung beeinflusst auch die magnetische Abschirmung.

Intermolekulare Wechselwirkungen

Zu diesem Faktor der Abschirmungskonstante gehören Wasserstoffbrücken und Lösungsmittelleffekte. Protonen, die an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt sind, werden extrem schwach abgeschirmt, weshalb sie teilweise im Bereich größer als 10 ppm erscheinen.

Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit dem gelösten Analyten können zu einer Verschiebung der Resonanzsignale führen, weshalb das Lösungsmittel stets mit angegeben werden muss.

1.2.5.2. Spin-Gitter-Relaxation (Longitudinale Relaxation, T_1 -Relaxation)

Die Spin-Gitter-Relaxation beschreibt den Wiederaufbau der z-Magnetisierung nach transversaler Magnetisierung. Nach einem 90° -Puls werden die beiden Energieniveaus gleich besetzt, nach einem 180° -Puls kehren sich das ursprüngliche Besetzungsverhältnis und damit auch die Magnetisierung um ($M_z = -M_0$). Nach der Energieeinstrahlung stellt sich der ursprüngliche Gleichgewichtswert wieder ein. Die Geschwindigkeitsordnung, die diesem Prozess folgt, hat *F. Bloch* durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$\text{Gleichung 1.2.5.2-1} \quad \frac{dM_z}{dt} = \frac{(M_0 - M_z)}{T_1}$$

M_0 ist der magnetische Gesamtvektor im Gleichgewicht und T_1^{-1} die eigentliche Geschwindigkeitskonstante dieses nach erster Ordnung ablaufenden Relaxationsprozesses.

Die longitudinale Relaxation ist stets auch mit einer Energieabgabe der (nach dem angelegten Puls) angeregten Spins verbunden. Diese Energie wird an die Umgebung (Gitter) in Form von Wärme abgegeben, woher auch der Name „Spin-Gitter-Relaxation“ herrührt. Da Spins nach einem 90°-Puls wieder voll relaxieren sollten, bevor ein neuer Scan aufgenommen wird, muss eine Wartezeit von mindestens $5T_1$ eingehalten werden, weshalb dies den zeitaufwändigsten Teil eines NMR-Experimentes darstellen kann.

Der Relaxationsprozess findet nicht spontan statt. Um die nötigen Spin-Übergänge anzuregen, ist ein geeignetes fluktuierendes Feld notwendig. Dieses Feld muss genau mit der Larmorfrequenz des angeregten Kerns übereinstimmen. Grundsätzlich existieren vier Mechanismen, die ein solches Feld bewirken können: Dipol-Dipol-(DD)-Wechselwirkung, Spin-Rotations-Wechselwirkung, Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) und quadrupolare Mechanismen.

Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Dipolare Relaxation)

Der wichtigste Relaxationsmechanismus für die meisten Spins mit $I = \frac{1}{2}$ entsteht durch dipolare Wechselwirkungen zwischen Spins. Dies ist auch die Quelle für den Kern-Overhauser-Effekt (siehe Kapitel 1.2.5.4). Jeder Dipol besitzt ein Zusatzmagnetfeld. Wenn sich zwei Dipole annähern, interagieren auch ihre Zusatzmagnetfelder. Als Vereinfachung kann hier ein Stabmagnetmodell angenommen werden (siehe Abbildung 1.2.5.2-1). Durch die Brownsche Molekularbewegung ändert sich die Ausrichtung des Zusatzmagnetfelds eines Dipols und damit auch die Beeinflussung des Nachbarspins.

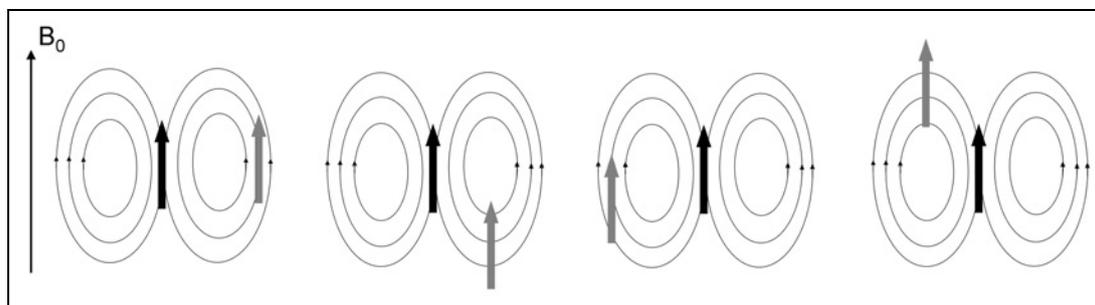


Abbildung 1.2.5.2-1: Dipol-Dipol-Relaxations-Mechanismus. Durch Veränderung der Lage des grauen Spins im Magnetfeld des schwarzen Spins ändert sich damit auch der Spin-Übergang

Bewegen sich die Moleküle mit einer Frequenz, die der Larmorfrequenz entspricht, kann der beobachtete Spin in Resonanz mit dem Zusatzmagnetfeld treten und Energie an das Gitter abgeben. Es kommt zur Relaxation.

Der Anteil der dipolaren Relaxation ist abhängig vom magnetogyrischen Verhältnis der beteiligten Kerne, vom Abstand der Kerne und von der Korrelationszeit t_C des Moleküls. Definiert ist t_C als die Zeit, die ein Molekül benötigt, um sich in einer isotropen Bewegung um einen Radian zu drehen. Damit ist auch die Abhängigkeit der Relaxationszeit von der Viskosität des Lösungsmittels gegeben.

Spin-Rotations-Wechselwirkung

Moleküle oder Gruppen von Molekülen, die sehr schnell rotieren, weisen ebenfalls ein Zusatzmagnetfeld auf, das durch die sich in Drehung befindlichen Bindungselektronen oder Ladungen verursacht wird. Bei allen effektiven Stößen ändert sich die Rotation der Gruppe und damit auch die Größe des lokalen Zusatzfeldes. Liegen die Stoßfrequenzen in der Größenordnung der Larmorfrequenz, so kann das Spinsystem über diesen Mechanismus relaxieren.

Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA)

Wie in Kapitel 1.2.5.1 bereits beschrieben, ist die Elektronenverteilung in chemischen Bindungen nicht symmetrisch. Dadurch ist das lokale Feld, dem ein Spin unterliegt, abhängig von der Orientierung der Bindung im externen Magnetfeld. Da sich die Moleküle in Lösung sehr schnell umorientieren, wird die CSA gemittelt, sodass nur eine Frequenz für einen Spin beobachtet wird. Das fluktuierende Feld kann aber bei ausreichender Stärke einen Relaxationsprozess auslösen. Dies tritt vor allem bei Molekülen mit einem großen Bereich der chemischen Verschiebung ein (^{19}F und ^{31}P).

Skalare Kopplungen

Wenn ein Kern an einen anderen Kern gebunden ist, der seinen Spinzustand extrem schnell ändert, entsteht dadurch ein oszillierendes Zusatzmagnetfeld. Ein Grund für die schnelle Änderung des Spinzustands können benachbarte Kerne mit einem magnetischen Kernquadrupolmoment sein.

Die Grundlagen der experimentellen Bestimmung von longitudinalen Relaxationszeiten werden in Kapitel 2.2.3.1 ausführlich besprochen.

1.2.5.3. Spin-Spin-Relaxation (Transversale Relaxation, T_2 -Relaxation)

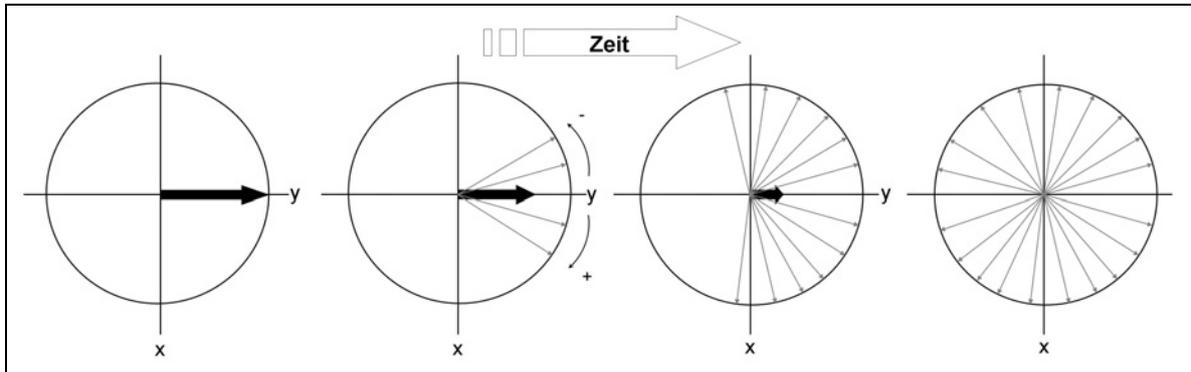


Abbildung 1.2.5.3-1: Abnahme der makroskopischen Magnetisierung in y-Richtung durch transversale Relaxation

Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, liegt nach einem 90°_x -Puls eine Sättigungssituation vor, wobei eine Phasenkohärenz der Spins auftritt, die einen Gesamtvektor auf der y-Achse im rotierenden Koordinatensystem hervorruft. Der Gesamtvektor bleibt nur auf dieser Achse (die longitudinale Relaxation außer Acht gelassen), wenn das Magnetfeld, dem die Spins ausgesetzt sind, für alle dasselbe wäre. Im Falle kleiner Unregelmäßigkeiten dieses Feldes treten Differenzen in den Spinzuständen ein, in der Form, dass einige Spins mit einer höheren Frequenz in der x-y-Ebene präzidieren und damit die Spins mit der ursprünglichen Frequenz überholen, während einige andere einem etwas kleineren Feld ausgesetzt sind und somit zurückbleiben (siehe Abbildung 1.2.5.3-1). Dies führt zu einer Abnahme des Gesamtmagnetisierungsvektors in der y-Achse. Es handelt sich um einen Entropieprozess, der folgendem Zeitgesetz folgt:

Gleichung 1.2.5.3-1

$$\frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2}$$

wobei M_y die Magnetisierung in y-Richtung ist (Quermagnetisierung).

Es gibt im Allgemeinen zwei Gründe für diese Art der Relaxation: der wichtigste Grund sind Unregelmäßigkeiten des statischen Magnetfeldes B_0 . Durch das Shimmen versucht man zwar diese Inhomogenitäten auszugleichen, ein absolut gleiches

Magnetfeld lässt sich jedoch nie erreichen. Der zweite Mechanismus rührt von dem lokalen Magnetfeld her, das durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen entsteht (siehe Kapitel 1.2.5.2). Diese beiden Arten der transversalen Relaxation addieren sich zu einer Gesamt-Relaxationskonstante T_2^* :

$$\text{Gleichung 1.2.5.3-2} \quad \frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2(\Delta B_0)}}$$

T_2 entspricht dem Beitrag des natürlichen Relaxationsprozesses und $T_{2(\Delta B_0)}$ dem Beitrag, der durch Magnetfeldinhomogenitäten entsteht. Bei den Spin-Echo-Messungen, die in Kapitel 2.2.3.2 angewendet werden, wird nur die natürliche T_2 -Zeit ermittelt, da Phasenverschiebungen, die durch Magnetfeldinhomogenitäten entstehen, bei diesen Experimenten refokussiert werden können.

Mit der Spin-Spin-Relaxation T_2^* ist auch die Linienbreite $\Delta\nu_{1/2}$ eines Signals sehr eng verbunden.

$$\text{Gleichung 1.2.5.3-3} \quad \Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*}$$

Generell kann die T_2 -Zeit eines Kerns nie größer sein als die entsprechende T_1 -Zeit, da keine x-y-Magnetisierung mehr vorhanden sein kann, wenn die z-Magnetisierung sich wieder komplett aufgebaut hat.

1.2.5.4. Kern-Overhauser-Effekt und ROE-Spektroskopie

Der Kern-Overhauser-Effekt (*nuclear overhauser effect*, NOE) wurde erstmals 1965 durch *Anet* und *Bourn*^[17] bei NMR-Entkopplungsexperimenten entdeckt. Die Messung des NOE ist eines der wichtigsten Werkzeuge bei der Ermittlung der dreidimensionalen Struktur größerer Moleküle.

Der NOE ist definiert als die Änderung der Signalintensität einer Resonanz durch Änderung des Populationsgleichgewichts einer anderen Resonanz. Diese Störung des Gleichgewichts entsteht entweder durch Sättigung oder Umkehrung der Besetzungsverteilung. Der Verstärkungsfaktor stellt sich folgendermaßen dar:

Gleichung 1.2.5.4-1

$$\eta_I\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \times 100(\%)$$

$\eta_I\{S\}$ beschreibt den NOE für Spin I bei Störung des Spins S, I bzw. I_0 die Intensität des Signals mit NOE bzw. die Gleichgewichtsintensität.

Der Mechanismus des NOE lässt sich am besten über die Darstellung der Energieveaus und Besetzungsverhältnisse erklären (siehe Abbildung 1.2.5.4-1).

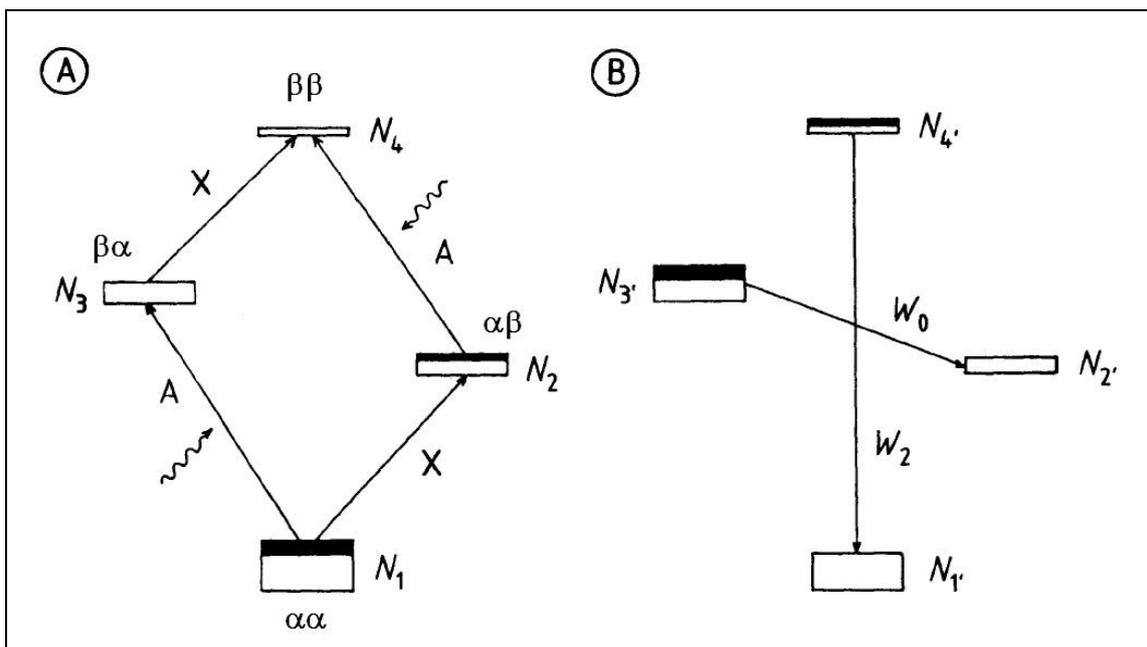


Abbildung 1.2.5.4-1: Besetzungsverhältnisse und Übergangswahrscheinlichkeiten bei einem NOE-Experiment für ein Zwei-Spin-System (aus Lit.^[18]). A: Ausgangszustand; B: Zustand bei Sättigung von Spin A

Für ein Zwei-Spinsystem gilt bei Sättigung des Spins A, dass sich die Besetzungsdifferenzen für N_1 und N_3 bzw. N_2 und N_4 angleichen (der Anteil der Spins, die dabei in den energiereicheren Zustand übergehen, ist als schwarzer Balken dargestellt). Dadurch, dass das Spinsystem aus dem Gleichgewicht gebracht wurde, versucht es dieses über Relaxationsprozesse wieder herzustellen. Es sind sechs verschiedene Übergangswahrscheinlichkeiten möglich. Vier davon entsprechen Einzelquanten-Übergängen W_1 (nicht dargestellt in Abbildung 1.2.5.4-1). Die beiden anderen Übergänge beinhalten die Umkehr von zwei Spins: $\alpha\beta$ zu $\beta\alpha$ (Nullquanten-Übergang, W_0) und $\alpha\alpha$ zu $\beta\beta$ (Doppelquanten-Übergang). Da es sich hierbei um „verbotene“ Übergänge handelt, treten diese im NMR-Spektrum nicht auf und existieren nur bei Rela-

xationsvorgängen. Es ist vorwiegend der Dipol-Dipol-Relaxationsmechanismus, der für die Entstehung des NOE verantwortlich ist. Vergleicht man das Verhältnis im Gleichgewichtszustand (A) und im NOE-Zustand (B), so fällt auf, dass $N1/N4 > N1'/N4'$. Der Übergang W_2 versucht diese Differenz wieder auszugleichen, indem $N1'$ zu Kosten von $N4'$ vergrößert wird. Dadurch werden aber auch die Übergänge des X-Spins $N1'-N2'$ und $N3'-N4'$ größer, was sich in einem Intensitätsgewinn des Signals von X bemerkbar macht (positiver NOE). Beim Übergang W_0 gleicht das System $N2'$ auf Kosten von $N3'$ aus. Durch diesen Effekt werden die Differenzen der X-Übergänge kleiner, was zu einer Signalabschwächung führt (negativer NOE). Je nachdem welcher Prozess überwiegt, können positive oder negative NOE auftreten. Wenn man bedenkt, dass für den W_2 -Übergang eine Frequenz aus der Summe $\nu_A + \nu_X$ notwendig ist, wird klar, dass nur kleine, sehr bewegliche Moleküle mit kurzen Korrelationszeiten diese Frequenz liefern können. Bei diesen Molekülen überwiegt damit der W_2 -Übergang, während bei größeren Molekülen W_0 effektiver wird, da hier kleinere Frequenzen ausreichen.

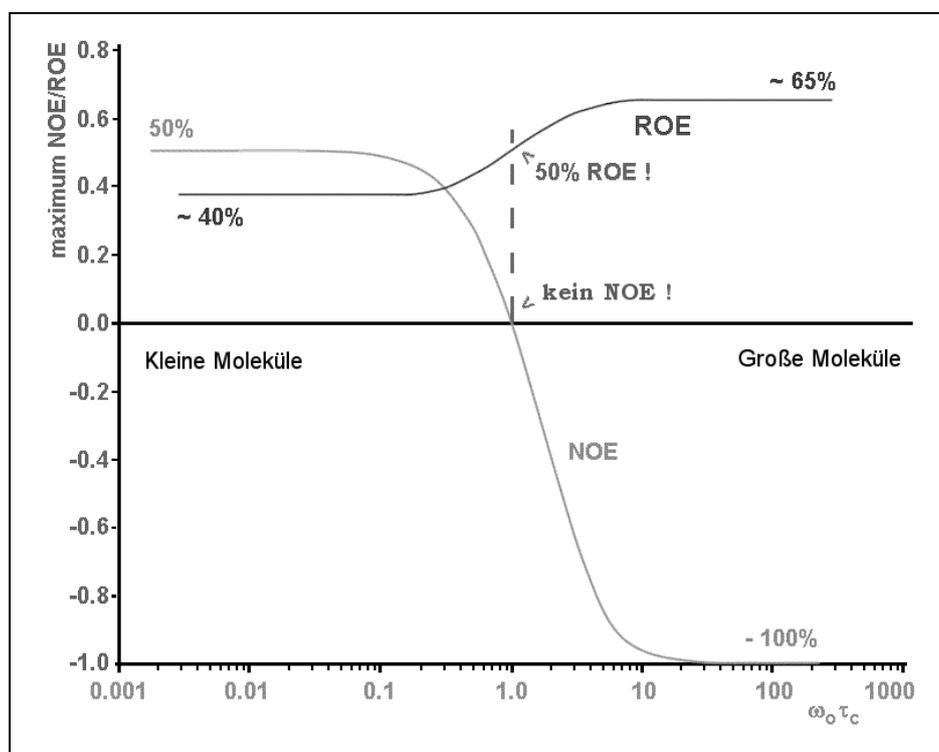


Abbildung 1.2.5.4-2: Theoretischer homonuklearer NOE-Effekt eines Zwei-Spin-Systems als Funktion der Beweglichkeit des beobachteten Moleküls (verändert aus Lit^[19])

Wie in Abbildung 1.2.5.4-2 ersichtlich ist, wird bei einer Korrelationszeit von $\tau_c \omega_0 \approx 1$ der NOE gleich null. Dementsprechend ist der NOE-Nulldurchgang abhängig von der

Korrelationszeit - die wiederum abhängig von der Viskosität, Temperatur und Molekülgröße ist - und der eingesetzten Feldstärke. Beispielsweise zeigt ein 400 MHz-Spektrometer den Nulldurchgang bei einer Molekülgröße von ca. 1000 Da, während dieser Nulldurchgang bei 800 MHz schon bei Molekülen mit 700 Da auftritt.

Das zweidimensionale NOESY-Experiment ist folgendermaßen aufgebaut:

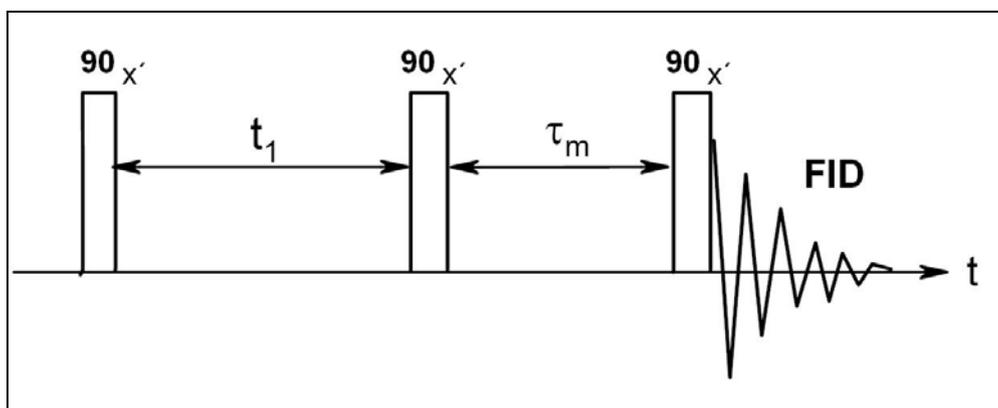


Abbildung 1.2.5.4-3: Die Impulsfolge des NOESY-Experiments

Hierbei werden durch den ersten 90°_x -Puls die Vektoren in die x-y-Ebene ausgelenkt, wobei sie während der t_1 -Zeit gemäß ihrer unterschiedlichen Larmorfrequenzen präzidieren. Durch den zweiten 90°_x -Puls werden die y-Komponenten wieder auf die z-Achse gedreht. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht in den Besetzungsverhältnissen der beiden Spins. Dieses Ungleichgewicht gleicht das System während der Mischzeit τ_M durch Relaxationsvorgänge wieder aus und es kommt zu den oben beschriebenen Übergängen und damit auch zum NOE, der dann im zweidimensionalen Spektrum Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (auch über den Raum) anzeigt.

Der Nachteil des NOE-Nulldurchgangs bei $\tau_C\omega_0 \approx 1$ lässt sich durch Messung des NOE im rotierenden Koordinatensystem (*rotating-frame*, ROE) übergehen, da der ROE stets positive Signale liefert (siehe Abbildung 1.2.5.4-2).

ROESY-Spektren werden mit einem „Spin-Lock“-Verfahren aufgenommen (siehe Abbildung 1.2.5.4-4). Der Spin-Lock entspricht der Mischzeit eines NOE-Experiments und kann aus einem einzelnen, schwachen Puls oder einer Sequenz aus mehreren stärkeren Pulsen bestehen. Dieser Spin-Lock sorgt dafür, dass keine Phasenverschiebung auftritt und der Gesamtvektor auf der y-Achse verbleibt. Während des Spin-Locks kann es dann zu der Übertragung der Magnetisierung von einem Kern auf den anderen kommen (*cross polarization*, *cross relaxation*).

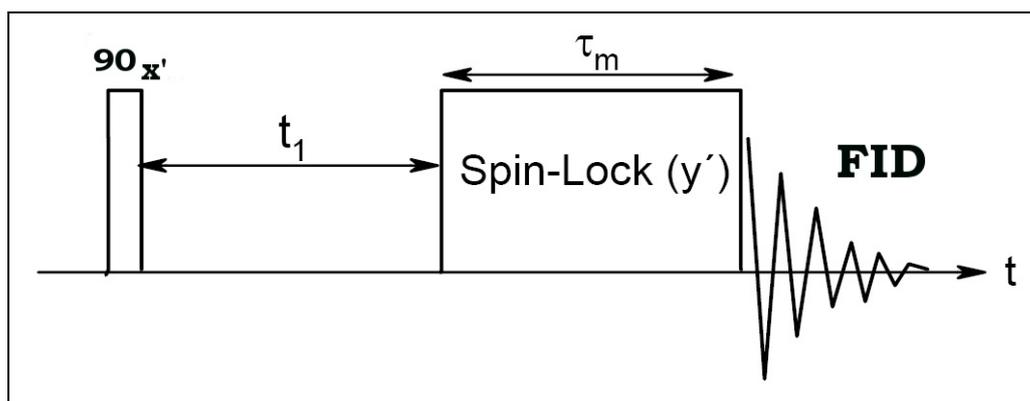


Abbildung 1.2.5.4-4: Die Pulssequenz des ROESY-Experiments

1.2.5.5. Diffusionskoeffizient

Der Begriff „Diffusion“ beschreibt den Vorgang der Durchmischung von miteinander in Kontakt stehenden Stoffen aufgrund ihrer molekularen Wärmebewegung (Brown'sche Molekularbewegung). Diese erfolgt bei einer bestimmten Temperatur ohne Zufuhr weiterer Energie und ist daher passiv. Die Antriebskraft der Diffusion ist ein Zugewinn an Entropie.

Der Diffusionskoeffizient (Diffusionskonstante) ist eine Konstante der Fick'schen Gleichungen, die Zusammenhänge zwischen einem Partikelstromfluss J und der Konzentrationsveränderung ∂c auf einer Strecke ∂x quantitativ erfasst.

Das erste Fick'sche Gesetz beschreibt die Geschwindigkeit des Diffusionsvorgangs:

$$\text{Gleichung 1.2.5.5-1} \quad J = \frac{\partial n}{\partial t} = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

n ist die Teilchenzahl, t die Zeit und D der Diffusionskoeffizient.

Das zweite Fick'sche Gesetz beschreibt die Änderung des Konzentrationsprofils mit der Zeit (mit einem konstanten, von der Konzentration unabhängigen Diffusionskoeffizienten).

$$\text{Gleichung 1.2.5.5-2} \quad \frac{\partial c}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

Es existieren vier Arten der Diffusion: Selbstdiffusion, Tracerdiffusion, Klassische Fick'sche Diffusion und Gegendiffusion. Die letzten beiden finden nur bei Anwesenheit eines starken Gradienten statt. Beim Diffusionsmechanismus, der durch NMR-

Spektroskopie detektiert werden kann, handelt es sich ausschließlich um die Selbstdiffusion, bei der kein makroskopischer Gradient existiert. Hier kann die Diffusionskonstante über die Stokes-Einstein-Gleichung beschrieben werden.

Gleichung 1.2.5.5-3

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \mu \cdot R_0}$$

k_B ist die Boltzmann-Konstante [J K^{-1}], T die Temperatur [K], μ die dynamische Viskosität [N s m^{-2}] und R_0 der Radius der diffundierenden Teilchen [m].

Durch die Bindung eines Liganden an ein Makromolekül ändert sich die scheinbare Diffusionskonstante des gebundenen Teilchens drastisch. Der Diffusionskoeffizient lässt sich daher ideal als Screening-Parameter verwenden.

1.2.6. Zielsetzung

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie lassen sich heutzutage wichtige Erkenntnisse über die Struktur eines Moleküls und die Bindungsmechanismen eines Liganden an ein Makromolekül gewinnen. Hierbei ist es möglich, verschiedenste Messgrößen, die mittels NMR-Spektroskopie detektiert werden können, zu beobachten und die Auswirkung der Bindung des Liganden zu erfassen. Dabei bietet die NMR-Spektroskopie im Gegensatz zu vielen High-Throughput-Assays enorme Vorzüge. Als universelle Methode ist man weder auf die Entwicklung spezieller Assays angewiesen, noch braucht man genaue Informationen über das Zielmolekül. Das NMR-Screening ist dabei in der Lage, die Interaktionen zwischen Ligand und Zielstruktur direkt zu messen. Im Zuge dieser Arbeit sollte anhand von drei Projekten versucht werden, die Möglichkeiten, die das NMR-Screening bietet, zu nutzen, um so genaue Aussagen über das Bindungs- bzw. Komplexierungsverhalten eines Liganden an ein Zielmolekül machen zu können.

Die erste Fragestellung beschäftigt sich mit dem Komplexierungsverhalten von Di-peptiden mit β -Cyclodextrin und dem Einfluss von Harnstoff auf den ausgebildeten Komplex. Die kapillarelektrophoretischen Ergebnisse zeigen deutlich, dass Harnstoff einen Effekt auf den Komplex ausübt. Mit der NMR-Spektroskopie und dem theoretischen Verfahren der „Moleküldynamik-Simulation“ sollte möglichst genau aufgeklärt werden, wo und in welcher Art und Weise sich der Harnstoff auf die Komplexierung

auswirkt. Bei der NMR-spektroskopischen Vorgehensweise sollen die chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen Komplexe untersucht werden, um so erste Anhaltspunkte über die gebildeten Komplexe zu erhalten. Als weitere Methode werden ROE-Experimente durchgeführt, die ein genaueres Bild über die Protonenabstände im Komplex geben können. Die computertechnische Simulation der Komplexdynamik soll als theoretische Methode die experimentellen Daten untermauern und die Leistungsfähigkeit der Verbindung aus Experiment und Simulation aufzeigen.

Im zweiten Projekt wird mittels NMR-Screening-Verfahren das Bindungsverhalten von Gyrasehemmern an lebenden Bakterienzellen untersucht. Dabei werden über Relaxationsmessungen Dissoziationskonstanten bestimmt, die eine Aussage über die Penetrationsfähigkeit durch die Bakterienmembran und/oder über die Bindungsfähigkeit an der Gyrase des Bakteriums machen können. Mit der erstellten Methode zur K_D -Wert-Bestimmung können auch neusynthetisierte Gyrasehemmer bezüglich ihres Bindungsverhaltens charakterisiert und eingeordnet werden. Da fast jeder Gyrasehemmer ein Fluoratom besitzt, wird auch die ^{19}F -NMR-Spektroskopie in die Untersuchung einbezogen.

Im dritten Projekt soll die Bindungsstärke der Gyrasehemmer an bovinem Serumalbumin (BSA) untersucht werden. Neben den Relaxationsmessungen wird ein weiterer Parameter untersucht, der über NMR-Spektroskopie verfolgt werden kann. Über die Bestimmung von Dissoziationskonstanten bei unterschiedlichem Antibiotikum-BSA-Verhältnis kann (ebenso wie durch Relaxationsmessungen) die Dissoziationskonstante des Komplexes ermittelt werden. Ziel dieses Projektes ist es, die unterschiedlichen Auswerteverfahren der Relaxationszeiten und der Diffusionskonstanten miteinander zu vergleichen und zu beurteilen. Mittels Diffusionsmessungen soll ein schnelles und unkompliziertes Verfahren entwickelt werden, um die Proteinbindungskonstanten bestimmen zu können.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Einfluss von Harnstoff auf β -Cyclodextrin-Einschlusskomplexe mit Dipeptiden

[18]

Eur. J. Org. Chem., 2007, 2893–3058

EurJOC
European Journal of
Organic Chemistry

D 6093

18/2007
3rd June Issue

ALERTS and
RSS-FEEDS
Free Subscription

ROESY NMR

ppm

ppm

CE

buffer with urea

buffer without urea

Ala-Tyr

LA

DO

13 14 15

11 12 13

Molecular dynamics

buffer without urea

L-Ala-L-Tyr

buffer with urea

Bridging analytical technologies

CD-dipeptide complex

Cover Picture
Ulrike Holzgrabe et al.
Comparison of Cyclodextrin-Dipeptide Inclusion Complexes

Microreview
Yong-Ling Shi and Min Shi
Aza-Baylis-Hillman Reactions and Their Synthetic Applications

WILEY-VCH

www.eurjoc.org

EJOCFK (18) 2893–3058 (2007) · ISSN 1434-193X · No. 18/2007

1807
WILEY
2007

EU ChemSoc

2.1.1. Cyclodextrine

Cyclodextrine gehören zur Klasse der Oligosaccharide und stellen ein ringförmiges Abbauprodukt von Stärke dar. Sie unterscheiden sich dabei in der Anzahl der α -1-4-glycosidisch miteinander verbundenen Glucoseeinheiten. Die 3 Cyclodextrine α -CD (6 Glucose-Einheiten), β -CD (7 Glucoseeinheiten) und γ -CD (8 Glucoseeinheiten) sind die in der Praxis relevanten und industriell in hoher Qualität herstellbaren Mitglieder dieser Familie.

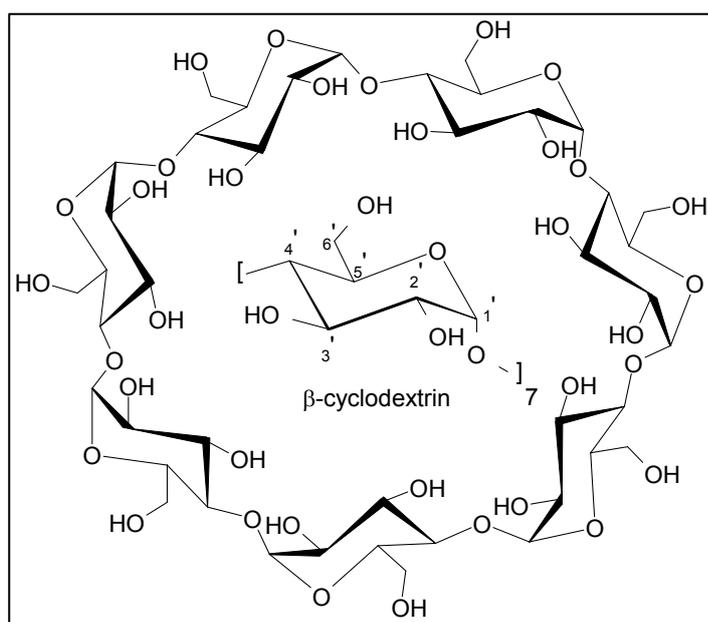


Abbildung 2.1.1-1: Darstellung eines β -CD und die Protonennomenklatur der Glucopyranoseeinheit

Durch die unterschiedliche Anzahl von Glucoseeinheiten variiert der Durchmesser der Cyclodextrinkavität zwischen ca. 5,3 und 8,4 Å. Auch in anderen physikalischen Eigenschaften unterscheiden sich die genannten Cyclodextrine (siehe Tabelle 2.1.1-1).

Tabelle 2.1.1-1: Vergleich einiger wichtiger physikalischer Eigenschaften von Cyclodextrinen^[20]

	α -CD	β -CD	γ -CD
Anzahl der Glucose-Einheiten	6	7	8
Molekulargewicht [g/mol]	972	1135	1297
Löslichkeit in Wasser [g/100ml]	14,5	1,85	23,2
Innendurchmesser des Torus [Å]	4,7–5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Außendurchmesser des Torus [Å]	14,6 \pm 0,4	15,4 \pm 0,4	17,5 \pm 0,4
Torushöhe [Å]	7,9 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1
Volumen der Kavität [Å ³]	174	262	427

Das erste Cyclodextrin wurde erstmals von *Villiers*^[21] bei dem fermentativen Abbau von Stärke beobachtet. Später gelang es *Schardinger*,^[22,23] den dafür verantwortlichen Keim (*Bacillus macerans*) zu isolieren und die entstandenen CDs näher zu cha-

rakterisieren. Industriell werden die Cyclodextrine heutzutage mit dem Cyclodextrin-Glycosyltransferase-Enzym (CGT-ase) aus Maisstärke hergestellt. Dabei bilden sich vor allem α -CD und β -CD, da die Windung einer Amylose-Helix aus 6-7 Glucoseeinheiten besteht.

Durch die 4C_1 -Konformation der Glucopyranoseeinheiten befinden sich alle primären Hydroxylgruppen am engeren Rand des sich bildenden konischen Zylinders, wohingegen sich alle sekundären Hydroxylgruppen am weiteren Rand befinden.

Die Hydroxylgruppe am C2-Atom kann mit der Hydroxylgruppe des C3 der benachbarten Glucopyranose eine Wasserstoffbrücke ausbilden, was dem Ring eine gewisse Rigidität verleiht. Durch die Verteilung der Hydroxylgruppen am Rand der Kavität und durch die apolaren CH-Gruppen an Position 3 und 5 ergibt es sich, dass die Kavität eher hydrophober Natur (endolipophil) ist, wohingegen die Ränder des Cyclodextrins einen hydrophilen Charakter aufweisen (exolipophob) (siehe Abbildung 2.1.1-2).^[24,25]

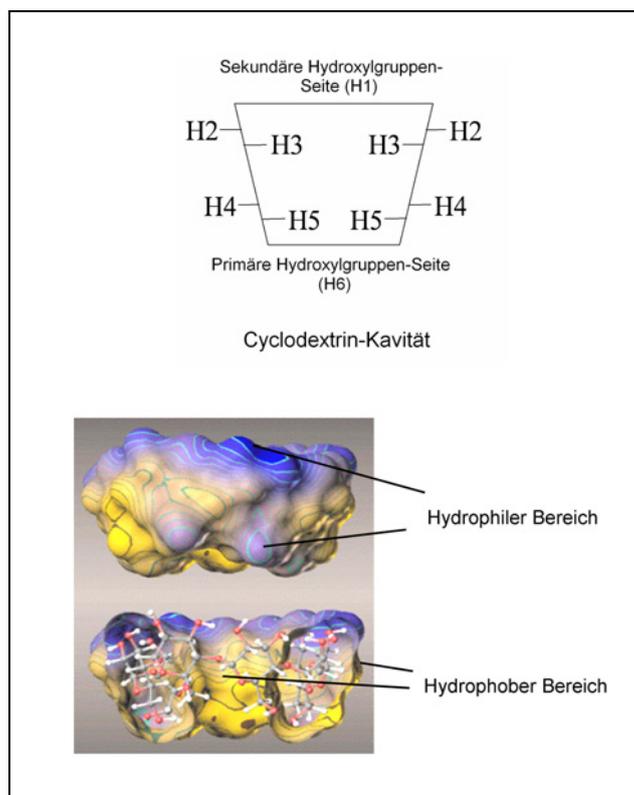


Abbildung 2.1.1-2: Schematische Darstellung und Hydrophilie-Verteilung eines Cyclodextrins (nach Lit.^[26])

Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich Cyclodextrine hervorragend, kleine Gastmoleküle in ihre Kavität aufzunehmen. Das Gastmolekül verliert dabei seine Hydrathülle und Wassermoleküle werden aus der Cyclodextrinkavität hinaus befördert.^[27] Es wird eine Entropiezunahme verzeichnet, die die treibende Kraft der Komplexierung darstellt. Das Gastmolekül wird im Inneren der Kavität vor allem über van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und eventuell über sich bildende Wasserstoffbrücken stabilisiert.

In der Analytik macht man sich die unterschiedlich starke Komplexierung von Enantiomeren zu Nutze, um z. B. Racemate mittels chromatographischer oder elektrophoretischer Methoden zu trennen.^[28] Neben seiner Reaktivität und Wasserlöslichkeit ändern sich auch die spektroskopischen Eigenschaften des eingelagerten Gastmoleküls. Dabei verschiebt sich z. B. das UV-Maximum und die Intensität der Fluoreszenz wird erhöht, da sich das Medium des Gastmoleküls vom Wässrigen ins Apolare verschiebt. Ein weiteres, sehr wichtiges spektroskopisches Merkmal ist die Änderung der chemischen Verschiebung der Atome durch die Änderung der Anisotropie in der Kavität des Cyclodextrins. Damit bietet die NMR-Spektroskopie eine sehr gute Möglichkeit, um die Struktur und Geometrie von Cyclodextrin-Komplexen zu charakterisieren.

2.1.2. Cyclodextrine in der NMR-Spektroskopie

Da es häufig sehr schwer ist, Komplexe aus Cyclodextrin und Gast-Molekül als einzelne Kristalle zu erhalten, um damit Röntgen-Kristalluntersuchungen durchzuführen, wurde die NMR-Spektroskopie in den letzten Jahren zum wichtigsten Werkzeug, um die Wirt-Gast-Verhältnisse der Strukturen zu beleuchten. Andere analytische Methoden wie Fluoreszenzmessungen, UV/Vis-Spektroskopie und Kalorimetrie dienen eher dazu, energetische Zustände zu ermitteln, sind aber nicht in der Lage, genaue Aussagen über die Struktur des Komplexes zu machen. Seit den ersten NMR-spektroskopischen Untersuchungen^[29] führten neue Messtechniken (z. B. NOESY) und moderne Hochfeld-Spektrometer zu immer besseren Möglichkeiten, die Komplexchemie der Cyclodextrine untersuchen zu können. Dabei werden meist die Protonen des Wirt- und Gastmoleküls hinsichtlich ihrer chemischen Verschiebungen und

ihrer räumlichen Nähe zueinander untersucht, um so die ungefähre Lage der Gastprotonen in der Kavität zu ermitteln.

2.1.3. Kapillarelektrophoretische Trennung von Dipeptiden unter Einsatz von Cyclodextrinen

2.1.3.1. Allgemeines zur Kapillarelektrophorese^[30]

Im Allgemeinen versteht man unter Elektrophorese die Bewegung von Ionen im elektrischen Feld in einer leitenden Flüssigkeit. Die Geschwindigkeit, mit der die Ionen in diesem Feld wandern, hängt von deren Ladung, Form, effektiven Größe, der Lösungsumgebung und der Stärke des elektrischen Feldes ab. Bei der Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) bedient man sich dieser Eigenschaften und verbindet sie mit den spektroskopischen Detektionsmöglichkeiten der Chromatographie. Des Weiteren bieten die eingesetzten Kapillaren die Möglichkeit, die durch das angelegte Hochspannungs-Feld entstehende Wärme gut abzuleiten. Ein weiteres sehr wichtiges Merkmal der CE ist die Entstehung des elektroosmotischen Flusses (EOF). Dieser entsteht durch die Ausbildung einer Stern-Ladungsdoppelschicht zwischen negativ geladenen Silanolgruppen (ab etwa pH = 3 deprotoniert) der Quarzkapillare und positiv geladener Ionen der darüberstehenden Elektrolytlösung. Die Stern-Doppelschicht setzt sich aus einer starren und diffusen Schicht zusammen. Durch diese Ladungsverteilung baut sich ein Potential auf, das in der starren Schicht linear und in der beweglichen Schicht exponentiell abnimmt. Durch die angelegte Spannung wandern die Kationen in der diffusen Schicht zur Kathode und ziehen die Bulk-Flüssigkeit des Elektrolyten mit sich. Der EOF trägt nicht zur Trennleistung bei, ermöglicht es aber, neutrale und teilweise auch negative Ionen entgegen ihrer elektrophoretischen Bewegung zur Kathode und damit zum Detektor zu bewegen. Die wichtigsten in der CE genutzten Techniken sind:

- **Kapillaronenelektrophorese (CZE)**

Die Probe wird hierbei als möglichst schmales Band aufgetragen. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten.

- **Mizellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC)**

Durch Zugabe von Detergentien zum Elektrolyten bilden sich Mizellen. Hierbei erfolgt die Trennung vorwiegend über die unterschiedliche Verteilung der Analyten zwischen den Mizellen und umgebenden Puffer.

- **Kapillargelelektrophorese (CGE)**

Durch Zugabe eines Gelbildners wird eine Art Molekularsieb in der Kapillare gebildet, der die Analyten vorwiegend nach ihrer Größe trennt.

2.1.3.2. Kapillarelektrophoretische Untersuchungen von Cyclodextrin-Dipeptid-Einschlusskomplexen in Abwesenheit von Harnstoff

Enantiomere unterscheiden sich nicht in ihren physiko-chemischen Eigenschaften, sodass eine Trennung erst in einer chiralen Umgebung wie den Cyclodextrinen möglich wird. Durch die Ausbildung von Cyclodextrin-Enantiomer-Komplexen bilden sich zwei Diastereomerenpaare, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften z. B. über chromatographische Methoden in die reinen Enantiomerenkomplexe trennen lassen. In diesem Zusammenhang kommt den nativen Cyclodextrinen eine bedeutende Rolle in der CE zu. Durch Derivatisierung der Cyclodextrine lassen sich zusätzlich chirale Selektoren herstellen, die einen unterschiedlichen Einfluss auf die Selektivität der Enantiomere aufweisen. Damit lässt sich zu jedem chiralen Testsystem der optimale Cyclodextrin-Selektor finden.^[31,32] Neben der Auswahl des chiralen Selektors und seiner Konzentration spielen noch die Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten und der pH-Wert eine entscheidende Rolle. Beispielsweise wurde bei der Untersuchung von kleineren Peptiden der Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung genauer untersucht und eine Umkehr der Migrationsreihenfolge beim Übergang von der kationischen Dipeptidform zur zwitterionischen Form festgestellt.^[33,34] Dabei spielt die Aminosäuresequenz des Peptides und die Struktur des Cyclodextrins eine entscheidende Rolle. Die Umkehr begründet sich auf zwei unterschiedliche Mechanismen.^[35]

- Durch den unterschiedlichen Dissoziationsgrad der Enantiomere bei unterschiedlichen pH-Werten tritt eine Änderung des chiralen Erkennungsprozesses ein. Dieses macht sich in unterschiedlichen Assoziationskonstanten der Komplexe bemerkbar.
- Änderung der Beweglichkeit der diastereoisomeren Peptid-Cyclodextrin-komplexe durch einen pK_A -Shift der gebundenen Enantiomere. Durch die Änderung der Nettoladung verändert sich höchstwahrscheinlich die Beweglichkeit der Komplexe.^[36]

Durch NMR-spektroskopische und Moleküldynamik-Simulations-Studien von Dipeptid-Cyclodextrin-Einschlusskomplexen ist es möglich, einen genauen Einblick in die Bindungsverhältnisse und Struktur der Komplexe zu erhalten. Bei Untersuchungen von Ala-Tyr und Ala-Phe mit β -CD, *heptakis*-(2,3-di-O-acetyl)- β -cyclodextrin (DIAC- β -CD), HS- β -CD und *heptakis*-(2,3-di-O-acetyl-6-O-sulfo)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD) mittels NMR-spektroskopischer Methoden konnten erste Vermutungen über den gebildeten Einlagerungskomplex angestellt werden.^[37]

Da manche Cyclodextrine in den eingesetzten Mengen sehr schlecht wasserlöslich sind, verwendet man häufig hohe Harnstoff-Konzentrationen (üblicherweise ca. 2 M) zur Löslichkeitsverbesserung. Da der Hintergrund-Elektrolyt (HGE) einen sehr starken Einfluss auf die Trennung chiraler Substanzen besitzt, muss auch der Einfluss von Harnstoff näher untersucht werden. Durch neuere CE-Analysen wurde ein komplexierungsbedingter pK_A -Shift durch Zugabe von Harnstoff nachgewiesen,^[38] aber auch eine Änderung der Bindungskonstanten wird angenommen.^[39]

Bei der Trennung der Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe mit und ohne Harnstoff ergaben sich Unterschiede in der Auflösung der Elektropherogramme. Während bei pH 2,5 die Auflösung mit Harnstoff eindeutig besser war, verbesserte sie sich bei pH 3,5 in Abwesenheit von Harnstoff. Bei einem pH von 2,5 kann ohne Harnstoff überhaupt keine Trennung von L-Ala-L-Tyr und D-Ala-D-Tyr erreicht werden. In Anwesenheit von Harnstoff findet eine Umkehr der Migrationsreihenfolge beim Wechseln zu einem basischeren HGE statt (siehe Abbildung 2.1.3.2-1).

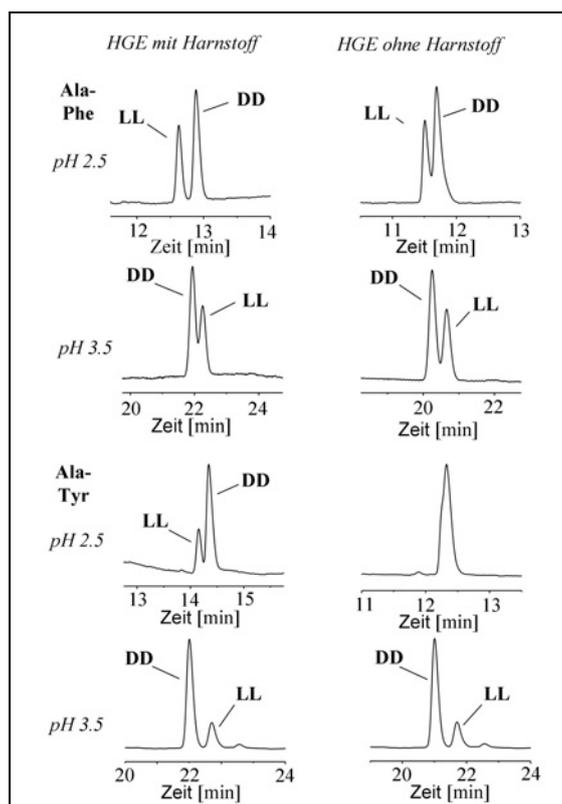


Abbildung 2.1.3.2-1: Elektropherogramme der Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe bei pH 2,5 und 3,5 unter Zusatz und in Abwesenheit von Harnstoff

2.1.4. Zielsetzung

Harnstoff scheint eine entscheidende Rolle bei der enantioselektiven Trennung von Dipeptiden mittels Cyclodextrinen in der CE zu spielen. Mittels NMR-Spektroskopie und „Molecular Dynamics Simulations“ (MD) sollten die Komplexierung der Dipeptide mit β -CD näher untersucht werden. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen der ^1H -NMR-Spektren von β -CD und allen Dipeptiden jeweils mit und ohne Harnstoff miteinander verglichen. Um einen noch tieferen Einblick in die Bindungsverhältnisse in der Kavität zu bekommen, wurden ROESY-Experimente durchgeführt, die direkte, intermolekulare Nachbarschaften von Protonen detektieren können und damit exaktere Vorstellungen über die Raumverhältnisse zulassen. Durch MD-Simulationen sollten die erhaltenen experimentellen Daten beurteilt und überprüft werden. Durch diese Untersuchungen wurde ein Brückenschlag zwischen Techniken verschiedenster Richtungen durchgeführt, um so eindeutig den Einfluss von Harnstoff bestimmen zu können.

2.1.5. “Complexation Induced Chemical Shift” (CICS)-Messungen

2.1.5.1. Referenzierung

Einer der wichtigsten Punkte bei der Bestimmung der exakten Größe von chemischen Verschiebungen ist die Referenzierung auf ein Standardsignal. In der NMR-Spektroskopie können keine absoluten Werte für Resonanzfrequenzen angegeben werden, da Resonanzfrequenz und magnetische Flussdichte miteinander verknüpft sind. Man muss daher einen relativen Maßstab verwenden, bei dem man die Frequenzdifferenz $\Delta\nu$ zwischen den Signalen des Analyten und der Referenz misst. Meist handelt es sich bei diesen Referenzsubstanzen um interne Standards, die direkt zur Analytlösung zugegeben werden. Tetramethylsilan (TMS) ist der allgemein übliche Standard in organischen Lösungsmitteln. In wässriger Lösung werden meist die Natriumsalze von 3-(Trimethylsilyl)-Propionsäure- D_4 (TSP) und 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) verwendet. Oft wird auch auf das Restlösungsmittelsignal (HDO) referenziert, was aber auf Grund der Größe und der pH-Wert-Abhängigkeit des Signals zu Ungenauigkeiten führen kann.

Bei der Bestimmung der chemischen Verschiebungen von Einschlusskomplexen müssen folgende Sachverhalte berücksichtigt werden, die einen Einsatz interner Standards unmöglich machen.

- **pH-Wert-Abhängigkeit^[40]**

Vor allem Wasser und TSP zeigen eine starke Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom pH-Wert. Im Falle des TSP wird dessen Carboxylgruppe mit abnehmenden pH-Wert protoniert.

- **Komplexierung des Standards mit Cyclodextrin**

Bei der Verwendung der internen Standards DSS und TMS wurden signifikante Abweichungen der chemischen Verschiebungen der Cyclodextrinprotonen gemessen.^[41] Es besteht also hier die Gefahr, dass interne Standards in Konkurrenz zur Komplexierung des Gastmoleküls treten.

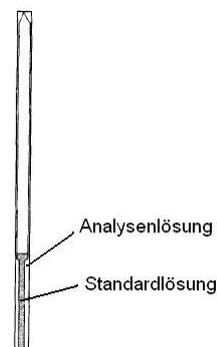


Abbildung 2.1.5.1-1: Koaxiales Insert

Aus diesen Gründen greift man bei CICS-Messungen auf eine externe Referenz zurück. Darunter versteht man eine in eine

Kapillare eingeschmolzene Referenzsubstanz. Diese Kapillare wird zusammen mit dem Analysenröhrchen vermessen. Käufliche Inserts bestehen aus einem Innenrohr, das koaxial im äußeren Rohr liegt (siehe Abbildung 2.1.5.1-1). Diese Röhrchen haben den großen Vorteil, dass Standard und Analyt nicht miteinander in Kontakt stehen und somit keine gegenseitige Beeinflussung stattfinden kann. Aber auch hier können leichte Differenzen zu Literaturdaten auftreten, da die Kerne im Standard und der Probe durch fabrikationsbedingte Unterschiede der Inserts unterschiedlich abgeschirmt sind.

In dieser Versuchsreihe wurde Maleinsäure ausgewählt und jedes Spektrum auf deren Peak bei 6,3 ppm referenziert. Maleinsäure ist ein etablierter externer Standard^[42] und interferiert nicht mit den Protonensignale von β -CD bzw. den Dipeptiden.

2.1.5.2. pH-Einstellung

Der richtig eingestellte pH-Wert spielt bei den folgenden Untersuchungen eine wichtige Rolle. Dipeptide liegen bei unterschiedlichen pH-Werten in verschiedenen protonierten Zuständen vor. Bei niedrigem pH-Wert überwiegt die kationische Form mit protonierter Aminogruppe. Beim Übergang zu basischeren pH-Werten wird zuerst die Carboxylgruppe deprotoniert und es entsteht ein Zwitterion (siehe Abbildung 2.1.5.2-1).

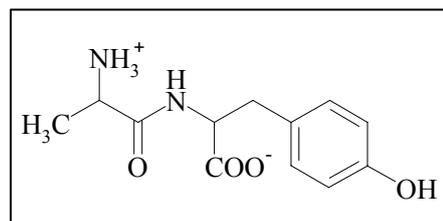


Abbildung 2.1.5.2-1: Zwitterionische Form von Ala-Tyr

Die Carboxylfunktionen (sowohl von Ala-Tyr, als auch von Ala-Phe) besitzen einen pK_A -Wert von ca. 3,1. Bei den folgenden Messungen werden die CICS bei pH 2,5 und 3,5 vermessen. Bei pH 2,5 liegt folglich zum großen Teil die kationische Form des Dipeptids, bei pH 3,5 die zwitterionische Form vor. Die Problematik, den pH-Wert bei NMR-Messungen genau einzustellen, liegt in der Tatsache, dass bei Messungen in wässrigen Systemen fast ausschließlich deuteriertes Wasser (Deuteriumoxid, D_2O) zum Einsatz kommt, da Wasser ein sehr starkes Lösungsmittelsignal in den Spektren ergibt, was auf Kosten der Sensitivität von kleinen Signalen in der Umgebung des Wassersignals geht (siehe Kapitel 2.1.5.3). Der in Deuteriumoxid gemessene pH-Wert (pD-Wert) unterscheidet sich jedoch - bei gleicher Zusammensetzung des Analyten - von dem in Wasser gemessenen. Es gibt

empirische Studien, die die in Wasser ermittelte pH-Skala in eine pD-Skala mittels eines Korrekturfaktors umrechnen.^[43,44]

Gleichung 2.1.5.2-1
$$pD = pH^D + \delta_{glas}$$

Der gefundene Korrekturterm δ_{glas} bewegt sich zwischen 0,41 (molare Skalierung) und 0,45 (molale Skalierung). Der Grund für das unterschiedliche Ansprechen der Glaselektrode in schwerem und in leichtem Wasser ist in den unterschiedlichen Austauschvorgängen an der Grenzfläche der Glaselektrode (Isotopeneffekt) begründet.^[45] Um eine Neuskalierung der Glaselektrode zu umgehen, wurden bei den CICS- und ROESY-Experimenten alternative Methoden zur korrekten pH-Einstellung verwendet. Bei den ^1H -Messungen zur CICS-Bestimmung wurde die in Kapitel 2.1.5.3 angesprochene Wasserunterdrückungsmethode verwendet, während ROESY-Messungen mithilfe der Lyophilisation, bei der sämtliche Protonen durch schwere Protonen ausgetauscht werden, durchgeführt wurden (siehe auch Kapitel 2.1.6.1).

2.1.5.3. Wasserunterdrückung

Bei Signalen, die um ein Vielfaches höher sind als die Signale des Analyten (wie z. B. bei einem hohen Wasseranteil), kann es zu Störungen des FID kommen, wenn man den Receiver-Gain zu hoch wählt. Bei automatischer Einstellung der Signalverstärkung wird der Receiver-Gain durch das größte Signal angepasst, was wiederum zu einer Abnahme in der Intensität kleinerer Signale führt. Das in der Analyse enthaltene Restwasser beeinflusst daher sehr stark die Empfindlichkeit der Messung. Bei der Analyse geringer Analytkonzentrationen muss aus diesem Grund das Wassersignal unterdrückt werden. Ein weiterer wichtiger Grund, der die Unterdrückung des Wassersignals notwendig macht, ist die eventuelle Signalüberlagerung von Resonanzen des Analyten durch das breite Wassersignal.

Durch eine der folgenden Techniken lässt sich die Wasserunterdrückung erreichen:

- **Presaturation-Methode**^[46]

Durch das Einstrahlen eines schwachen rf-Puls von 1-3 Sekunden (siehe Abbildung 2.1.5.3-1) vor dem eigentlichen Anregungspuls (p1), der genau auf der Frequenz des zu unterdrückenden Lösungsmittelsignals liegt, werden die Lösungsmittelprotonen in einen gesättigten Zustand versetzt (Besetzung der beiden Spinenergieniveaus ist gleich groß). Der Entkoppler-Puls wird kurze Zeit

vor der Datenaufnahme ausgeschaltet. Aufgrund der großen Unterschiede in den Relaxationszeiten der Wasser- und der Analytprotonen befinden sich während der Aufnahme nur noch die Wasserprotonen im gesättigten Zustand und ergeben daher fast kein Signal mehr.

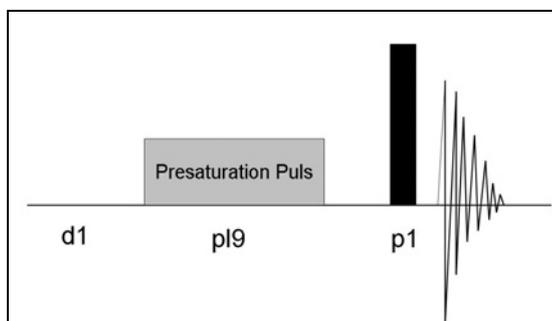


Abbildung 2.1.5.3-1: zgr-(Presaturation)-Impulsfolge

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie auch austauschbare Protonen der Analytsubstanz beeinflussen kann, die somit im Spektrum einen Intensitätsverlust erleiden bzw. nicht mehr zu sehen sind.

- **„Jump and Return“-Methode^[47]**

Durch eine $90_x\text{-}\tau\text{-}90_x$ -Impulsfolge, bei der die Pulse auf der Wasserfrequenz liegen, werden die Spins des Wassers zurück auf die +z-Achse bewegt. Nur die Frequenzen der übrigen Signale werden detektiert. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die 180° -Phasen-Verlagerung des Wassersignals und damit die einer Phasenstörung von Signalen im Bereich dieses Signals.

- **WATERGATE-Methode^[48]**

WATERGATE steht für „WATER suppression by Gradient Tailored Excitation“. Bei dieser Sequenz wird ein Gradientenecho benutzt, das nur die Nicht-Wasser-Signale betrifft. Der zwischen den Gradientenimpulsen gelegte 180° -Puls wird durch eine binominale Pulssequenz so verändert, dass die Lösungsmittelfrequenz ausgespart bleibt und somit vom Echo nicht betroffen wird. D. h. alle anderen Signale werden durch den zweiten Gradienten wieder refokussiert, während das Lösungsmittelsignal dephasiert wird. Von Nachteil ist jedoch, dass Signale, die sehr nahe an der Wasserresonanz liegen, an Intensität verlieren.

Durch Vorarbeiten von C. Meier^[49] wurden die Möglichkeiten der Wasserunterdrückung durch Presaturation und WATERGATE hinsichtlich ihrer Tauglichkeit bei CICS-Messungen untersucht. Da dicht neben dem Wassersignal die Signale von H1' des β -CD's und H5 der Dipeptide liegen, kommt es bei der WATERGATE-Sequenz zu einer starken Signaldämpfung dieser Protonen. Bei den vorliegenden Messungen wurde deshalb die Presaturation-Sequenz (zgpr) verwendet.

2.1.5.4. Ergebnisse der CICS-Messungen

Um den unterschiedlichen Einfluss von Harnstoff auf die Dipeptide bzw. deren Enantiomere zu ermitteln, wurden jeweils ^1H -Spektren von Ala-Tyr, Ala-Phe und β -Cyclodextrin mit und ohne Harnstoff aufgenommen. Des Weiteren wurden 1:1-Mischungen eines Enantiomers und des β -CD vermessen. Auch hier wurden die chemischen Verschiebungen der Komplexe jeweils einmal in Anwesenheit und in Abwesenheit von Harnstoff bestimmt.

CICS ($\Delta\delta$) sind die Abweichungen der chemischen Verschiebung (δ) bedingt durch die Veränderung der Anisotropie der betroffenen Kerne bei Komplexierung. Dabei gilt:

$$\text{Gleichung 2.1.5.4-1} \quad \Delta\delta = \delta(\text{Einzelsubstanz}) - \delta(1:1\text{-Komplex})$$

Der Effekt, der durch die Komplexierung beobachtet wird, ist in Abbildung 2.1.5.4-1 dargestellt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die beiden aromatischen Dipeptidprotonen HAr-a und HAr-b des Tyrosins stark durch die Einlagerung in die Cyclodextrinkavität beeinflusst werden.

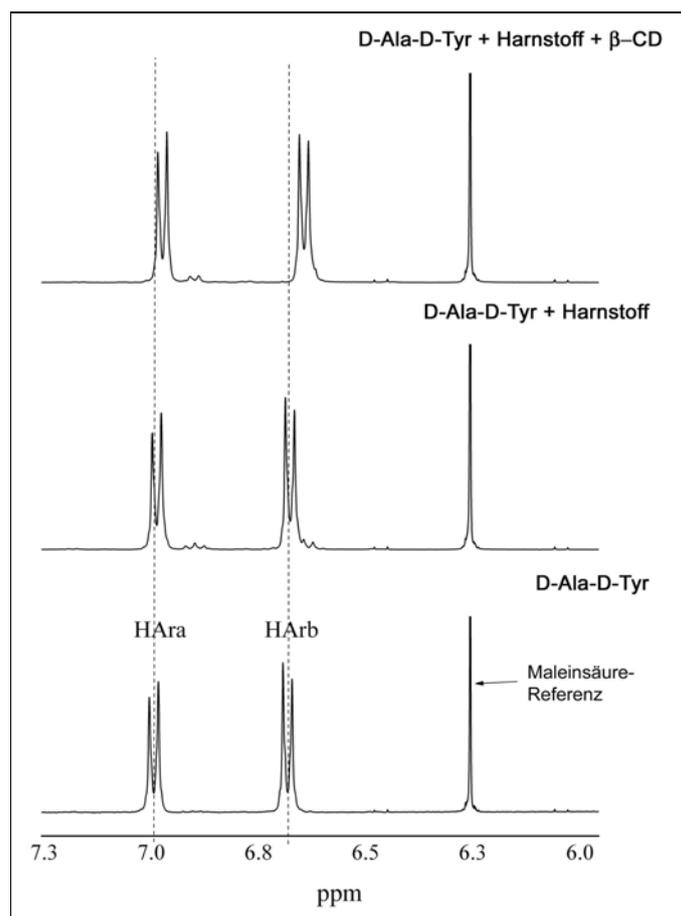


Abbildung 2.1.5.4-1: CICS der aromatischen Dipeptid-Protonen von D-Ala-D-Tyr

Alle CICS-Messungen - mit und ohne Harnstoff - bestätigten die von *C. Meier* erhaltenen Ergebnisse.^[50] Alle Dipeptide tauchen in die Cyclodextrinkavität in der Weise ein, dass der aromatische Teil des Dipeptides im endolipophilen Bereich der Kavität liegt, während die Seitenkette aus der größeren Öffnung des Cyclodextrinkonus herausragt. In der großen Hochfeldverschiebung der H3'- und H5'-Protonen des Cyclodextrins zeigt sich deutlich die starke Beeinflussung durch den aromatischen Dipeptidbereich.

Um einen ersten Einblick in den Einfluss von Harnstoff zu erhalten, wurden in Abbildung 2.1.5.4-2 die β -CD-Protonen-CICS am Beispiel von der Komplexbildung mit den DD-Dipeptiden jeweils mit und ohne Harnstoff verglichen.

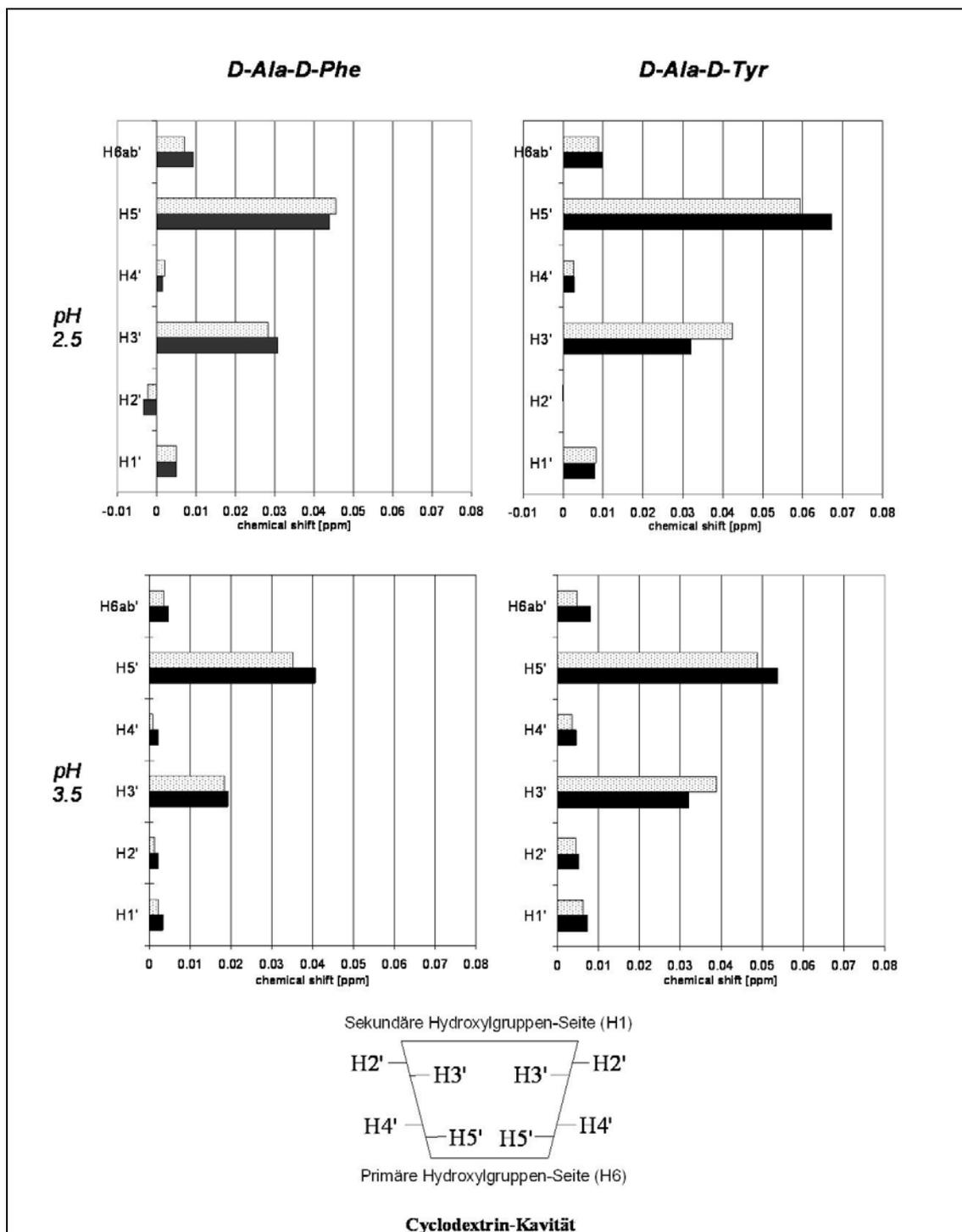


Abbildung 2.1.5.4-2: Einfluss von Harnstoff auf die CICS der β -CD-Protonen bei der Komplexbildung mit den DD-Enantiomeren (▨ = ohne Harnstoff, ■ = mit Harnstoff)

Dabei zeigt sich deutlich, dass Ala-Tyr wesentlich mehr durch den Zusatz von Harnstoff beeinflusst zu werden scheint als Ala-Phe. Ala-Phe weist besonders bei pH 2,5 fast keine Veränderung der CICS-Werte auf, was auf ein ähnliches Komplexierungsverhalten schließen lässt. Die CICS der β -CD-Protonen H5' und H6ab' sind unter dem Einfluss von Harnstoff größer als in seiner Abwesenheit.

Auch die CICS von L-Ala-L-Phe zeigen durch die Zugabe von Harnstoff keine großen Veränderungen (siehe Abbildung 2.1.5.4-3). Harnstoff scheint daher nur die Eintauchtiefe von Ala-Tyr zu beeinflussen.

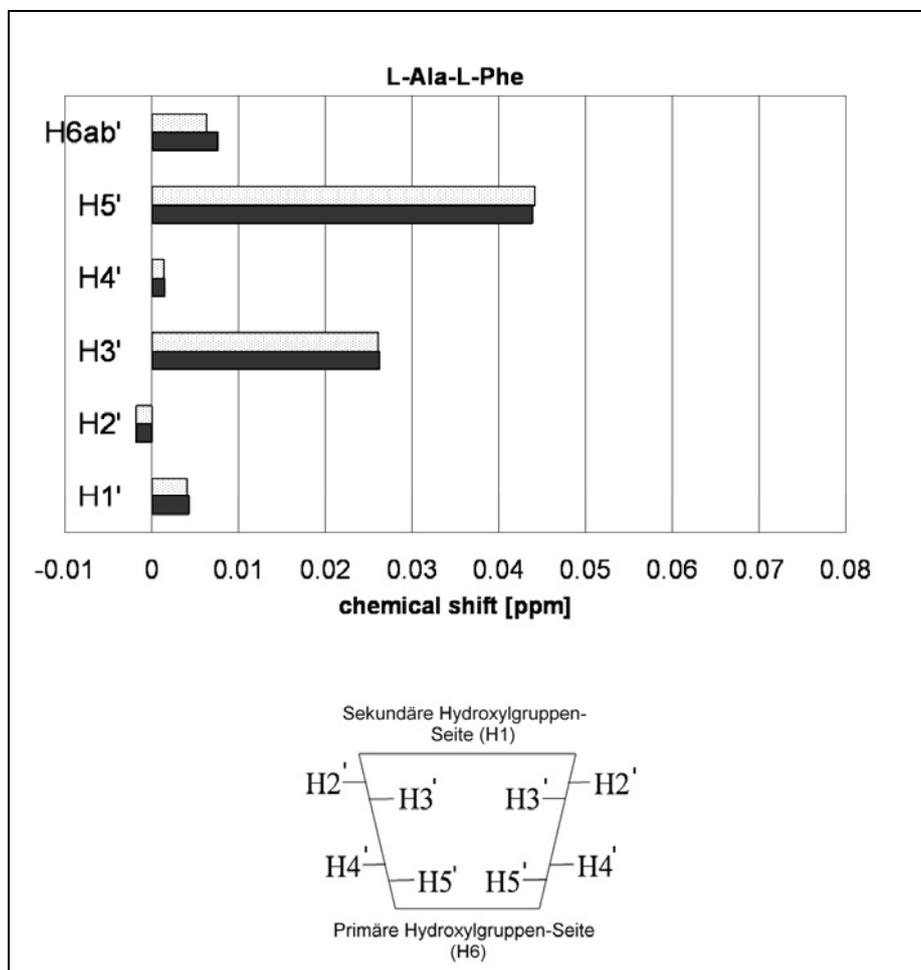


Abbildung 2.1.5.4-3: Einfluss von Harnstoff auf die CICS der β -CD-Protonen bei der Komplexbildung mit L-Ala-L-Phe bei pH 2,5 (▨ = ohne Harnstoff, ■ = mit Harnstoff)

Da die phenolische OH-Gruppe von Ala-Tyr der einzige strukturelle Unterschied zwischen den Dipeptiden ist, scheint dieser Teil die Schlüsselstruktur bei der Komplexbildung mit Harnstoff zu sein.

Um die unterschiedlichen Komplexierungsverhalten der beiden Enantiomere von Ala-Tyr genauer verstehen zu können, wird in Abbildung 2.1.5.4-4 der direkte Vergleich zwischen den Enantiomeren-CICS aufgezeigt. Dabei werden die großen Unterschiede zwischen den Enantiomere bei pH 2,5 deutlich. Während die beiden Enantiomere sich ohne Harnstoff kaum voneinander unterscheiden, zeigt D-Ala-D-Tyr mit Harnstoff die wesentlich höheren CICS für H3', H5' und H6ab'. D-Ala-D-Tyr scheint in Anwesenheit von Harnstoff viel tiefer in die Kavität einzudringen als sein Enantiomer.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Aussagen über die größeren Komplexbildungskonstanten wider, die in früheren Arbeiten mittels CE in Anwesenheit von Harnstoff nachgewiesen wurden.^[51] Das DD-Enantiomer wies in dieser Arbeit eine Bindungskonstante von 173 M^{-1} auf, während für das LL-Enantiomer 125 M^{-1} ermittelt wurde. Auch beim Übergang zu pH 3,5 liegen diese Zustände vor, allerdings in einem viel geringeren Maße als bei pH 2,5.

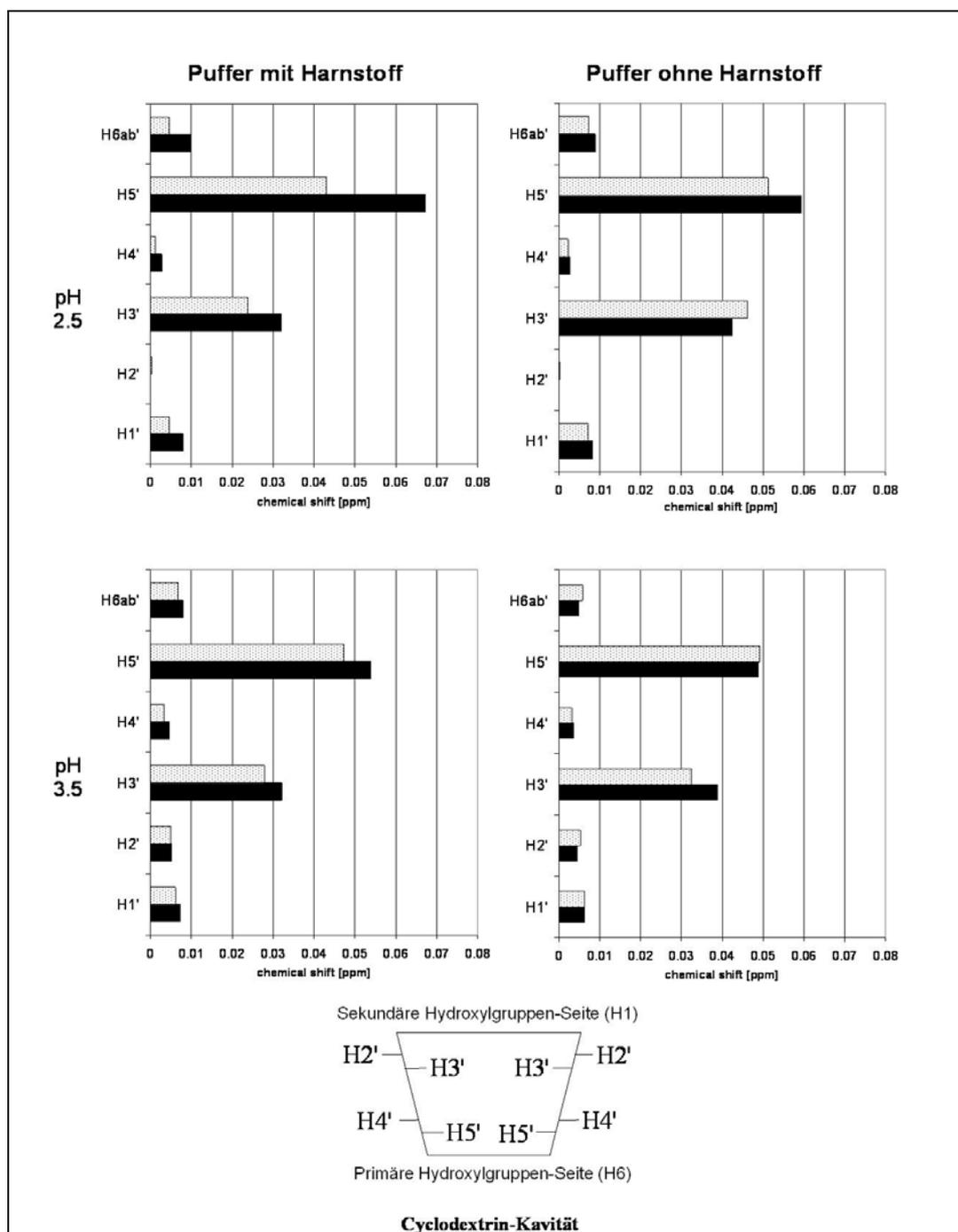


Abbildung 2.1.5.4-4: CICS von β -CD durch Komplexbildung von L-Ala-L-Tyr (▨) und D-Ala-D-Tyr (■)

Die kationische Form des LL-Enantiomer scheint in Anwesenheit von Harnstoff tiefer in die Kavität einzutauchen als seine zwitterionische Form. Die LL-CICS steigen mit steigendem pH-Wert an. Anders verhält es sich in Abwesenheit von Harnstoff. Hier fallen die CICS beim Übergang zu pH 3,5. Harnstoff greift mutmaßlich auch hier in die Komplexbildung der Enantiomere ein.

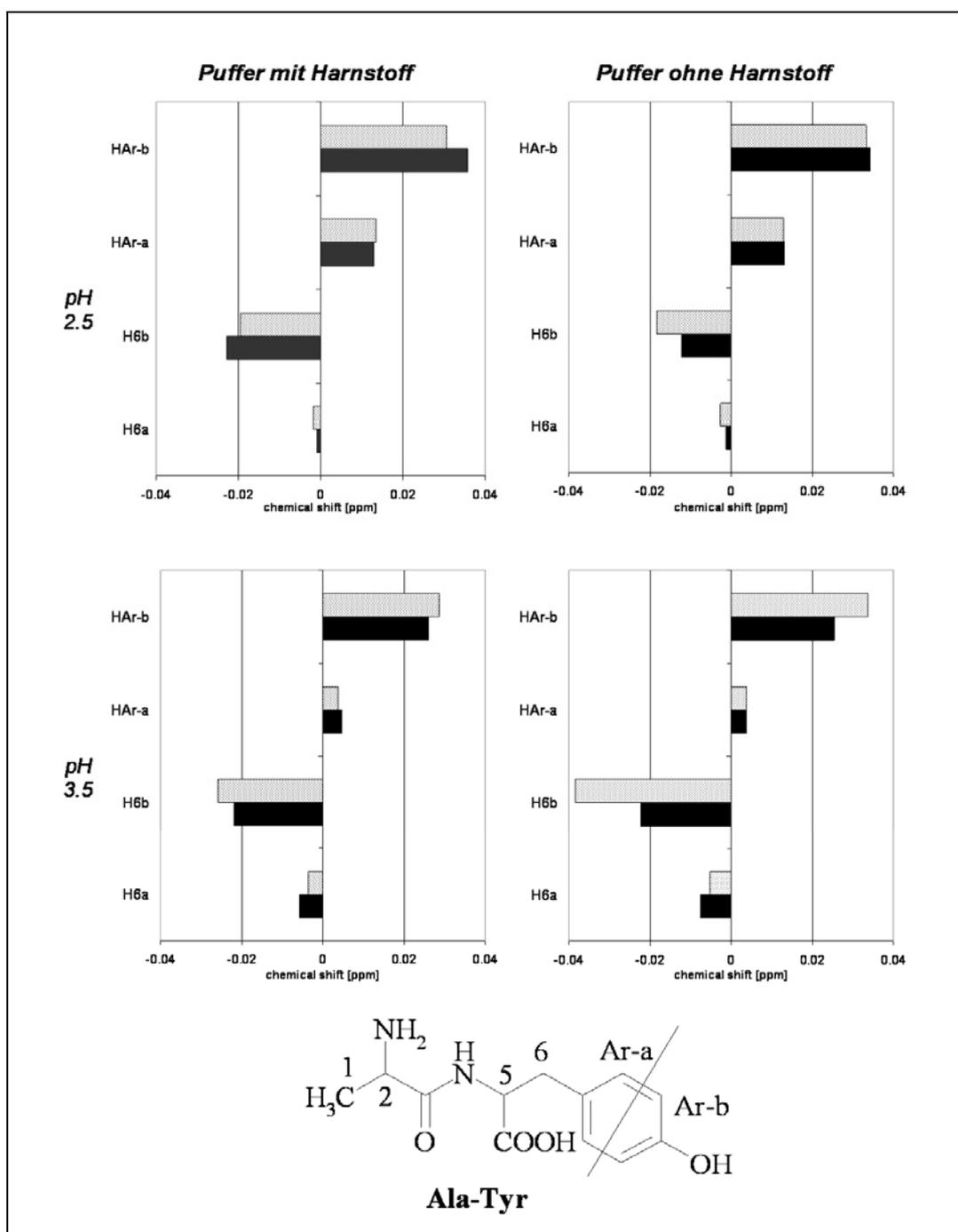


Abbildung 2.1.5.4-5: CICS der L-Ala-L-Tyr- (▨) und D-Ala-D-Tyr (■)-Protonen

Abbildung 2.1.5.4-5 zeigt die CICS der Ala-Tyr-Protonen H6ab, HAr-a und HAr-b, also diejenigen, die in direktem Kontakt zur Cyclodextrinkavität stehen. Auch diese CICS bestätigen die bisher aufgestellte Hypothese, wenn auch weniger deutlich ausgeprägt, als dies bei den Verschiebungen der β -CD-Protonen zu sehen ist. Bei pH 2,5 und in Anwesenheit von Harnstoff scheint das DD-Enantiomer, ohne Harnstoff das LL-Enantiomer begünstigt zu sein. Beim Übergang zur kationischen Form fallen die CICS von D-Ala-D-Tyr, während die von L-Ala-L-Tyr steigen.

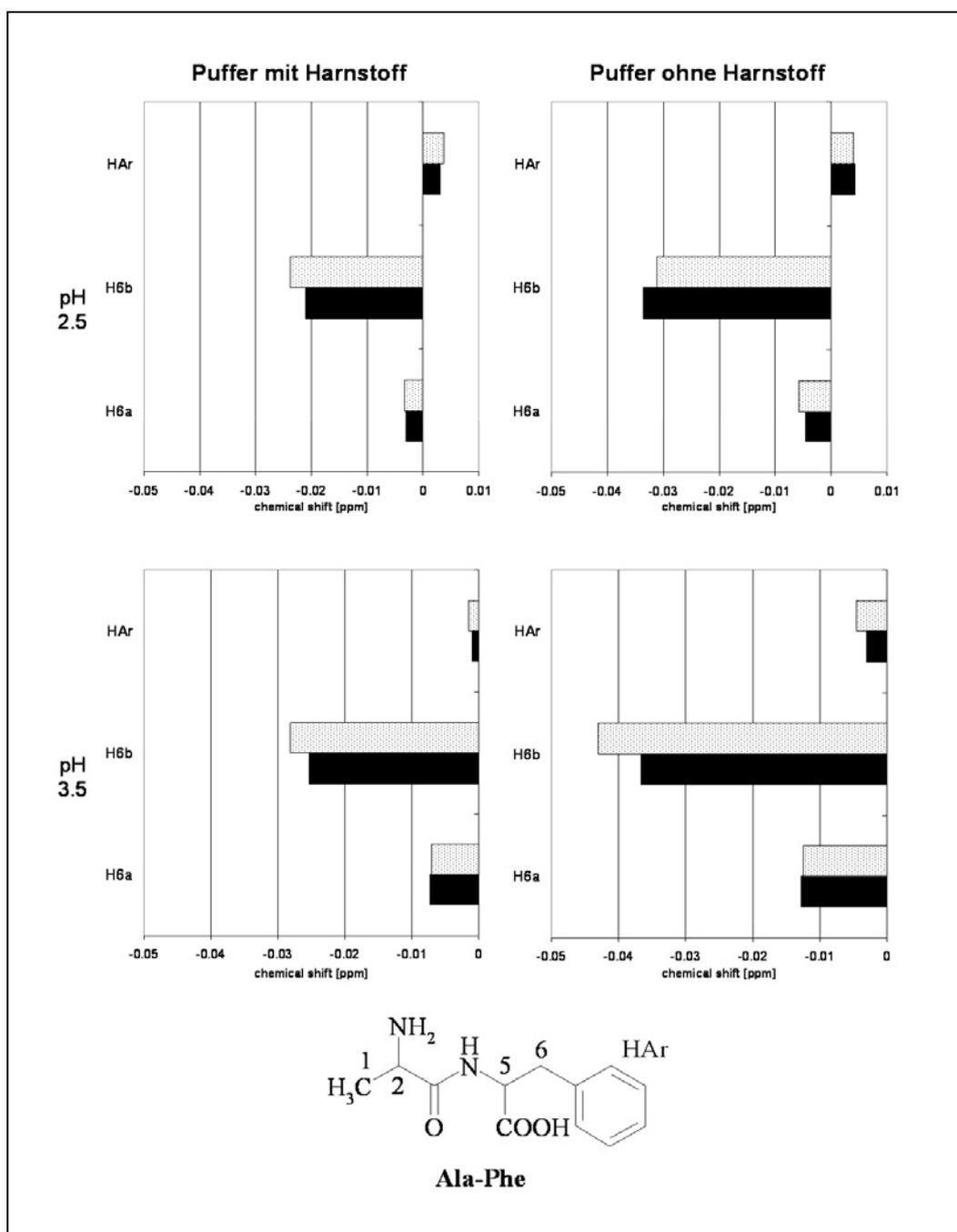


Abbildung 2.1.5.4-6: CICS der L-Ala-L-Phe- (▨) und D-Ala-D-Phe (■)-Protonen

Betrachtet man sich schließlich die chemischen Verschiebungen der Ala-Phe-Protonen, (Abbildung 2.1.5.4-6) wird deutlich, dass die CICS der Enantiomere sich sehr stark ähneln. Eine genauere Aussage über den Bindungsmodus zu machen, ist hier sehr schwer möglich. Auffällig ist die große Veränderung der CICS von H6b bei Zugabe von Harnstoff.

Zusammenfassend kann man über die CICS-Messungen folgende Aussagen treffen:

- Über die Betrachtung der β -CD-Protonen lässt sich eine genauere Aussage treffen, als über die CICS der Dipeptidprotonen.
- Ala-Tyr wird sehr viel stärker durch die Zugabe von Harnstoff beeinflusst als Ala-Phe.
- Harnstoff scheint die Komplexierung der einzelnen Enantiomere unterschiedlich stark zu beeinflussen.

2.1.6. 2D-ROESY Messungen

2.1.6.1. Lyophilisation

Lyophilisation (Gefriertrocknung, Sublimations-trocknung) ist die Trocknung von Materialien in gefrorenem Zustand. Dabei wird das zu trocknende Gut tiefgefroren und kann im Vakuum seine Feuchtigkeit abgeben. Bei den gegebenen Druck- und Temperaturbedingungen existiert kein flüssiger Aggregatzustand, sodass das Lösungsmittel vom festen direkt in den gasförmigen Zustand übergeht (siehe Abbildung 2.1.6.1-1).

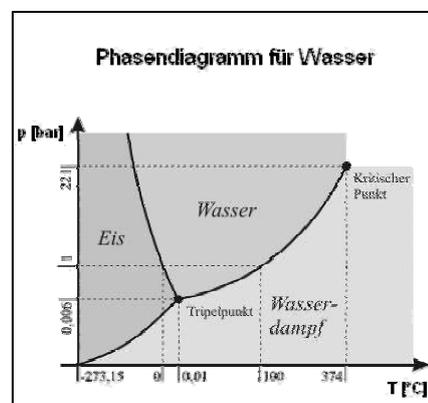


Abbildung 2.1.6.1-1: Phasendiagramm für H_2O

Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, mit einem standardmäßigen Breitband-Probenkopf (BBO) zu messen, während bei den Wasserunterdrückungs-Impulssequenzen ein inverser Probenkopf (BBI) verwendet werden sollte. Bei diesem Probenkopf sitzt die Protonenspule innen, d.h. dass die Impulse des Protonenkanals sehr viel stärker sind als dies beim BBO-Kopf der Fall ist. Damit kann sowohl ein besseres S/N-Verhältnis erreicht werden, als auch das Wassersignal stärker un-

terdrückt werden. BBI-Köpfe sind allerdings in der Handhabung sehr viel komplexer, weswegen bei den ROESY-Messungen ein BBO-Messkopf zum Einsatz kam.

Bei der Lyophilisationsmethode kann der pH-Wert der Messlösung sehr exakt eingestellt werden, da man hier den Puffer im Wässrigen herstellt und das erhaltene Lyophilisat in D_2O aufnimmt. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Vorgangs können sämtliche Protonen durch Deuterium ausgetauscht werden. Dabei bleibt der Dissoziationszustand der Dipeptide gleich („memory effect“).^[52,53] Somit muss in der ROE-Impulsfolge keine zusätzliche Wasserunterdrückung eingebaut werden.

Bei den durchgeführten ROESY-Messungen wurden die jeweiligen Analysenlösungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, lyophilisiert und das Lyophilisat mit der exakt gleichen Menge D_2O wieder aufgenommen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde mit der Analytlösung ein ROESY-Experiment aufgenommen.

2.1.6.2. Ergebnisse der ROESY-Messungen

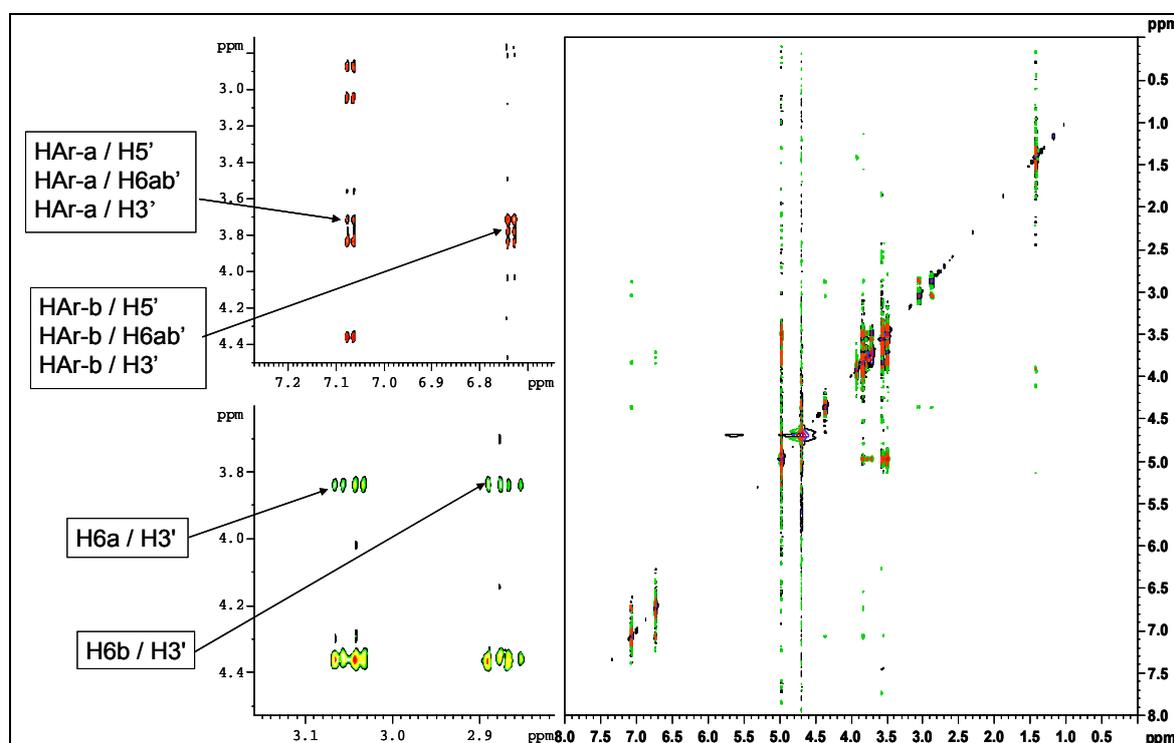


Abbildung 2.1.6.2-1: ROESY-Spektrum von *D*-Ala-*D*-Tyr in Anwesenheit von Harnstoff bei pH 3,5

In Abbildung 2.1.6.2-1 ist ein typisches ROESY-Diagramm des Dipeptid- β -CD-Komplexes dargestellt. Die Kreuzpeaks geben einen direkten Zusammenhang zwischen räumlich benachbarten, zu verschiedenen Molekülen gehörenden Protonen wider. So lassen sich auch kleine Veränderungen des Komplexierungsmodus wesentlich genauer als bei den CICS-Messungen detektieren. Protonen, die sich in unmittelbarer Nähe befinden, ergeben intensivere Kreuzsignale als Protonen, die weiter voneinander entfernt sind. So weisen z. B. die Protonen von Ala-Tyr in meta-Stellung (HAr-b) eine hohe räumliche Nähe zum H5' und H6ab' des β -CD auf, also zu denjenigen Protonen, die sich am unteren Ende der Kavität befinden (siehe Abbildung 2.1.6.2-2).

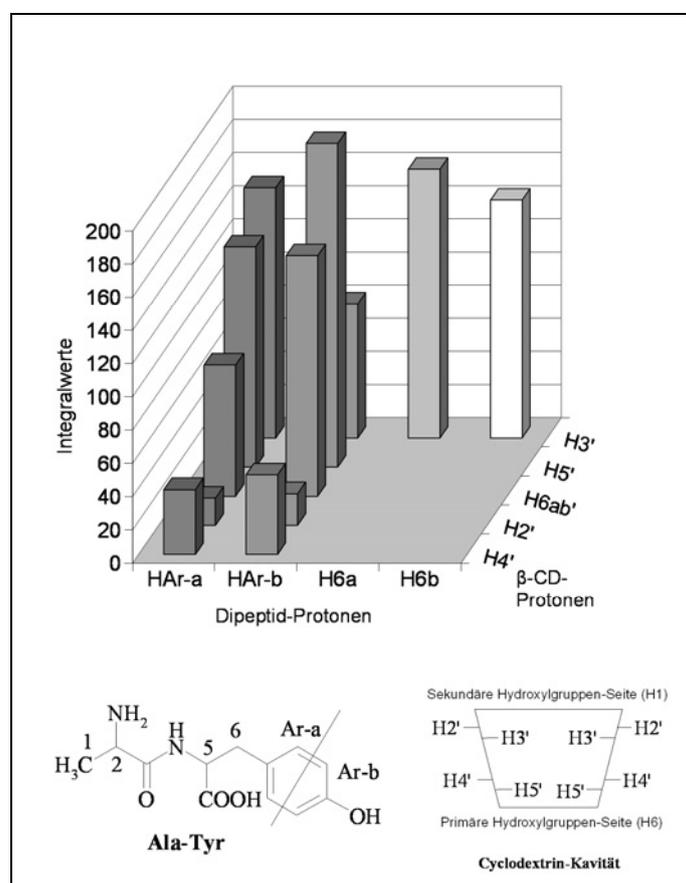


Abbildung 2.1.6.2-2: Integralwerte von D-Ala-D-Tyr mit β -CD bei pH 2,5 in Anwesenheit von Harnstoff

Dementsprechend zeigen die Kreuzsignale von H3' (Protonen an der sekundären Hydroxylgruppen-Seite) höhere Intensitäten für die Wechselwirkung mit den Dipeptidprotonen in ortho-Stellung (HAr-a) und den Protonen der Seitenkette (H6a und H6b).

Um auch hier einen Einblick in den Einfluss von Harnstoff zu bekommen, wurden ROESY-Experimente der Enantiomere beider Dipeptide mit und ohne Harnstoff bei pH 2,5 und 3,5 durchgeführt und die Signalfächen der erhaltenen Kreuzsignale ausgewertet. Um alle aufgenommenen Spektren miteinander vergleichen zu können, wurde das Kreuzsignal von H1'-H4' des β -CD als Referenzsignal verwendet, da angenommen werden kann, dass der Abstand dieser beiden Protonen unter allen experimentellen Gegebenheiten immer konstant bleibt.

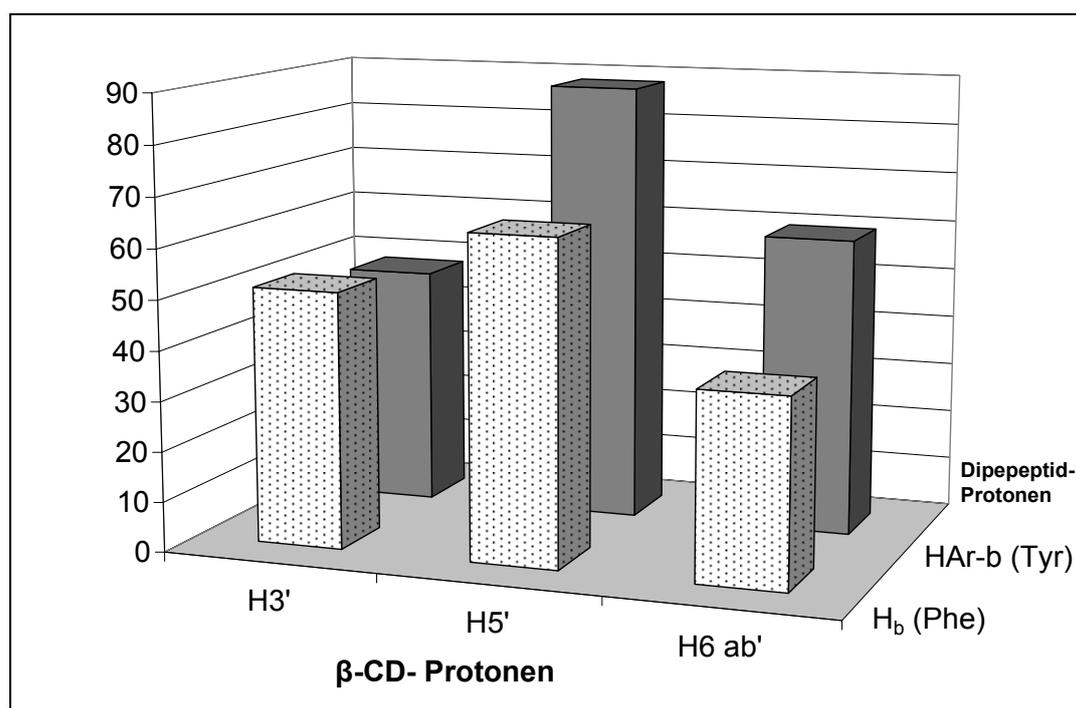


Abbildung 2.1.6.2-3: Integralwerte der ROESY-Kreuzpeaks zwischen β -CD und D-Ala-D-Tyr (■) bzw. D-Ala-D-Phe (▨) in Anwesenheit von Harnstoff

In Abbildung 2.1.6.2-3 ist der Einfluss von Harnstoff auf die unterschiedlichen Dipeptide dargestellt. Dabei wurden speziell die aromatischen Protonen betrachtet, die sich in meta-Stellung zur Seitenkette befinden (H_b für Ala-Phe, HAr-b für Ala-Tyr), um genaue Aussagen über die Eintauchtiefe treffen zu können. Aufgrund der intensiveren Kreuzpeaks zwischen HAr-b und H5' bzw. H6ab' und dem nicht so stark ausgeprägten Signal zwischen HAr-b und H3', sieht man sehr deutlich, dass der aromatische Bereich von Ala-Tyr weiter in die Kavität eintaucht, als dies bei Ala-Phe der Fall ist. Dieses Ergebnis stimmt mit der in Kapitel 2.1.5.4 erhaltenen Aussage überein, dass Harnstoff die Komplexbildung von Ala-Tyr in einem höheren Maße beeinflusst, als

dies bei Ala-Phe der Fall ist. In weiteren Studien wurden daher die Enantiomere von Ala-Tyr genauer untersucht (siehe Abbildung 2.1.6.2-4).

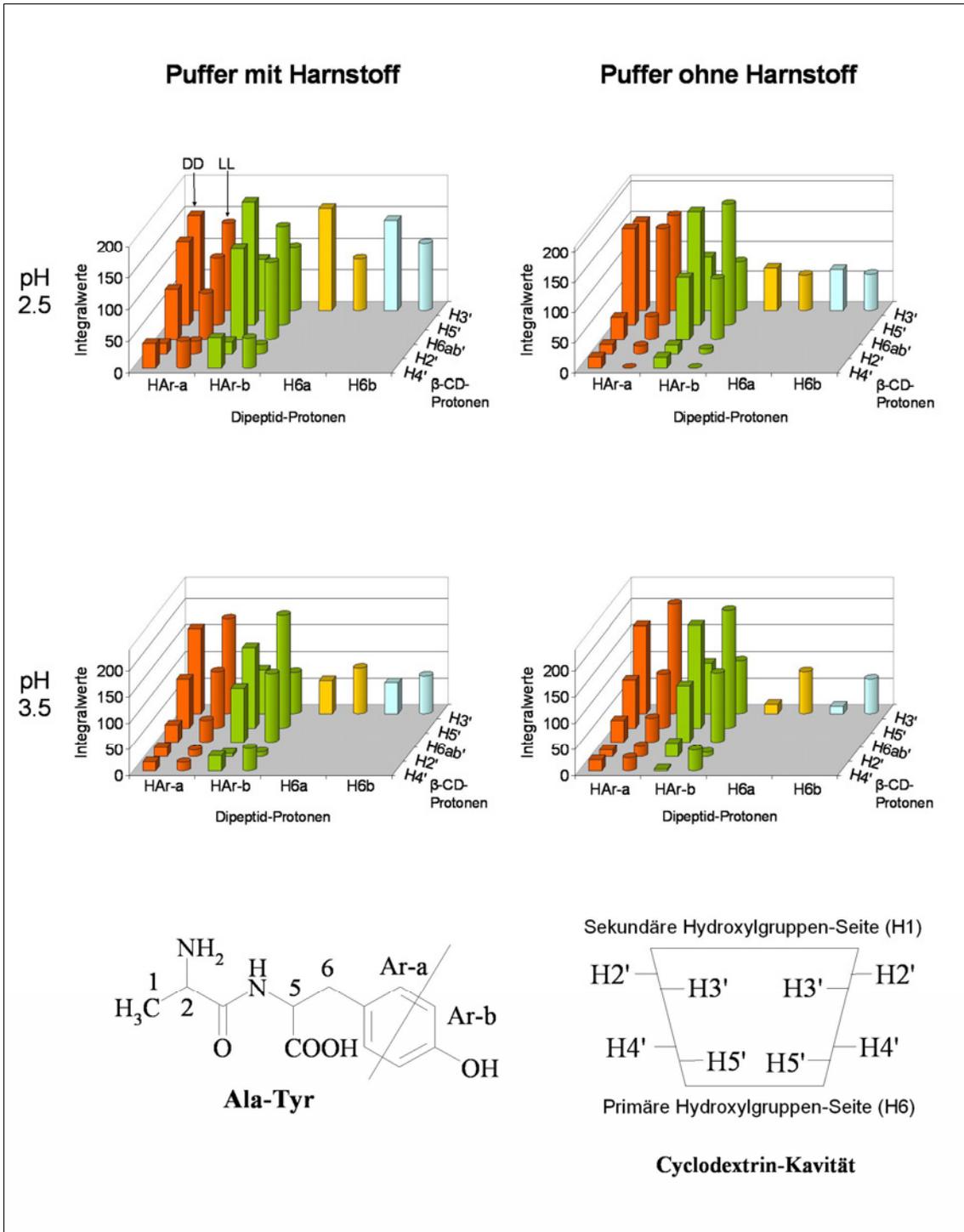


Abbildung 2.1.6.2-4: Kreuzpeak-Intensitäten zwischen β -CD, D-Ala-D-Tyr (Quader) bzw. L-Ala-L-Tyr (Zylinder)

Bei pH 2,5 in Abwesenheit von Harnstoff unterscheiden sich die Kreuzsignal-Intensitäten nur unwesentlich voneinander. Unter diesen experimentellen Bedingun-

gen scheinen die Enantiomere sehr ähnlich in der Kavität zu liegen. Damit lässt sich die geringe chirale Erkennung von β -CD zu den Enantiomeren erklären, die während den CE-Messungen bei diesem pH-Wert ohne Harnstoff beobachtet wurden. Bei der Zugabe von Harnstoff ändert sich dieser Sachverhalt jedoch drastisch. Die Wasserstoffkerne HAr-a, HAr-b, H6a und H6b von D-Ala-D-Tyr weisen jeweils stärkere Intensitäten auf als die korrespondierenden Wasserstoffe des LL-Enantiomers. Dieses Resultat deutet auf ein tieferes Eindringen von D-Ala-D-Tyr hin, was zusätzlich durch ein schwächeres Signal zwischen H3' und HAr-b bestätigt wird. Dieser Sachverhalt bestätigt auch die bei den CICS-Messungen erhaltenen Ergebnisse, bei denen ebenfalls das DD-Enantiomer bei pH 2,5 größere Verschiebungen ergab.

Bei pH 3,5 scheint Ala-Tyr viel weniger stark durch Harnstoff beeinflusst zu werden, was an den sehr ähnlichen Integralmustern zu ersehen ist. Doch auch bei diesem pH-Wert lassen sich kleinere Unterschiede ausmachen: die Kreuzsignale H3'/H6a und H3'/H6b von D-Ala-D-Tyr steigen bei Zugabe von Harnstoff an, während H5'/HAr-b abfällt. Eventuell liegt auch hier ein etwas unterschiedlicher Komplexierungsmodus vor. Vergleicht man die Kreuzpeakintensitäten der einzelnen pH-Werte ohne Harnstoff fällt auf, dass sich die Intensitätsmuster sehr ähnlich sind. Die Integraldifferenzen der aromatischen Protonen (HAr-a, HAr-b) mit H3', H5' und H6ab' sind vergleichbar zwischen den Enantiomeren. Unterschiede treten nur bei H3'/H6a und H3'/H6b auf, also am oberen Rand der Kavität. Daher scheint sich die Komplexstruktur in Abwesenheit von Harnstoff beim Übergang auf einen höheren pH-Wert kaum zu ändern. Im Gegensatz dazu kann man signifikante Unterschiede zwischen den pH-Werten beim Einsatz von Harnstoff beobachten. Im Falle von D-Ala-D-Tyr treten größere Intensitäten bei pH 2,5, während L-Ala-L-Tyr die stärkeren Intensitäten bei pH 3,5 zeigt. Die lässt die Vermutung zu, dass das DD-Enantiomer bei pH 2,5, das LL-Enantiomer bei pH 3,5 tiefer in die Kavität eindringt. Die Änderung der Lage der Dipeptide im β -CD ist jedoch kein Beweis für eine stärkere Bindungskonstante des Komplexes und steht demnach nicht im Widerspruch zu den von *Scriba et al.*^[51] gemachten Beobachtungen. Hier wurden stärkere Bindungskonstanten von D-Ala-D-Tyr bei beiden pH-Werten festgestellt, die Umkehr der Migrationsreihenfolge wurde aber als die Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit interpretiert.

Man sollte jedoch bei den ROESY-Messungen stets bedenken, dass diese in D₂O durchgeführt werden, wohingegen CICS- und CE-Experimente im Wässrigen statt-

finden. Wenn diese beiden Lösungsmittel sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden, sollte trotzdem das Dissoziationsgleichgewicht beider Dipeptide sehr ähnlich sein.

Zusammenfassend kann man über die ROESY-Experimente folgendes sagen:

- In Anwesenheit von Harnstoff taucht Ala-Tyr sehr viel tiefer in die Kavität ein als Ala-Phe.
- Harnstoff scheint die chirale Erkennung der Enantiomere unterschiedlich stark zu beeinflussen.
- Bei unterschiedlichen Dissoziationszuständen übt Harnstoff einen stärkeren Effekt auf die unterschiedlichen Enantiomere aus.

2.1.7. Moleküldynamik-Simulations-Studien

2.1.7.1. Einführung

Eines der wichtigsten Werkzeuge in der theoretischen Untersuchung von Biomolekülen und ihrer Komplexe ist die der „Moleküldynamik (MD)“-Simulation. Diese computergestützte Methode berechnet das Verhalten eines Moleküls (-komplexes, Ansammlung von Molekülen) über eine gewisse Zeitspanne und wird mittlerweile routinemäßig durchgeführt, um die Struktur und (Thermo)-Dynamik von Molekülen zu berechnen. *Alder* und *Wainwright* erwähnten als erste diese Art der Untersuchung,^[54,55] wobei die erste MD-Simulation eines realen Systems von *Rahman* und *Stillinger* anhand von Wasser ausgeführt wurde.^[56]

MD basiert wesentlich auf den Prinzipien der Statistischen Mechanik. Diese schlägt eine Brücke zwischen den mikroskopischen und makroskopischen Zuständen eines Systems. Makroskopische Zustandsvariablen können dabei aus den statistischen Verteilungen der Mikrozustände abgeleitet werden. Der Hauptpfeiler, auf den sich die MD-Simulation dabei beruft, ist die „ergodische Hypothese“. Diese besagt, dass der Durchschnitt eines Prozessparameters über einer Zeitspanne gleich dem Durchschnitt über der statistischen Gesamtheit ist. Somit ist es dasselbe, die Zustände eines Systems über eine längere Zeitdauer oder viele Systeme zu einem genau definierten Zeitpunkt zu betrachten (Ensemblemittel = Zeitmittel).

Bei den klassischen MD-Simulationen werden die Newton'sche Gesetze als Basis verwendet, da quantenmechanische Lösungsansätze zwar sehr viel genauere Er-

gebnisse liefern, jedoch der extrem große Rechenaufwand dazu in keiner Relation steht. Newton's Gleichung der Bewegung ist gegeben durch

$$\text{Gleichung 2.1.7.1-1} \quad \vec{F}_i = m_i \cdot \vec{a}_i$$

wobei F_i die Kraft ist, die auf den Partikel i wirkt, m_i seine Masse und a_i dessen Beschleunigung. Da sich außerdem die Kraft F_i als die negative Ableitung der Potentiale V und den Ortskoordinaten r_i beschreiben lässt, also

$$\text{Gleichung 2.1.7.1-2} \quad F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i}$$

lassen sich diese beiden Gleichungen zu folgender zusammenfassen:

$$\text{Gleichung 2.1.7.1-3} \quad -\frac{\partial V}{\partial r_i} = m_i \cdot a_i = m_i \cdot \frac{\partial v_i}{\partial t} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2}$$

Integriert man diese Gleichung erhält man eine Trajektorie, die die Raumkoordinaten, Geschwindigkeit und Beschleunigung der Partikel in Bezug auf die Zeit beschreibt. Es gibt mehrere numerische Integrationsalgorithmen, die diese Differentialgleichung lösen:

- Verlet-Algorithmus: einfacher Algorithmus, der wenig Speicher benötigt, jedoch nicht sehr genau ist. Enthält keinen expliziten Ausdruck für die Geschwindigkeit,
- Beeman's-Algorithmus: bietet einen genaueren Ausdruck für die Geschwindigkeiten und eine bessere Energiekonservierung, ist jedoch ein eher komplexer Algorithmus,
- Leap-frog-Algorithmus: Hier werden die Geschwindigkeiten zuerst bei $t+1/2\Delta t$ berechnet und damit dann die Raumkoordinaten bei $t+\Delta t$ (siehe Gleichung 2.1.7.1-4 und Gleichung 2.1.7.1-5). Auf diese Weise „springen“ (leap) die Geschwindigkeiten über die Koordinaten und daraufhin die Geschwindigkeiten über die Positionen der Partikel. Der Vorteil bei diesem Algorithmus ist, dass sich die Geschwindigkeiten explizit berechnen lassen, jedoch nicht zur gleichen Zeit wie die Raumkoordinaten.

Gleichung 2.1.7.1-4

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \Delta t \cdot v_i(t + \Delta t/2)$$

Gleichung 2.1.7.1-5

$$v_i(t + \Delta t/2) = v_i(t - \Delta t/2) + \Delta t \cdot a_i(t) = v_i(t - \Delta t/2) + \Delta t \cdot \frac{F_i(t)}{m_i}$$

Zusammenfassend bedeutet das, dass sich bei bekannter Anfangsgeschwindigkeit, Startkoordinaten und Beschleunigung – die über den Gradienten der Energiepotentiale verknüpft ist – zu allen Zeitpunkten die Trajektorie des Partikels berechnen lässt. Die Kraft, die dabei auf das Teilchen wirkt, wird zu jedem Zeitpunkt über Kraftfeldmethoden neu berechnet.

Kraftfeldmethoden sind empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und –energien. Dabei wird der energetisch günstigste Zustand eines Moleküls oder eines Komplexes aus mehreren Molekülen berechnet. Der Pfeiler, auf dem diese Theorie beruht, ist die Annahme, dass Bindungslängen und Bindungswinkel immer Standardwerte einnehmen. Ein Kraftfeld setzt sich aus den Einzelbeiträgen der verschiedenen Potentiale zwischen den Atomen zusammen. Dabei unterscheidet man kovalente Wechselwirkungen wie z. B. Energieänderungen bei Änderung der

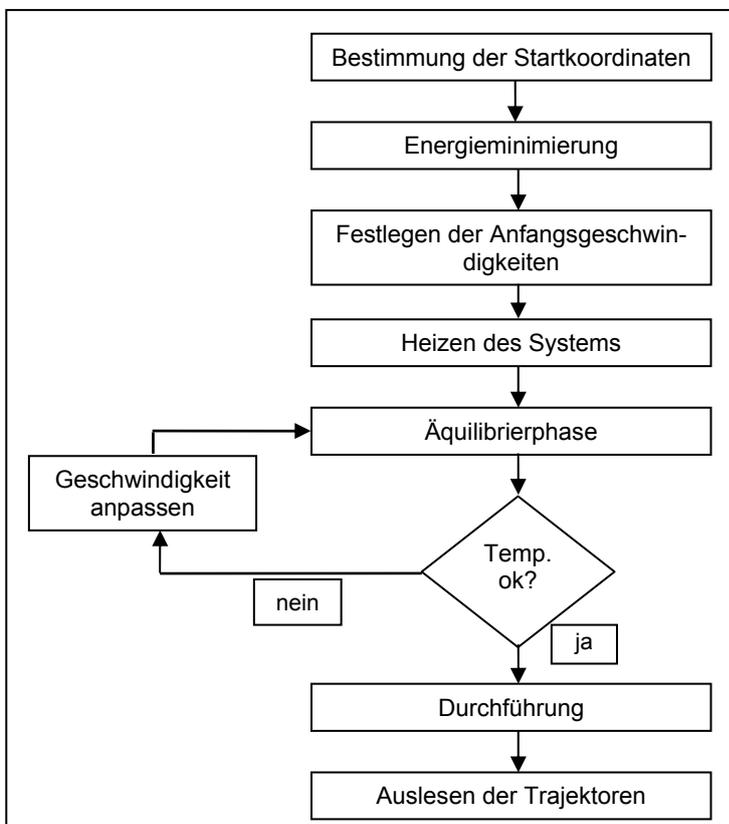


Abbildung 2.1.7.1-1: Abfolge einer MD-Simulation

Bindungslänge, des Bindungswinkel und der Torsion und nichtkovalente Beiträge wie van-der-Waals-Energien und elektrostatische Energien. Die Ableitung eines Kraftfelds erfolgt durch Kalibrierung an experimentellen Daten und aus den Resultaten möglichst genauer quantenmechanischer Rechnungen. Hierzu dienen vor allem 3D-Strukturen kleiner Moleküle, sowie aus Infrarot- und Ramanspektroskopie abgeleitete Kraftkonstanten. Häufig verwendete Kraftfelder sind

CHARMM^[57], GROMOS^[58] und AMBER^[59]. In Abbildung 2.1.7.1-1 ist schematisch der Aufbau einer MD-Simulation (eines einzelnen Schrittes, der n-mal durchlaufen wird) dargestellt. Folgende Schritte sind dabei implementiert:

- **Bestimmung der Startstruktur und Festlegen der Parameter**

Die Startstruktur wird meist aus kristallographischen Daten gewonnen, die in Datenbanken hinterlegt sind (z. B. Cambridge-Datenbank^[60] oder Brookhaven-Protein-Datenbank^[61]). An dieser Stelle wird auch die Struktur mit Wassermolekülen „solvatisiert“ und eventuelle Ionen zugegeben. Dieses geschieht meist über eine Wasserbox, in die die Zielstruktur gesetzt wird.

- **Energieminimierung**

Die gesetzte kristallographische Struktur entspricht im Wässrigen nicht unbedingt der energieärmsten Struktur. Es wird also eine Kraftfeldrechnung durchgeführt, um ein Energieminimum zu erhalten.

- **Anfangsgeschwindigkeit festlegen und Hochheizen des Systems**

Zu Beginn werden allen Atomen Geschwindigkeiten zugeordnet, die im Mittel der gewünschten Temperatur entsprechen. Ist dies erreicht, werden schrittweise neue Geschwindigkeiten zugeordnet und das System dadurch erwärmt, solange bis die Zieltemperatur erreicht ist.

- **Equilibrierungsphase**

In dieser Phase wird dem System Zeit gegeben, in das thermische Gleichgewicht zu kommen, bis es einen stabilen Zustand erreicht.

- **Eigentliche MD-Simulation**

Mit der vorgegebenen Schrittweite wird die neue Position der Struktur ermittelt und dann wieder die Kraft ausgerechnet, die durch die umgebenden Atome auf dieses Teilchen wirkt. Die Trajektorie wird ausgelesen und weiter verarbeitet.

Die wichtigsten Parameter, die bei der Durchführung einer solchen MD-Studie eingestellt werden müssen und die auch das größte Fehlerpotential beinhalten, sind die Wahl der richtigen Startkoordinaten und die Wahl der richtigen Schrittweite (Δt). Diese sollte in ihrer Größenordnung unter der schnellsten, im System vorkommenden Bewegung liegen, um Fehlinformationen zu vermeiden. Zu klein gewählte Δt -Zeiten können jedoch die Rechenzeit extrem verlängern.

MD-Studien simulieren meist ein Zeitintervall zwischen einigen 100 ps bis 10 ns, je nachdem was für eine Art von Bewegung beobachtet werden soll.

2.1.7.2. Durchführung der MD-Simulationen

Der Ablauf der MD-Simulationen wurde von *Kahle et al.* ^[50] übernommen und an die vorliegenden Bedingungen angepasst. Simuliert wurden nur die Kationen der jeweiligen Dipeptide, da sich bei pH 2,5 die größten Unterschiede in den vorhergegangenen Experimenten ergaben. Folgende Schritte wurden zur Durchführung der Simulationen vollzogen:

- 2D-Strukturen wurden aus „ISIS Draw“ übernommen und in „DS Viewer“ importiert.
- Die 2D-Strukturen der Dipeptide wurden mittels „ACCELRYDS DS VIEWER PRO“^[62] in eine 3D-Struktur umgewandelt.
- Die Dipeptid-Strukturen wurden mittels eines CHARMM-Kraftfelds, das im Tripos-Programm SYBYL^[63] implementiert ist, energieminiert. Die Energieminimierung kann schon an dieser Stelle vollzogen werden, da die NMR-spektroskopischen Messungen zeigten, dass durch die Komplexbildung mit β -CD keine Konformationsänderung der Dipeptide stattfindet (Kopplungskonstanten der Dipeptide im freien und gebundenen Zustand unterscheiden sich nicht).
- Die Ausgangsstruktur des Dipeptid/ β -CD-Komplex wurde mittels einer ähnlichen Komplexstruktur erstellt. Bei dieser Modellstruktur handelt es sich um N-Acetyl-L-Phenylalaninchlathrat (CCD-Code: AGAZIR)^[64], das der „*Cambridge Structural Databank*“ (CCD) entnommen und mit dem „ACCELRYDS DS VIEWER PRO“ modifiziert wurde. Dabei wurde ein einzelner Komplex als Vorlage gespeichert und die energieminierten Dipeptide manuell in das Zentrum der Kavität gesetzt, wobei das zu untersuchende Dipeptid an das vorhandene N-Acetyl-L-Phenylalaninchlathrat durch Angleichung ihrer molekularen Grundgerüstketten angepasst wurde. Bei diesem Vorgang wurden die Phenylalanin-Substrukturen des originalen und des neuen Liganden überlagert. N-Acetyl-L-Phenylalaninchlathrat wurde daraufhin schrittweise entfernt und somit für jedes Dipeptid ein neuer Datensatz erstellt.

- Die Strukturen wurden mit Hilfe von OpenBabel^[65] in ein von Packmol^[66] lesbares Format konvertiert. Anschließend wurde der Komplex mittels der in Packmol implementierten Standardprozedur in einer Wasserbox mit 9167 Wasser- und (im Falle von Puffern mit Harnstoff) mit 113 Harnstoffmolekülen gelöst (siehe Abbildung 2.1.7.2-1). Die Anzahl von Harnstoffmolekülen entspricht damit der experimentellen Konzentration

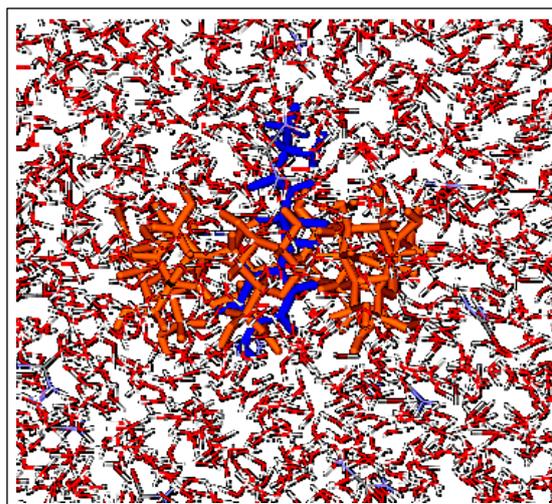


Abbildung 2.1.7.2-1: Ausschnitt aus der Wasserbox von D-Ala-D-Tyr (blau) mit β -CD (orange) in Anwesenheit von Harnstoff (hellblau)

von 681 mM abgestimmt auf genau einen Komplex. Die erhaltene Datei wurde mittels VEGA^[67,68,69] und selbstentwickelter Konvertierungsprogramme in die eigentliche MD-Simulationssoftware NAMD^[70,71] eingebracht. Dieses MD-Simulationsprogramm wurde von der „Computational Biophysics Group“ des „Beckman Institute for Advanced Science and Technology“ an der Universität von Illinois entwickelt. Um eine genügend lange Simulationszeit zu gewährleisten, wurde die Simulation auf einem Cluster durchgeführt, der 20 3-GHz-Pentium-Prozessoren beinhaltet. Als Kraftfeld wurde das in NAMD integrierte CHARMM-Feld verwendet.

- In der Anfangsphase wurde das System für 1000 fs in 0,5-fs-Schritten energieminiert, was 2000 Schritten entspricht. Die eigentliche Simulation wurde für 1 ns in 0.5 fs bei 300 K durchgeführt. Es wurde dabei ein NPT-Ensemble verwendet, d. h. Teilchenzahl, Druck und Temperatur wurden konstant gehalten. Dafür wurde die in NAMD standardmäßig implementierte Langevin-Dynamik verwendet. Außerdem wurde die Dielektrizitätskonstante entsprechend konstant gehalten, um die realen Bedingungen möglichst widerzuspiegeln. Die ersten 250 ps der Simulation wurden verwendet, um dem System Zeit zu geben, in einen thermodynamisch stabilen Zustand zu gelangen. Diese Equilibrierungsphase wurde für die Auswertung nicht verwertet. Während der Simulation wurden alle 500 fs die Trajektorien als Datei gespeichert und danach weiter analysiert.

2.1.7.3. Auswertung der Simulationen

Um die Komplexierung der Dipeptide besser verfolgen zu können, muss ein Bezugspunkt gefunden werden, um Veränderungen der Eintauchtiefe zu erkennen und auszuwerten. In früheren Arbeiten zeigten die Messungen der Distanz zwischen einzelnen Atomen kein zufriedenstellendes Ergebnis, da diese Methode nur ein unscharfes Bild des Komplexes wiedergibt. Um die Eintauchtiefe besser zu charakterisieren, wurde eine Ebene in die β -CD-Kavität gelegt. Diese Methode spiegelt die realen Verhältnisse besser wider, da auch ROESY-NMR-Signale ein Mittel aus z. B. sämtlichen H5'-Protonen des β -CD darstellen. Für jeden Komplex wurden daher 7 Punkte definiert, wobei 6 Punkte von den C5'-Atomen des β -CD und einer vom eingeschlossenen Dipeptid stammt. Die β -CD-Punkte wurden als p_1 bis p_6 bezeichnet. Die Koordinaten dieser Punkte wurden aus der Trajektorien-datei in MATLAB^[72] mittels MATDCD^[73] eingelesen. In einem nächsten Schritt wurde die Ebene in der β -CD-Kavität durch die C5'-Atome eingepasst (siehe Abbildung 2.1.7.3-1).

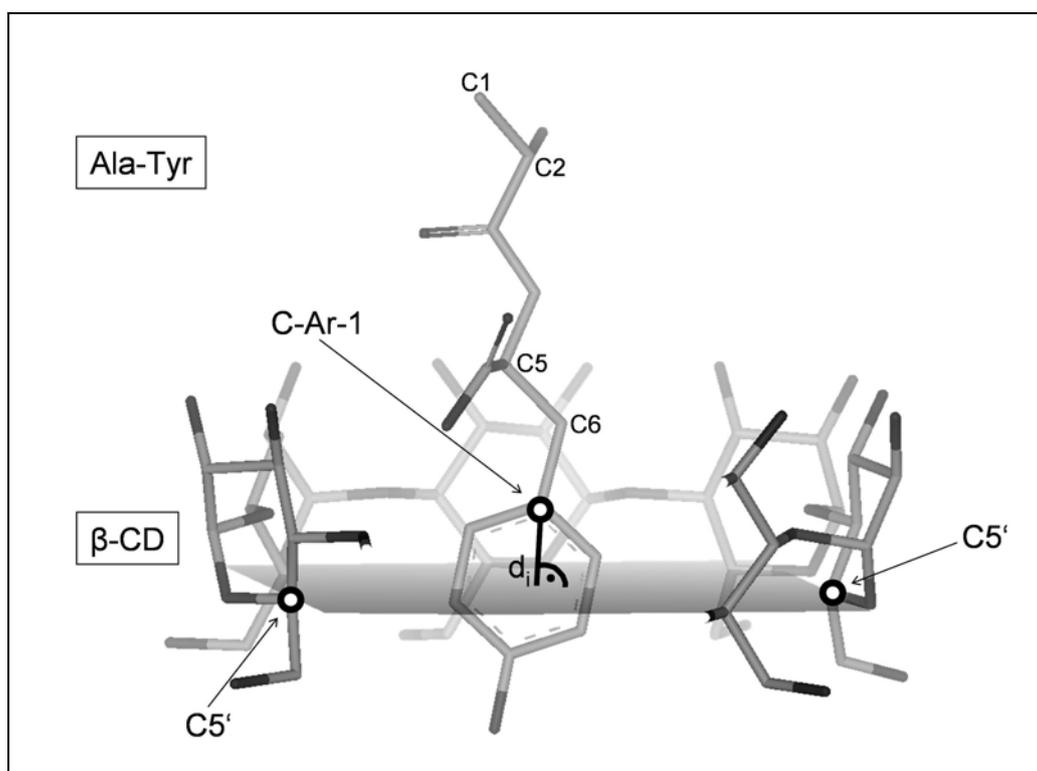


Abbildung 2.1.7.3-1: Zwischen den C5'-Atomen des β -CD eingerechnete Ebene. Eintauchtiefe d_i des Dipeptids in Relation zur Ebene (nach Lit.^[50])

Die Eintauchtiefe d_i wurde dann in MATLAB folgendermaßen berechnet: es wurden zwei Datensätze generiert, um die Robustheit dieser Methode zu überprüfen. Der

erste Datensatz wurde mit den Punkten p_1 , p_3 , und p_5 , der zweite Datensatz mit den Punkten p_2 , p_4 und p_6 berechnet. Im Folgenden werden der Einfachheit halber für die Punkte p_1 und p_2 die Bezeichnung p_{first} , für p_3 und p_4 p_{second} und für p_5 und p_6 p_{third} verwendet. Bei beiden Datensätzen wurden jeweils dieselben Koordinaten für das C-Ar-1 des jeweiligen Dipeptids benutzt. Zur Bestimmung der Eintauchtiefe in Relation zur eingebrachten Ebene wurden folgende Formeln verwendet.

$$\text{Gleichung 2.1.7.3-1} \quad r_1 = p_{\text{second}} - p_{\text{first}}$$

$$\text{Gleichung 2.1.7.3-2} \quad r_2 = p_{\text{third}} - p_{\text{first}}$$

$$\text{Gleichung 2.1.7.3-3} \quad f = r_1 \times r_2$$

$$\text{Gleichung 2.1.7.3-4} \quad v = [p_E - p_{\text{first}}]^T f$$

$$\text{Gleichung 2.1.7.3-5} \quad d_i = \frac{v}{\|f\|}$$

wobei p_E die kartesischen Koordinaten des C-Ar-1-Atom des Dipeptids entspricht. Der Operator „ \times “ in Gleichung 2.1.7.3-3 steht für das Kreuzprodukt von Vektoren. Das hier gebildete Kreuzprodukt berechnet einen Vektor, der genau orthogonal zur aufgespannten Ebene steht. $\|\dots\|$ steht für einen Operator, der die euklidische Länge eines Vektors beschreibt. Die Trajektorien, die wie oben erwähnt alle 500 fs entnommen wurden, wurden mittels dieser Methode in eine Eintauchtiefe des Dipeptids umgerechnet. Bei der Eintauchtiefe, die für die Auswertungen verwendet wurde, handelt es sich um den Mittelwert der beiden berechneten Datensätze. Allerdings unterscheiden sich diese nur unwesentlich, sodass sich die Eintauchtiefen nur anhand eines verwendeten Datensatzes berechnen lassen können. Die Eintauchtiefen wurden zur Auswertung in Abhängigkeit der Simulationszeit aufgetragen, wobei der Nullpunkt der Eintauchtiefe der eingebrachten Ebene entspricht. Bei negativen Werten liegt dementsprechend das C-Ar-1-Atom unterhalb, bei positiven über dieser Ebene.

2.1.7.4. Ergebnisse und Diskussion der MD-Simulationen

In den beiden folgenden Abbildungen ist der Verlauf der Eintauchtiefe der beiden Enantiomere von Ala-Tyr und als Vergleich D-Ala-D-Phe in Abhängigkeit von Harnstoff dargestellt. Alle Dipeptide liegen dabei in protonierter, geladener Form vor.

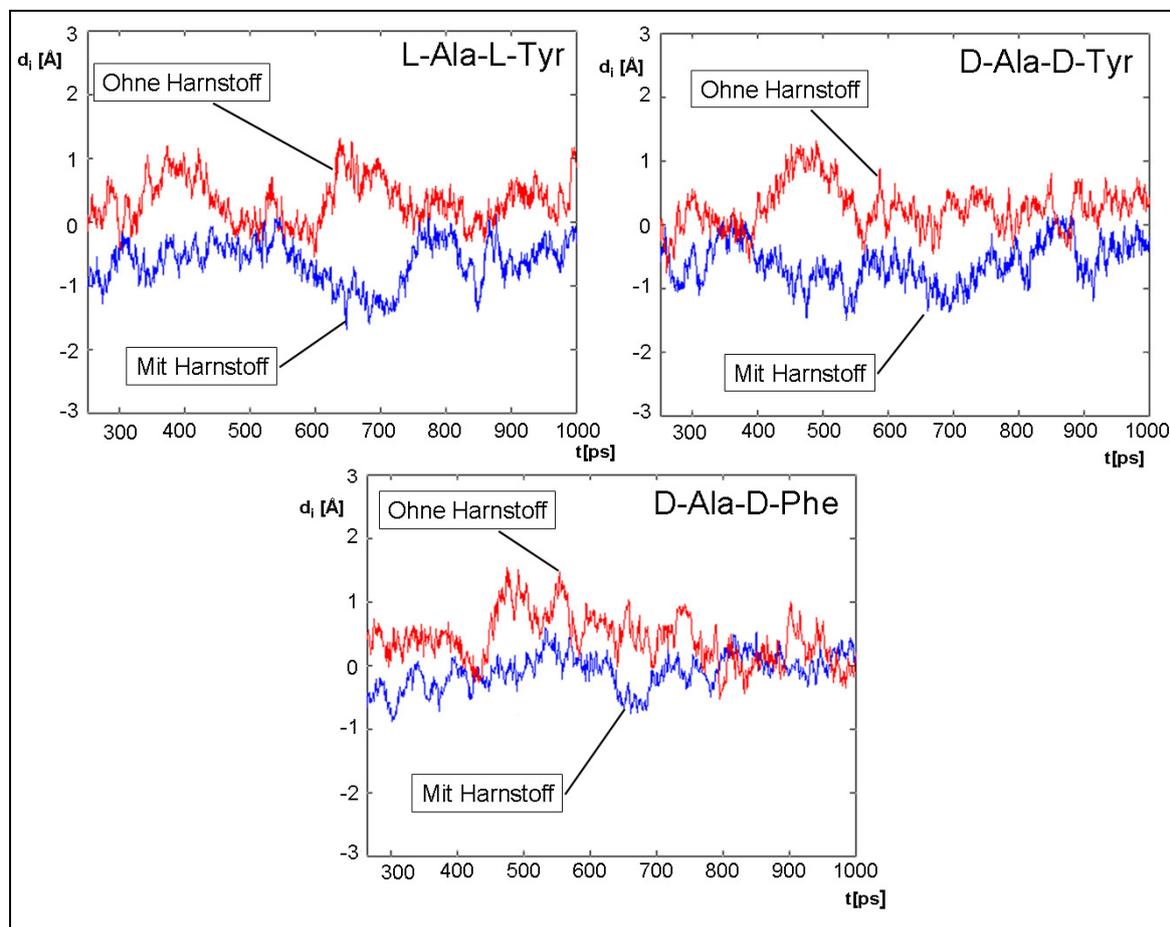


Abbildung 2.1.7.4-1: Eintauchtiefe d_i für C-Ar-1 von L-Ala-L-Tyr (oben links), D-Ala-D-Tyr (oben rechts) und D-Ala-D-Phe (unten) jeweils in Anwesenheit (blaue Linie) und Abwesenheit (rote Linie) von Harnstoff bei pH 2,5

Abbildung 2.1.7.4-1 zeigt deutlich die Unterschiede zwischen den Simulationen, die mit Harnstoff durchgeführt wurden und denen ohne Harnstoff. Mit Harnstoff befinden sich alle Dipeptide tiefer in der Kavität. Dies wird besonders bei den Enantiomeren von Ala-Tyr deutlich. Während sich das C-Ar-1-Atom in Anwesenheit von Harnstoff ca. 1 Å unter den C5'-Atomen befindet, ist es in dessen Abwesenheit ca. 0,5 Å über dieser gefitteten Ebene. Anders verhält es sich bei D-Ala-D-Phe. Hier scheint der Einfluss von Harnstoff bei der Komplexbildung keine so große Rolle zu spielen. Die

beiden Linien sind nur unwesentlich (v. a. gegen Ende der Simulation) voneinander unterschiedlich.

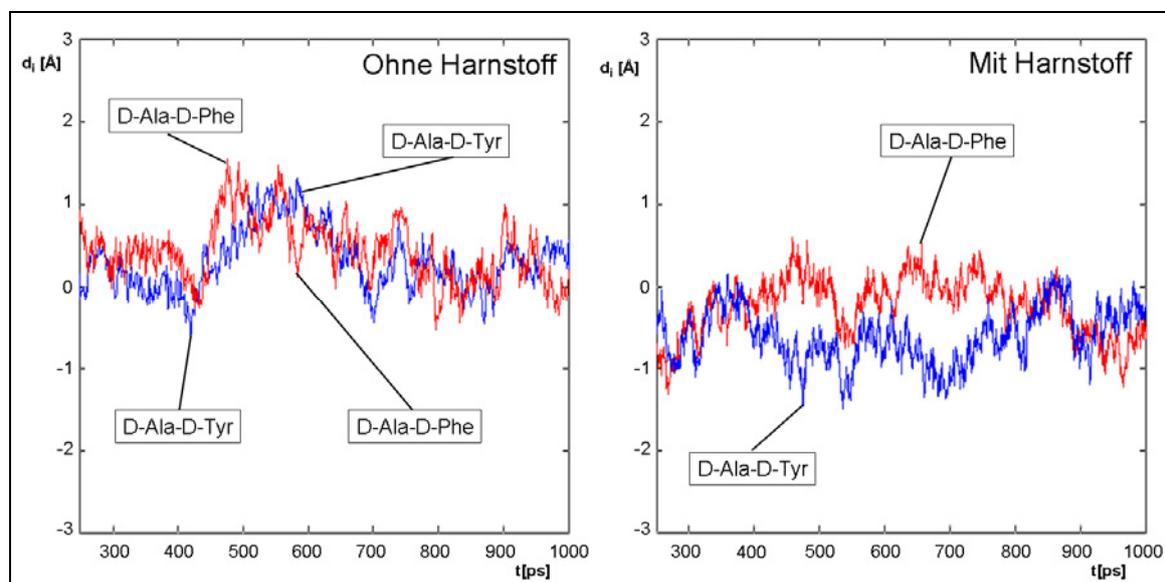


Abbildung 2.1.7.4-2: Vergleich der MD-Simulationen der Eintauchtiefe d_i von D-Ala-D-Tyr (blaue Linie) und D-Ala-D-Phe (rote Linie) in Abwesenheit (rechts) und Anwesenheit (links) von Harnstoff

Vergleicht man, wie in Abbildung 2.1.7.4-2 geschehen, die Eintauchtiefen der beiden Dipeptide untereinander, so zeigt sich, dass ohne Harnstoff die Positionen von Ala-Tyr und Ala-Phe nahezu identisch sind. Die Dipeptide scheinen genau gleich in der β -CD-Kavität zu liegen. Die Simulationen mit Harnstoff zeigten auch hier deutlichere Unterschiede. D-Ala-D-Tyr weist ein tieferes Eintauchen als das entsprechende Ala-Phe-Enantiomer auf. Der strukturelle Unterschied zwischen Ala-Phe und Ala-Tyr liegt in der phenolischen Hydroxylgruppe. Demnach kann angenommen werden, dass eine Interaktion zwischen Harnstoff und dem phenolischen Bereich verantwortlich für die oben gemachten Beobachtungen ist. Die Hydroxylgruppe vermag dabei als Wasserstoffbrückendonator und auch als -akzeptor zu fungieren und interagiert eventuell über eine Wasserstoffbrücke mit einem oder mehreren Harnstoffmolekülen. Eine mögliche Struktur ist in Abbildung 2.1.7.4-3 dargestellt, um diese Theorie zu veranschaulichen, wobei sicherlich mehrere andere Komplexe existieren können. Durch diese zusätzliche Bindung wird der Ala-Tyr-Komplex gegenüber demjenigen mit Ala-Phe möglicherweise tiefer in der Kavität stabilisiert.

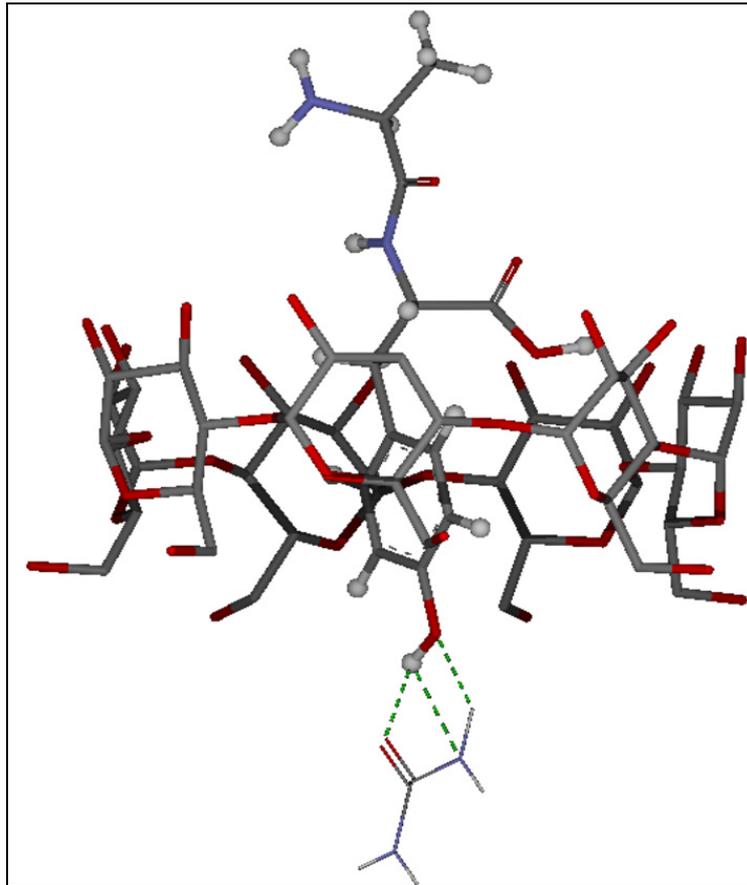


Abbildung 2.1.7.4-3: Möglicher Komplex zwischen β -CD, Ala-Tyr und einem Harnstoff-Molekül

Um einen besseren Einblick in die chirale Erkennung der Enantiomere zu erhalten, ist in Abbildung 2.1.7.4-4 der Vergleich der beiden Enantiomere von Ala-Tyr dargestellt.

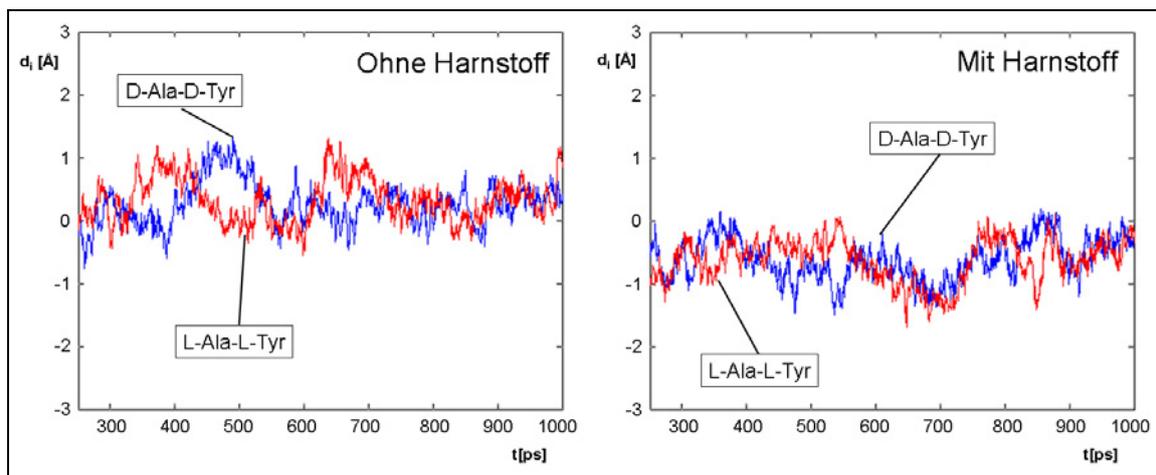


Abbildung 2.1.7.4-4: Vergleich der MD-simulierten Eintauchtiefe der beiden Enantiomere von Ala-Tyr in Anwesenheit und in Abwesenheit von Harnstoff

Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Eintauchtiefen d_i der Enantiomere. In diesem Fall konnten somit die bei den ROESY-Messungen gemachten Beobachtungen nicht bestätigt oder verifiziert werden.

2.1.8. Zusammenfassung und Ergebnis der Untersuchungen über den Einfluss von Harnstoff bei enantioselektiven Trennungen

Tabelle 2.1.8-1: Tabellarische Kurzzusammenfassung aller Ergebnisse

Methoden	CE	NMR	MD-Simulation
pH 2,5 Ala-Phe	Etwas bessere Auflösung durch den Einsatz von Harnstoff.	<ul style="list-style-type: none"> • CICS der β-CD- und Dipeptid-Protonen zeigen keine großen Unterschiede zwischen den Enantiomeren. • ROESY Messung ergibt eine etwas geringere Eintauchtiefe im Vergleich zu Ala-Tyr 	Kleine Unterschiede im Eintauchverhalten bei Zugabe von Harnstoff. Bei dessen Anwesenheit etwas tieferes Eintauchen.
pH 2,5 Ala-Tyr	Bei Abwesenheit von Harnstoff findet keine Trennung der Enantiomere mehr statt.	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr große Unterschiede zwischen den β-CD-CICS mit den Enantiomeren. Auch die CICS der Enantiomere zeigen auffällige Unterschiede. • ROESY zeigt ohne Harnstoff fast keine Differenzen. Mit Harnstoff ergibt sich ein unterschiedliches Integralmuster. 	Bei Anwesenheit von Harnstoff existieren große Unterschiede hinsichtlich der Eintauchtiefe. Harnstoff begünstigt ein tieferes Eintauchen in die Kavität. Die einzelnen Enantiomere zeigen keine großen Unterschiede.
pH 3,5 Ala-Phe	Harnstoff zeigt keinen großen Einfluss auf die enantioselektive Trennung.	<ul style="list-style-type: none"> • CICS der β-CD-Protonen zeigen fast keine Unterschiede. Etwas höhere CICS für die Puffer mit Harnstoff. • ROESY: n.v. 	n. v.
pH 3,5 Ala-Tyr	Harnstoff zeigt keinen großen Einfluss auf die enantioselektive Trennung.	<ul style="list-style-type: none"> • Kaum Unterschiede im CICS-Muster. • Kaum Unterschiede im ROESY-Muster. 	n. v.

n. v. = nicht vermessen

Alle genannten Untersuchungsmethoden zum Einfluss von Harnstoff auf elektrophoretische, enantioselektive Trennungen ergaben dasselbe Ergebnis: Harnstoff wird in der CE als Löslichkeitsverbesserer eingesetzt, beeinflusst aber auch stark den Komplex zwischen Dipeptid und β -CD, vor allem wenn sich ein Strukturelement am Liganden befindet, das Wasserstoffbrücken auszubilden vermag. Im speziellen Fall von Ala-Tyr konnte mit den gewählten Methoden die Struktur des Harnstoff/ β -CD/Dipeptidkomplex nicht ermittelt werden, der Aufbau von Wasserstoffbrücken scheint aber die wahrscheinlichste Erklärung für sämtliche Ergebnisse zu sein.

2.2. Relaxationsstudien von Fluorchinolonen mit *Micrococcus luteus*

2.2.1. Geschichte der Fluorchinolone

Die Chinolone gehören zu den wichtigsten antibakteriellen Arzneistoffen, die vor allem bei Harn- und Atemwegsinfektionen eingesetzt werden. Fluorchinolone werden zur Gruppe der Chemotherapeutika gezählt, da sie ausschließlich vollsynthetisch hergestellt werden und daher der Begriff „Antibiotika“ im eigentlichen Wortsinn nicht korrekt wäre. Die wichtigsten Vertreter leiten sich vom Grundkörper der 1,4-Dihydro-4-oxo-3-chinolincarbonsäure oder der 1,4-Dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridin-3-carbonsäure ab (siehe Abbildung 2.2.1-1).

Die erste Entdeckung der Chinolone begann 1962 als *Lesher et al.*^[74] die Nalidixinsäure als Nebenprodukt der Synthese des Antimalariamittels Chloroquin entdeckten.

Dies führte zu der Entwicklung einer Reihe von Chinolinderivaten. Dabei spielt die Veränderung der Chinolinstruktur durch Einführung von verschiedenen Substituenten an den Positionen N1, C6, C7 und C8 eine wichtige Rolle.^[75] Diese Modifikationen veränderten die antimikrobielle Aktivität, Pharmakokinetik und den Metabolismus der Chinolone. Beispielsweise bewirkte die Einführung einer Fluorgruppe in Position C6 eine erhöhte

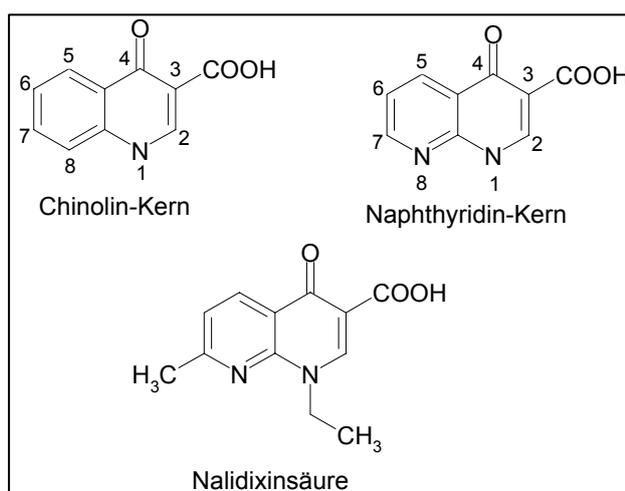


Abbildung 2.2.1-1: Struktur der Chinolin-Grundgerüste

Gyrase-Inhibierung, eine erhöhte Durchtrittsfähigkeit durch biologische Membranen und eine gesteigerte Aktivität gegenüber Staphylokokken. Ein zweites Fluoratom in Position C8 führte zu einer gesteigerten Absorption, einer deutlich gesteigerten antimikrobiellen Wirkung und einer längeren Halbwertszeit, birgt aber auch ein höheres Phototoxizitätsrisiko. Ein Piperazinring in C7 führte zu einer größeren Aktivität gegenüber Staphylokokken und Pseudomonaden. Eine Alkylierung dieses Piperazinringes verbesserte zusätzlich die Bioverfügbarkeit des Antiinfektivums. Ein weiterer

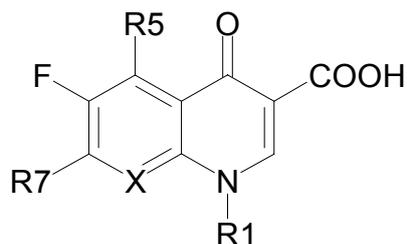
wichtiger Schritt war die Einführung eines Cyclopropyl-Rings in Position N1 (wie z. B. bei Ciprofloxacin), was zu einer erhöhten antimikrobiellen Aktivität gegenüber aeroben, gram-positiven und gram-negativen Keimen führte. Ein verbreitertes Wirkungsspektrum hin zu *Mycoplasmen* und *Chlamydien* zeigt sich bei Chlorierung oder Fluorierung von Position C8 eines Chinolons, das an N1 noch eine Cyclopropylgruppe trägt.^[76] Eine der neueren Veränderungen, die am Grundgerüst durchgeführt wurden, war die Einführung einer Methoxygruppe an Position C8. Diese Variation führte zu einem zusätzlichen Angriffspunkt, an den die Chinolone binden. Neben der Topoisomerase II (Gyrase) wird zugleich die Topoisomerase IV in einem erhöhten Maß inhibiert, was zu einer geringeren Resistenzbildung der Keime führte.^[77,78]

Man teilt die Chinolone in verschiedene Klassen ein, deren Übergang jedoch nicht immer klar definiert ist (siehe Tabelle 2.2.1-1). Diese Einteilung erfolgt aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität. Während die Gyrasehemmer der 1. Generation sehr wirksam gegenüber gram-negativen, aeroben Bakterien sind, zeigen sie gegenüber gram-positiven (aeroben und anaeroben) Bakterien nur eine sehr geringe Wirksamkeit. Mit der Synthese von Norfloxacin (2. Generation) 1980 ergab sich eine Verbreiterung des Wirkungsspektrums. Diese 2. Generation zeichnet sich durch eine wesentlich bessere antimikrobielle Aktivität gegenüber aeroben gram-positiven und eine leicht verbesserte Aktivität gegenüber gram-negativen Bakterien aus. Auch die gesamte Pharmakokinetik und vor allem die Bioverfügbarkeit dieser Gruppe sind wesentlich günstiger als die der 1. Generation. Nach der Synthese von Norfloxacin entwickelten sich rasant neue Analog-Präparate. Jedoch fehlte es dieser Gruppe weiterhin an der Wirksamkeit gegen viele anaerobe Keime. Diese Lücken gegenüber gram-positiven Bakterien und Anaerobia führten zur Entwicklung der 3. Generation, die diese Lücke schloss. Eine noch höhere Potenz gegen Anaerobia und v. a. Pneumokokken weisen schließlich die Vertreter der 4. Generation auf.

Tabelle 2.2.1-1: Einteilung der Chinolone an einigen Beispielen.

1. Generation	2. Generation	3. Generation	4. Generation
Nalidixinsäure	Norfloxacin	Sparfloxacin	Trovafoxacin
Cinoxacin	Ciprofloxacin	Gatifloxacin	Moxifloxacin
	Ofloxacin/Levofloxacin	Grepafloxacin	

Tabelle 2.2.1-2: Struktur einiger Chinolone (+ wegen zu hohem Nebenwirkungsrisiko in Europa vom Markt genommen; * weltweit vom Markt genommen; # Ruhen der Zulassung seit 1999)



Bezeichnung	X	R1	R5	R7
Norfloxacin	C-H	-C ₂ H ₅	-H	
Ciprofloxacin	C-H		-H	
Sparfloxacin ⁺	C-F		-NH ₂	
Gatifloxacin ⁺	C-O-CH ₃		-H	
Grepafloxacin*	C-H		-CH ₃	
Trovafoxacin [#]	N		-H	
Moxifloxacin	C-O-CH ₃		-H	

Die wichtigsten Indikationen von Chinolonen sind:

- **Untere Atemwegsinfektionen**

Hervorgerufen werden diese Infektionen meist durch Pneumokokken, *Haemophilus influenza* und *Streptococcus pneumoniae*. Bei leichteren Verlaufsformen können Ciprofloxacin bzw. Levofloxacin eingesetzt werden, bei denen aber in den letzten Jahren eine Abnahme der Empfindlichkeit festgestellt wurde. Bei auftretenden Resistenzen bzw. bei einer Infektion mit atypischen Erregern wird meist auf Moxifloxacin bzw. Gatifloxacin zurückgegriffen.

- **Harnwegsinfektionen**

Häufigster Erreger ist *Escherichia coli*. Hierbei können weiterhin Ciprofloxacin und Levofloxacin eingesetzt werden, jedoch bei strenger mikrobiologischer Überwachung, da auch bei *E. coli* Resistenzen auftreten können. Bei schwereren Verlaufsformen kann auch hier auf Gatifloxacin zurückgegriffen werden.

- **Gonorrhoe**

Als Mittel der Wahl werden gegen die Erreger (*Neisseria gonorrhoeae*) Ciprofloxacin oder Levofloxacin verabreicht. Bei Resistenzbildung müssen Cephalosporine der 3. Generation angewendet werden.

- **Bakterielle Durchfallerkrankungen**

Bei Enteritis durch Salmonellen, Campylobakter und *E. coli* kommen bei entsprechender Indikation Chinolone (meist Ciprofloxacin) zum Einsatz.

2.2.2. Die Gyrase und die Pharmakologie der Chinolone

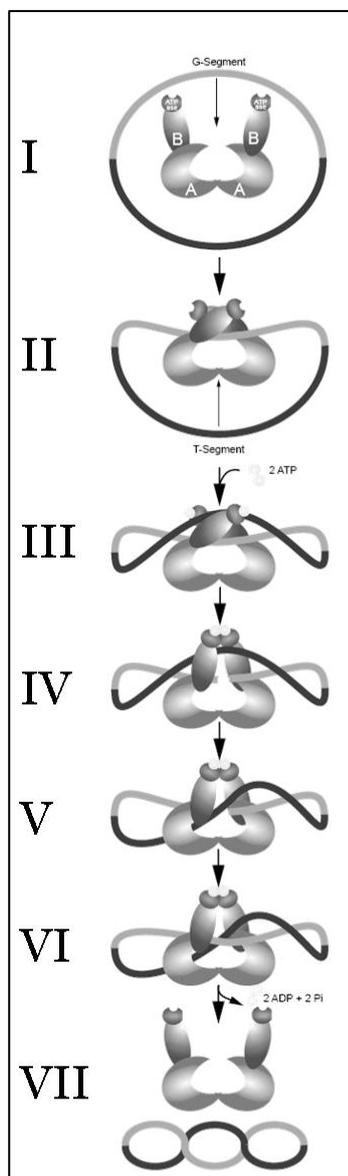


Abbildung 2.2.2-1:
Mechanismus der
Gyrase (aus Lit.^[82])

Chinolone sind Hemmstoffe der bakteriellen Typ II-Topoisomerase („Gyrase“). Die neueren Vertreter dieser Antibiotika-Klasse hemmen zusätzlich auch die Topoisomerase IV. Erste Hinweise, dass Chinolone auf die DNA-Synthese von *E. coli* einwirken, wurden bereits 1965 von *Cook et al.*^[79] publiziert. Das eigentliche Target, die DNA-Gyrase, wurde aber erst von der Gruppe *Gellert*^[80] und *Cozzarelli*^[81] identifiziert. Der Enzymtyp der Topoisomerasen ist nicht auf Prokaryonten beschränkt, sondern er kommt auch in höheren Organismen vor. Die Topoisomerase II ist zusammen mit ihrem funktionellen Gegenspieler Topoisomerase I für die räumliche Anordnung der bakteriellen, ringförmigen DNA-Stränge verantwortlich. Dabei sorgt die Gyrase energieabhängig für eine Überspiralisierung des DNA-Rings durch folgenden Mechanismus (siehe Abbildung 2.2.2-1):^[82] die Gyrase besteht aus 2 Untereinheiten GyrA und GyrB, wobei der gesamte Enzymkomplex in der Form A₂B₂ vorliegt (I). In einem ersten Schritt wird ein ca. 128 Basenpaare großes DNA-Segment schlaufenförmig um das Tetramer gewickelt und gebunden (G-Segment des DNA-Strangs) (II). Innerhalb dieses Segments kommt es dann zu einem Schnitt des Doppelstrangs (IV), dessen freie 5'-Phosphatgruppen über eine Diesterbindung an Tyrosinreste jeder A-Untereinheit kovalent gebunden werden. Dieser so gebildete Komplex ermöglicht es einem weiteren Fragment des DNA-Stranges durch die Bruchstelle geschoben zu werden (V). Am Ende des Reaktionszyklus schließt sich die Bruchstelle des Doppelstranges wieder (VI), sodass letztendlich eine Superhelix entsteht (VII). Die dafür benötigte Energie stammt aus 2 ATP-Molekülen, die an den B-Segmenten der Gyrase binden. Die B-Untereinheit ist somit für die Hydrolyse des ATP in ADP

verantwortlich und folglich für die Energiebereitstellung für den Strangbruch und Wiederausammenführung der DNA.

Chinolone sind in der Lage den Gyrase-DNA-Komplex zu stabilisieren.^[83] Für diese Reaktion ist die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen notwendig. Der genaue Mechanismus ist immer noch unbekannt, wobei vermutet wird, dass der Reaktionsschritt, bei dem das Enzym kovalent mit der DNA verknüpft ist, stabilisiert wird. Dadurch kommen Polymerisationsmechanismen entlang der DNA rasch zum Erliegen, was eine SOS-Antwort der Bakterienzelle nach sich zieht, die dauerhaft anhält und damit meist im Zelltod endet.

Hoshino et al. entdeckten 1994^[84] mit der Topoisomerase IV (TopoIV) eine zweite Zielstruktur der Chinolone, die aus homologen Untereinheiten zu GyrA (ParC) und GyrB (ParE) besteht. Diese Topoisomerase trennt durch einen Doppelstrangbruch ebenfalls die replizierten Tochterchromosomen (Decatenierung). Punktmutationen in den kodierenden Genen von TopoIV und II können auch eine Rolle bei der Ausbildung hochresistenter Keime spielen. Generell können Resistenzen gegen Chinolone durch folgende Mechanismen auftreten:

- Punktmutationen in der QRDR-Region (quinolone resistance-determining region) des *gyrA*-Gens oder *gyrB*-Gens von TopoII. Weiterhin existieren andere hochresistente Keime, die auch Punktmutationen im entsprechenden Bereich der TopoIV zeigen können.
- Reduktion der OmpF (outer membrane protein F)-Porinen. Diesen Transportkanälen kommt eine entscheidende Rolle beim Eintritt von Chinolonen in die Bakterienzelle zu. Es existieren Chinolon-resistente Mutanten, die keine Mutationen der Gyrase zeigen, jedoch eine erheblich reduzierte Anzahl dieser Porine in der Membran. Diesen Stämmen fehlt es entweder an dem OmpF-kodierenden Gen oder es existiert ein sekundäres Gen, das die Expression der Porine herunterreguliert.^[85] Damit kann nur eine geringere Konzentration an Antibiotikum in der Zelle akkumulieren.
- Des Weiteren existieren Efflux-Pumpen, die die Chinolone aktiv wieder aus der Zelle transportieren.

Da sich die Zielstruktur der Gyrasehemmer intrazellulär befindet, müssen diese die innere und äußere Membran der bakteriellen Zellwand überwinden. Dabei existieren zwei Mechanismen, die den Eintritt ermöglichen.^[86] Hydrophobe Chinolone, wie etwa

Nalidixinsäure, Oxolinsäure oder Piromidsäure vermögen die Lipidschicht der Bakterienzelle via Diffusion passiv zu penetrieren. Als Mechanismus wird die Chelatisierung von zweiwertigen Kationen der äußeren Membran, wie etwa von Mg^{2+} durch die Chinolone postuliert. Durch diesen Verlust an Kationen kommt es zu einer Störung der Lipopolysaccharidschicht. Hydrophile Substanzen (Ofloxacin, Ciprofloxacin) werden hingegen über oben genannte Porine (ompF) transportiert.^[87,88,89] Diese stellen wassergefüllte Kanäle in der äußeren Membran dar, über die diese Stoffgruppe mittels Diffusion in die Zelle eindringen kann.

2.2.2.1. Pharmakologie der verwendeten Gyrasehemmer

Fleroxacin kam 1995 unter dem Handelsnamen QUINODIS[®] auf den Markt. Es kann in die Gruppe II der Fluorchinolone eingeordnet werden und ist im Wirkungsspektrum mit Ciprofloxacin vergleichbar. Schon durch früher durchgeführte Doppelblindstudien stellte sich heraus, dass Fleroxacin gegenüber anderen Fluorchinolonen ein gesteigertes Nebenwirkungsspektrum aufweist, das sehr stark dosisabhängig ist.^[90] So traten bei 10% der Patienten gastrointestinale Beschwerden, bei 9% ZNS-Störungen (v.a. starke Schlaflosigkeit) und bei 3% Hautreaktionen auf. Da Fleroxacin keinen dokumentierten Vorteil gegenüber anderen Gyrasehemmern erkennen ließ und aufgrund des oben beschriebenen, gesteigerten Nebenwirkungsspektrums, wurde es 2003 in Deutschland wieder vom Markt genommen. Für die vorliegenden NMR-Untersuchungsmethoden eignete sich jedoch Fleroxacin aufgrund seiner drei Fluoratome, da ¹⁹F-NMR-Messungen einen unmittelbaren Einblick in die Beteiligung der N1-Fluorethyl-Gruppe an der Bindung gewährleisteten.

Ofloxacin wurde erstmals 1982 unter der Bezeichnung DL-8280^[91] mikrobiologisch getestet. Auch Ofloxacin gehört zur Gruppe II der Gyrasehemmstoffe. Es gelangte 1985 unter dem Handelsnamen TARIVID[®] auf den Markt. Es handelt sich dabei um das Racemat von S(-)- und R(+)-Ofloxacin, wobei die linksdrehende S-Form 8- bis 128-fach stärker wirksam ist als die rechtsdrehende R-Form. Mit dem reinen S-Enantiomer ist inzwischen auch die wirksamere Form als Levofloxacin auf dem Markt.

Moxifloxacin gehört zur Gruppe IV der Gyrasehemmer mit einem erweiterten Wirkungsspektrum gegen gram-positive Keime und Anaerobia. Es gelangte 1999 als AVALOX[®] auf den Markt und ist oral bei respiratorischen Infekten anwendbar. Auf-

grund seiner langen Halbwertszeit von ca. 12 h reicht eine einmalige Gabe von 400 mg am Tag aus.

2.2.3. Angewendete NMR-Screening-Techniken

Um den Effekt von Antibiotika an Bakterienzellen detektieren und beobachten zu können, wurden mehrere spektroskopische Methoden erarbeitet und veröffentlicht.^[92,93,94] Auch die NMR-Spektroskopie ist in der Lage, die Bindung von Liganden an Makromoleküle unter bestimmten Voraussetzungen zu untersuchen.^[95,96,97] Wie in Kapitel 1.2.5 erwähnt, existieren mehrere NMR-Screening-Techniken, die es ermöglichen, Bindungskonstanten bzw. die Stärke der Bindung zu ermitteln bzw. abzuschätzen. NMR-Bindungsstudien können zur Beurteilung kleiner Liganden durch die Beobachtung der Veränderung eines NMR-Parameters genutzt werden, die durch die Interaktion mit einem Makromolekül zustande kommt. Dabei kann der Fokus auf den Ligand oder auf das Makromolekül gelegt werden, wobei die Beobachtung des Liganden mehrere Parameter zulässt. Um Interaktionsprozesse zwischen den Gyrasehemmern und der Bakterienzelle zu detektieren, wurden als Parameter sowohl nicht-selektive und selektive Spin-Gitter-Relaxationszeiten als auch Spin-Spin-Relaxationszeiten gewählt, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

2.2.3.1. Spin-Gitter-Relaxation (T_1)

Die Messung der Spin-Gitter-Relaxation eines Systems im freien und gebundenen Zustand ist eine der meist verwendeten Techniken, um Protein-Ligand-Interaktionen zu bestimmen.^[98,99,100,101]

Dabei ist die beobachtete Relaxationsrate $R_{1,obs}$ einer Resonanz eines kleinen Moleküls, das mit einem Makromolekül interagiert, gegeben durch^[102]

$$\text{Gleichung 2.2.3.1-1} \quad R_{1,obs} = f \cdot R_{1,G} + (1 - f) \cdot R_{1,F}$$

Hier ist f der Anteil des gebundenen Liganden und $R_{1,G}$ bzw. $R_{1,F}$ die longitudinalen Relaxationsraten im gebundenen bzw. freien Zustand.

Grundsätzlich können Relaxationsmessungen auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden. Entweder werden alle Signale des Spektrums gleichzeitig angeregt (nichtselektive Relaxationsrate, $R_{1,ns}$), oder man invertiert gezielt das Signal eines

einzelnen Protons (selektive Relaxationsrate, $R_{1,s}$). Beide Relaxationsraten für ein Proton i entsprechen einer Summe von Proton-Dipol-Interaktionen.

$$\text{Gleichung 2.2.3.1-2} \quad R_{1,ns}^i = \sum_{j \neq i} \rho_{ij} + \sum_{j \neq i} \sigma_{ij} + \rho_i^*$$

$$\text{Gleichung 2.2.3.1-3} \quad R_{1,s}^i = \sum_{j \neq i} \rho_{ij} + \rho_i^*$$

Hierbei sind ρ_{ij} und σ_{ij} die Selbst- und Kreuzrelaxationsraten der H_i - H_j Dipol-Dipol-Interaktion. ρ_i^* stellt den Beitrag aller anderen beteiligter Relaxationsmechanismen dar. Gleichung 2.2.3.1-2 und Gleichung 2.2.3.1-3 können als Ausdruck der spektralen Dichte folgendermaßen beschrieben werden:

$$\text{Gleichung 2.2.3.1-4} \quad R_{1,ns}^i = \sum_{j \neq i} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r_{ij}^6} \left\{ \frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{12\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} \right\}$$

$$\text{Gleichung 2.2.3.1-5} \quad R_{1,s}^i = \sum_{j \neq i} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r_{ij}^6} \left\{ \frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} + \tau_c \right\}$$

Hierbei ist \hbar das mit 2π gekürzte Planck'sche Wirkungsquantum, γ das gyromagnetische Verhältnis von Wasserstoff, ω_H die Larmorfrequenz von Protonen, τ_c die Korrelationszeit und r_{ij} die Distanz zwischen Proton i und Proton j .

Trägt man $R_{1,s}$ und $R_{1,ns}$ als Funktion der Korrelationszeit auf, ergibt sich das Diagramm von Abbildung 2.2.3.1-1. Wenn ein kleines Molekül (z. B. der Ligand) an ein Makromolekül bindet, das eine langsame Umorientierung (Beweglichkeit) besitzt ($\omega_H \tau_c \gg 1$), kommt es zu einem starken Anstieg von $R_{1,s}$. Dies bedeutet, dass selektive Relaxationsmessungen genutzt werden können, um die Bindung detektieren zu können. Betrachtet man Gleichung 2.2.3.1-4 und die Kurve $R_{1,ns}$ in Abbildung 2.2.3.1-1, so ist zu sehen, dass nicht-selektive Messungen nicht als Screening-Technik verwendet werden können, da hier die direkte Abhängigkeit zu τ_c fehlt.

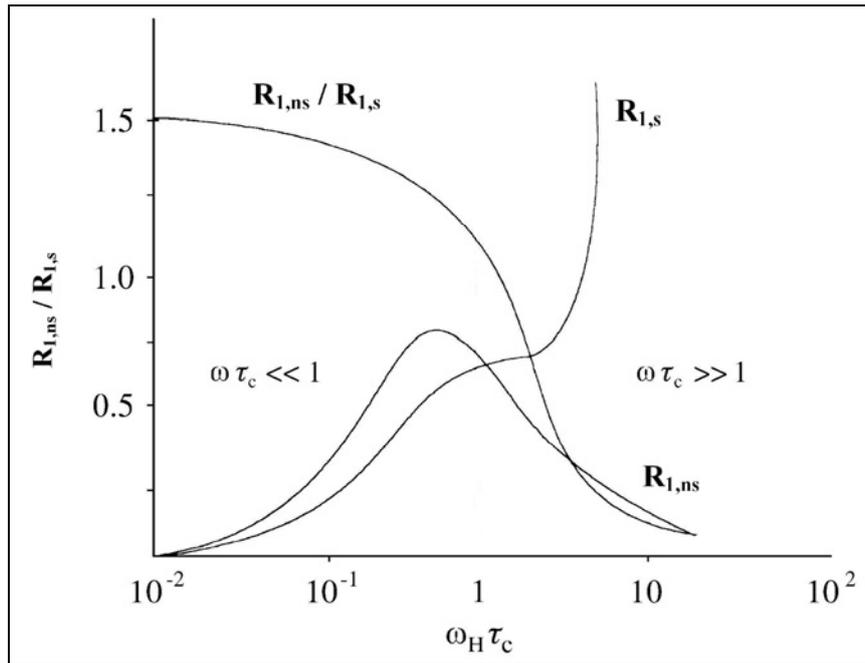


Abbildung 2.2.3.1-1: Diagramm von $R_{1,ns}$ und $R_{1,s}$ und das Verhältnis dieser beiden Parameter als Funktion von $\omega_H \tau_c$. (Hier am Beispiel von Glycyl-L-Tyrosin gebunden an Carboxypeptidase A nach Lit.^[102])

Mittels selektiven Relaxationsmessungen lassen sich wertvolle Informationen über die Bindung an das Makromolekül erhalten. Für den Fall, dass die Gesamtligandkonzentration größer als die des Makromoleküls ist und dass der Ligand sich im Zustand eines schnellen Austauschs zwischen freier und gebundener Form befindet, lässt sich über eine Variante der Lineweaver-Burk-Auftragung die Dissoziationskonstante des Liganden ermitteln. Hierbei gilt:

$$\text{Gleichung 2.2.3.1-6} \quad \Delta R_{1,s} = \frac{K \cdot R_{1,G}}{1 + K[M]} \cdot [L_{tot}]$$

wobei $\Delta R_1 = R_{1,s} - R_{1,F}$, K die Gleichgewichtskonstante, $[L_{tot}]$ die Gesamtkonzentration an Ligand, $[M]$ die Konzentration an Makromolekül und $R_{1,G}$ die Relaxationsrate im gebundenen Zustand ist.

Um die Dissoziationskonstante bzw. Gleichgewichtskonstante der Bindung zu ermitteln, wird $1/\Delta R_{1,s}$ gegen die Gesamtkonzentration an Ligand $[L_{tot}]$ aufgetragen und extrapoliert. Am y-Achsenabschnitt ($1/\Delta R_{1,s} = 0$) gilt: $[L_{tot}] = -1/K = -K_D$ (siehe Abbildung 2.2.3.1-2).

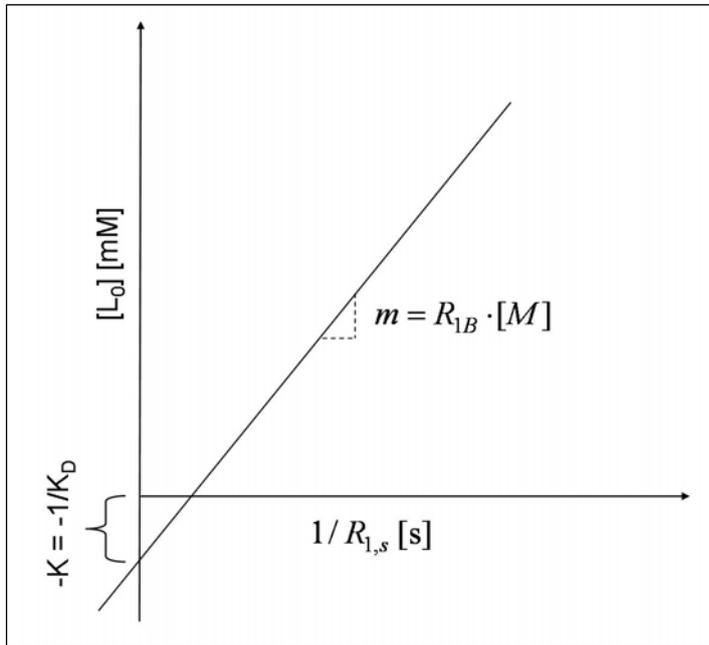


Abbildung 2.2.3.1-2: Schematische Darstellung der verwendeten Variante der Lineweaver-Burk-Auftragung

Es gibt zwei unterschiedliche NMR-spektroskopische Untersuchungsmethoden mit denen man die longitudinale Relaxationszeit bestimmen kann: das „Inversion-Recovery“-Verfahren und das „Saturation-Recovery“-Verfahren. Das letztgenannte Verfahren stellt zwar die schnellere Methode dar, ist im Hinblick

auf die Ergebnisse jedoch ungenauer als das „Inversion-Recovery“-Verfahren und wurde daher bei den vorliegenden Messungen nicht verwendet.

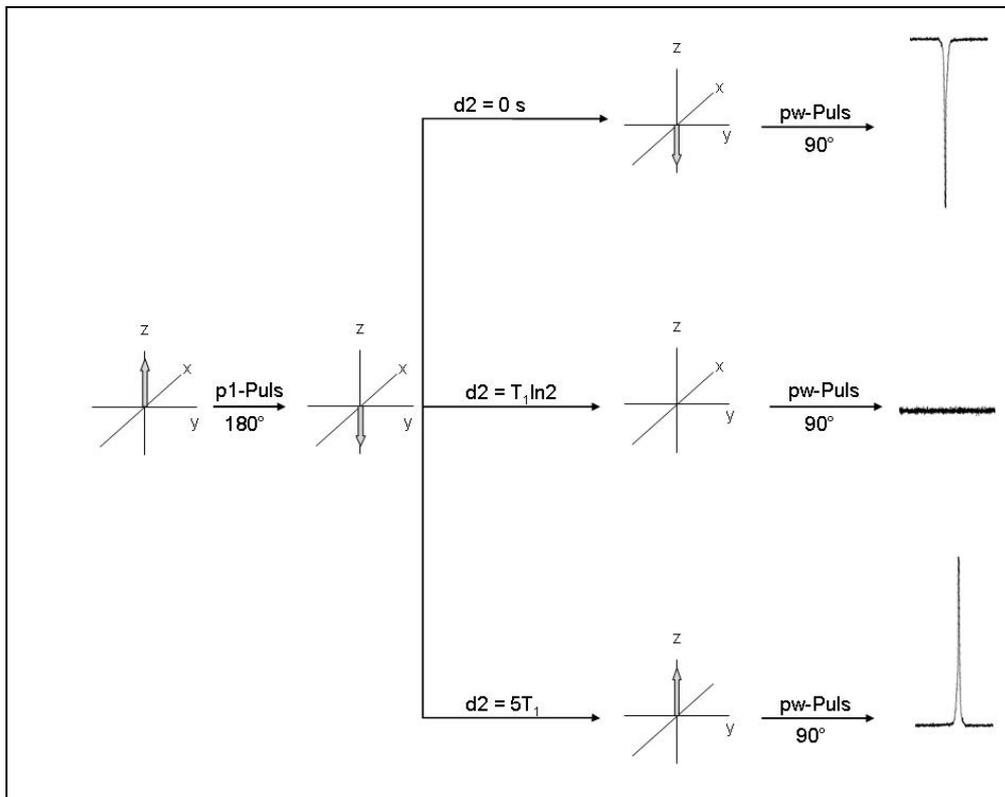


Abbildung 2.2.3.1-3: Schematische Darstellung der „Inversion-Recovery-Methode“ und der daraus resultierenden Peakhöhe

Der Ablauf einer „Inversion-Recovery“-Pulssequenz ist in Abbildung 2.2.3.1-3 dargestellt. Im Verlauf dieser Messung wird die Gleichgewichtsmagnetisierung durch einen 180° -Puls in die $-z$ -Lage ausgelenkt. Nach diesem Puls folgt eine variable Wartezeit d_2 , während der das Signal wieder in z -Richtung relaxieren kann. Diese verbleibende z -Magnetisierung wird durch einen 90° -Puls in eine detektierbare Quermagnetisierung in y -Lage gebracht und aufgenommen, d. h. das Signal wechselt von maximal negativer Intensität bei $d_2 = 0$ Sekunden nach maximal positiver Intensität bei lang gewähltem d_2 ($\sim 5T_1$).

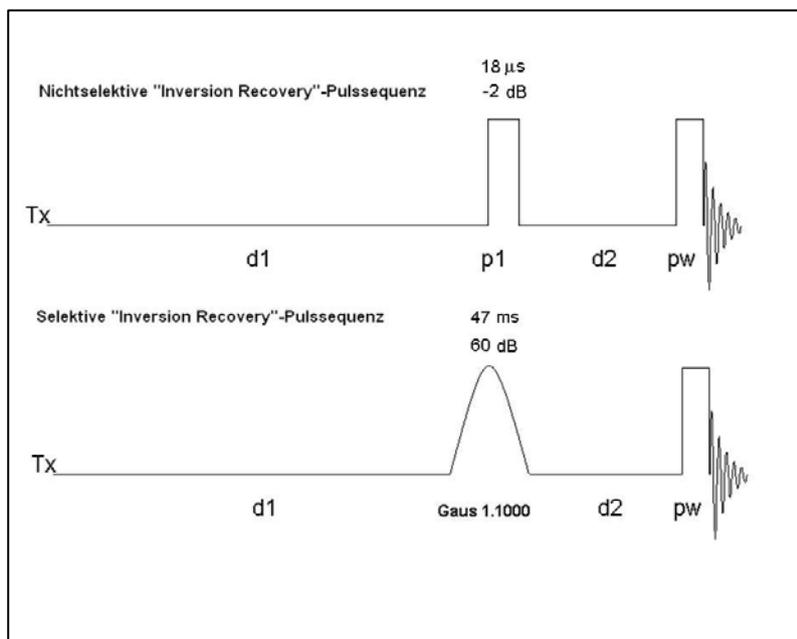


Abbildung 2.2.3.1-4: Pulssequenzen für die nichtselektive und selektive T_1 -Messung mittels „Inversion Recovery“

Die Pulssequenz ist nochmals ausführlich in der Abbildung 2.2.3.1-4 dargestellt. Um ein selektives Pulsexperiment zu erreichen, wird der nichtselektive 180° -Hartpuls durch einen „weicheren“ Puls ersetzt. Selektiv wird ein Puls dann, wenn man seine Leistung reduziert. Der Kehrwert der verwendeten Pulslänge entspricht dabei ungefähr

seiner Anregungsbreite. Für die selektiven Relaxationsmessungen wurde ein Gauß 1.1000-Softpuls verwendet (siehe Abbildung 2.2.3.1-4), der in den vorliegenden Experimenten eine Länge von 47,0 ms und eine Leistung von ca. 60 dB aufwies. Mit diesen Parametern erhält man eine Anregungsbreite von ca. 45 Hz, die eine Resonanz sehr genau einschließt.

Da der eingesetzte gaußförmige Puls bei der „Inversion Recovery“-Messung möglichst exakt 180° aufweisen sollte, wurde vor jeder Versuchsreihe die hierfür nötige Bestimmung der Leistung dieses Pulses mittels des Bruker-AU-Programms „paropt“ vorgenommen. Für die Bestimmung der Relaxationszeit wurden jeweils 10 Experi-

mente mit unterschiedlichen d2-Zeiten zwischen 0,01 und 10 s durchgeführt. In Abbildung 2.2.3.1-5 ist auch der Effekt des selektiven 180°-Pulses sehr gut ersichtlich. Während die nichtselektive Messung alle Peaks durch den 180°-Hartpuls invertiert, wird im selektiven Beispiel rechts nur eine einzelne Frequenz angeregt.

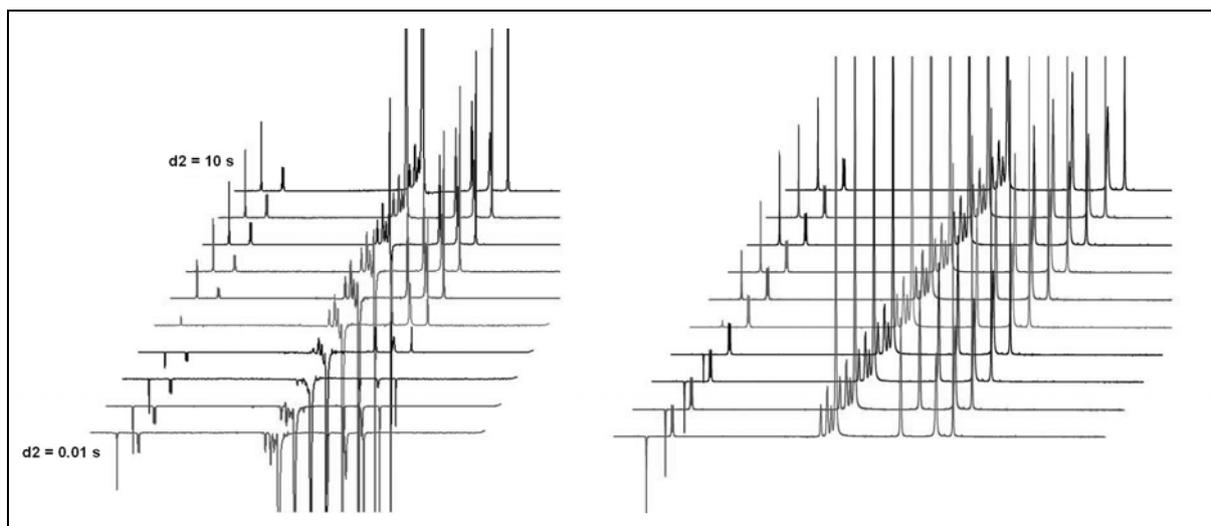


Abbildung 2.2.3.1-5: Vergleichende Darstellung eines nichtselektiven „Inversion Recovery“-Experiments (links) und eines selektiven „Inversion Recovery“-Experiments (rechts) von Fleroxacin

Die Auswertung der Messungen kann entweder über die Peakintensität oder über die Peakfläche erfolgen. Der Zusammenhang zwischen Intensität (oder Fläche) und der Relaxationszeit T_1 ist wie folgt gegeben:

Gleichung 2.2.3.1-7

$$I(t) = I_0 + B \cdot e^{\frac{-t}{T_1}}$$

wobei $I(t)$ die Intensität zu einem Zeitpunkt t , I_0 die maximale Intensität und t die Zeitdauer d_2 darstellt.

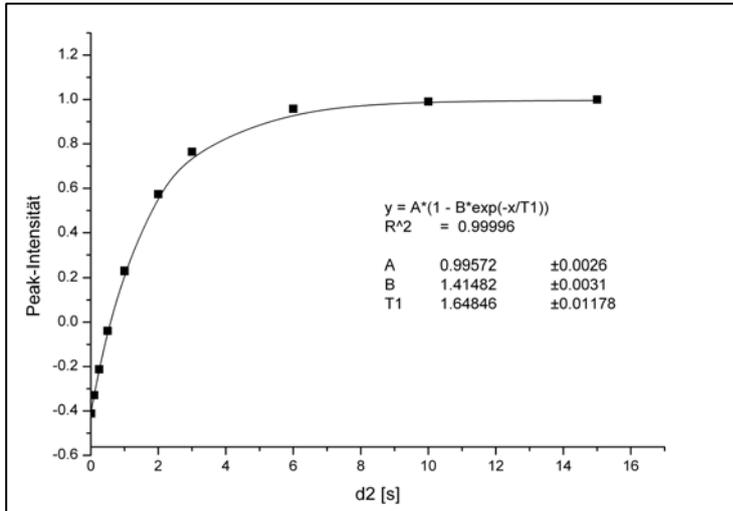


Abbildung 2.2.3.1-6: Anpassung einer T_1 -Zeit-Messung von 10 mM Fleroxacin in D_2O -PBS-Puffer

Der Faktor B beträgt eigentlich 2, da bei $t=0$ $I(t)=-I_0$ gelten sollte. Aufgrund von nicht ganz exakten 180° -Pulsen weicht dieser Wert aber immer etwas ab und wird daher als Konstante mit ausgefittet (siehe Abbildung 2.2.3.1-6). Die somit erhaltenen T_1 -Werte wurden mit dem oben beschriebenen Line-weaver-Burk-Plot ausgewertet.

2.2.3.2. Spin-Spin-Relaxationsrate (T_2)

Für die beobachtete transverse Relaxationsrate $R_{2,obs}$ gilt bei der Bindung eines Liganden an ein Makromolekül folgende Beziehung:

$$\text{Gleichung 2.2.3.2-1} \quad R_{2,obs} = f \cdot R_{2,G} + (1-f) \cdot R_{2,F} \cdot (1-f)^2 \frac{4\pi^2(\delta_F - \delta_G)}{K_{-1}}$$

hierbei stellt $R_{2,G}$ und $R_{2,F}$ die transversen Relaxationsraten im gebundenen und freien Zustand und f der Anteil des gebundenen Liganden dar. δ_G und δ_F entsprechen den chemischen Verschiebungen für die beobachtete Resonanz im gebundenen und freien Zustand und K_{-1} der Verweildauer des Liganden am Makromolekül. Im Status des schnellen Wechsels zwischen gebundener und freier Form, kann der letzte Teil des Terms vernachlässigt werden, da er gegen null tendiert. Auch hier kann wieder die Summe der Relaxationsraten als Term der spektralen Dichte angegeben werden.

$$\text{Gleichung 2.2.3.2-2} \quad R_2^i = \sum_{j \neq i} \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10r_{ij}^6} \left\{ \frac{15\tau_c}{2(1 + \omega_H^2 \tau_c^2)} + \frac{3\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{9}{2} \tau_c \right\}$$

Wie im Falle von $R_{1,s}$ in Gleichung 2.2.3.1-5 zeigt sich für R_2 eine direkte Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ_c . Folglich lässt sich auch die Messung der transversalen Relaxationsrate als Screening-Technik verwenden. Da die Spin-Spin-Relaxation sehr eng mit der Linienbreite eines Signals korreliert, lässt auch die Bestimmung der

Halbwertsbreite einer Resonanz die Untersuchung einer Bindung zwischen Ligand und Makromolekül zu. Dabei entspricht die ermittelte Halbwertsbreite (HLW) ungefähr R_2/π .

Gemessen wird die transversale Relaxationszeit mit der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Pulssequenz (CPMG).^[103] Dabei wird in einem ersten Schritt die Magnetisierung der Probe durch einen 90° -Puls in die xy -Ebene ausgelenkt (siehe Abbildung 2.2.3.2-1). Wegen Inhomogenitäten des Magnetfeldes kommt es zu einer Dephasierung des Systems innerhalb einer Wartezeit τ . Nach dieser Wartezeit „spiegelt“ ein 180°_x -Puls die Vektoren entlang der x -Achse. Dadurch werden die betrachteten Vektoren nach τ wieder rephasiert. Dieser Vorgang kann beliebig fortgesetzt werden, wobei vor der Messung die Anzahl dieser „Loops“ festgelegt wird.

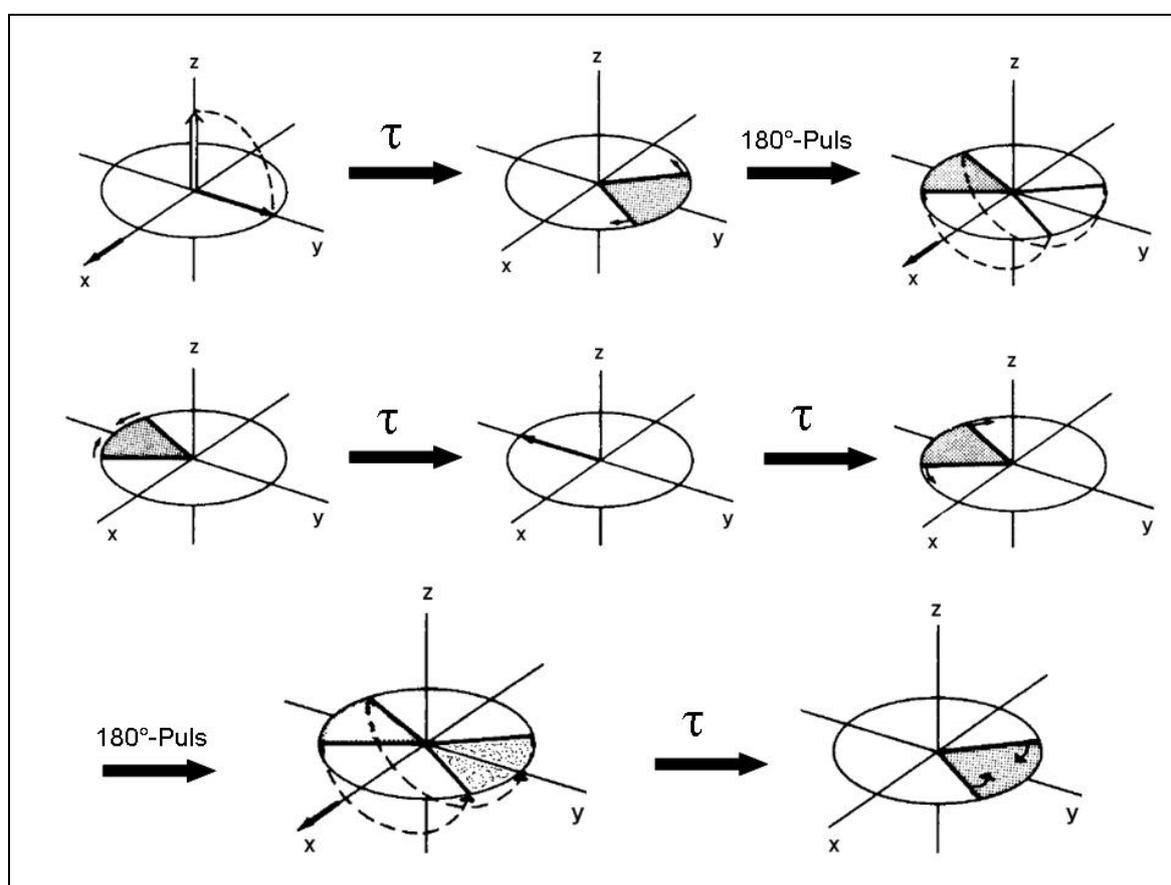


Abbildung 2.2.3.2-1: Schematische Darstellung der Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz

Nach 2τ , 4τ , 8τ , usw. kann jeweils ein Echo gemessen werden, das nicht mehr dieselbe Anfangsintensität aufweist, sondern exponentiell abfällt. Dieser Abfall des FID ist in der transversalen Relaxation begründet. Der Einfluss des äußeren Magnetfeldes wird mittels dieses Echo-Experimentes ausgemittelt.

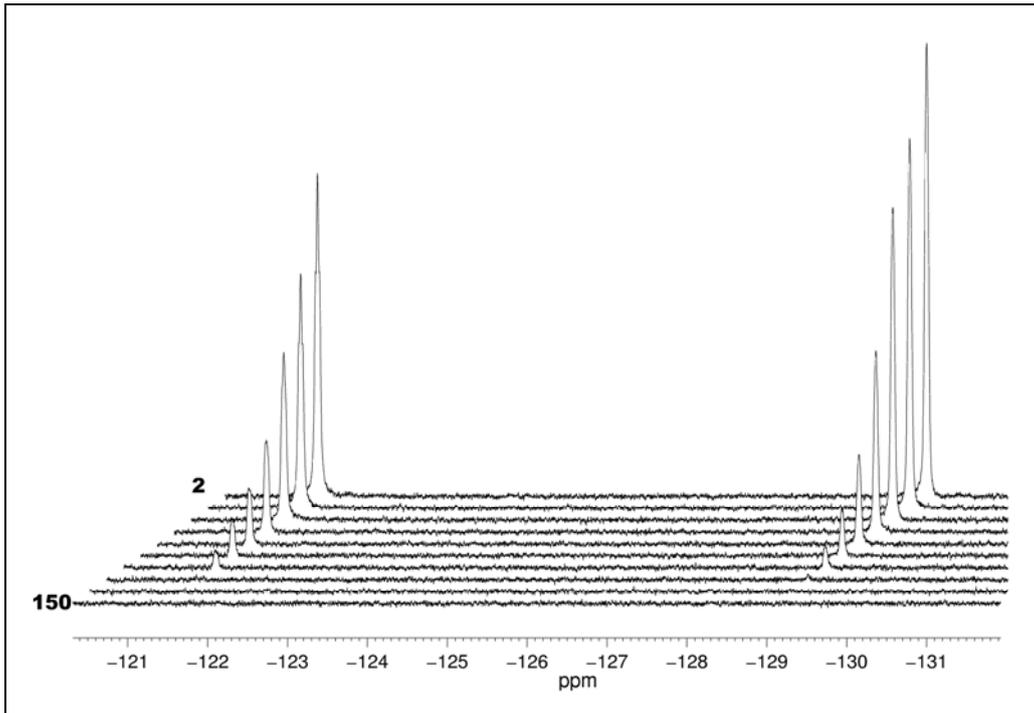


Abbildung 2.2.3.2-2: Ausschnitt des ^{19}F -Spektrums von Fleroxacin während einer CPMG-Pulssequenz bei Änderung der Loop-Anzahl (2, 4, 6, 12, 18, 24, 32, 58, 100, 150 Loops)

In Abbildung 2.2.3.2-2 sieht man den Einfluss der unterschiedlichen Anzahl an

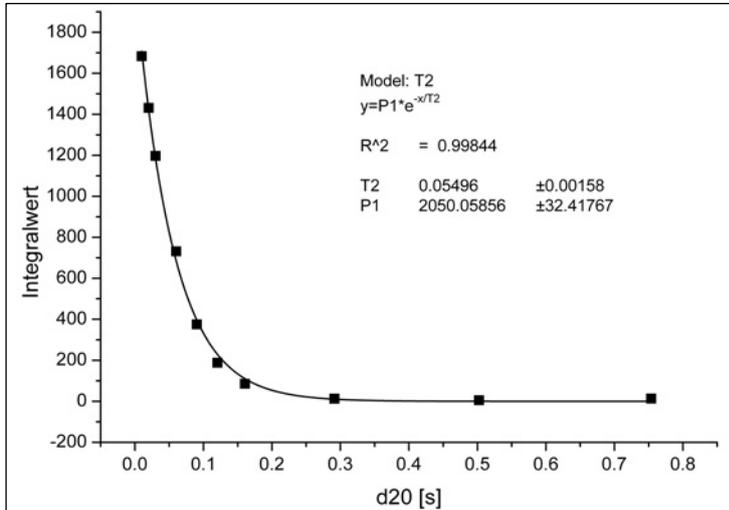


Abbildung 2.2.3.2-3: Fittingkurve einer T_2 -Bestimmung.

Loops, die durch die transversale Relaxationszeit bedingte Abnahme des FID und damit auch die verbundene Abnahme der Signalintensität. Ähnlich wie bei der T_1 -Bestimmung folgt auch diese Abnahme einer Exponentialfunktion (siehe Gleichung 2.2.3.2-3), die angepasst werden kann. Die verwendete Exponentialfunktion

beinhaltet die Anfangsintensität I_0 und die Länge t der einzelnen Loops.

Gleichung 2.2.3.2-3

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{T_2}}$$

2.2.4. Zielsetzung

Ziel dieser Versuchsreihe war es, mittels Relaxationsmessungen einen tieferen Einblick in das Bindungsverhalten diverser Gyrasehemmer an eine Bakterienzelle zu erhalten. Wie in Kapitel 2.2.2 erwähnt, muss das Pharmakon in bestimmter Art und Weise Kontakt zur Bakterienzelle aufnehmen, um in die Zelle zu gelangen, oder durch Bindung an das Zielenzym eine Wirkung hervorzurufen. Diese Bindungen ziehen eine Änderung der Relaxationszeiten nach sich, die ausgewertet werden können, um so Stärke oder Natur dieser Bindung zu bestimmen.

2.2.5. Durchführung und Ergebnisse der Spin-Gitter-Relaxationsmessungen von Gyrasehemmern an *Micrococcus luteus*

2.2.5.1. Beschreibung des Testsystems

Für die Messung der Relaxationszeiten wurde der apathogene Bakterienstamm *Micrococcus luteus* verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch seine einfache Handhabung in der Kultivierung aus, bedingt durch seine hohe Toleranz gegenüber Trockenheit und hohen Salzkonzentrationen. *Micrococcus luteus* ist ein gram-positives, kugelförmiges Bakterium, welches, je nach Umweltbedingung, verschieden große traubenförmige Agglomerate aufweist. In Reinkultur bildet es gelbe, kreisförmige Kolonien. Das Vorkommen dieses aeroben Keims beläuft sich auf Boden, Luft, Wasser und der menschlichen Hautflora.

Für jede Relaxationsmessung mit der Zellsuspension wurden 50,0 mg Zellmaterial direkt von der Kulturplatte entnommen und nach mehreren Waschvorgängen (siehe Kapitel 5.2.3) mit Antibiotikum inkubiert. Um die Anzahl an Bakterienzellen zu bestimmen, die dieser Masse entsprechen, kam die Messung der optischen Dichte (OD) zum Einsatz. Beim OD-Wert handelt es sich um ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung in einem Medium. Die Abschwächung setzt sich aus den Beträgen der Absorption, Streuung, Beugung und Reflexion zusammen und ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichtstrahls. Bei der Bestimmung der Bakterienanzahl mittels OD-Messung handelt es sich um eine Streulichtmessung bei 600 nm, die durch die kugelförmigen Bakterienzellen hervorgerufen wird und bei einem OD-Wert bis ca. 0,7 eine lineare Abhängigkeit zur Zellanzahl zeigt. Bei einem OD₆₀₀-Wert

> 0,7 muss verdünnt werden. In einer Arbeit von *Hoerr et al.*^[104] wurden bei einem OD₆₀₀-Wert von 0,5 2×10^8 *Micrococcus luteus*-Zellen pro Milliliter Medium ausgezählt. Dadurch ließ sich die Zellanzahl für 50 mg/ml (Stammlösung) folgendermaßen bestimmen:

Tabelle 2.2.5.1-1: Bestimmung der Zellanzahl mittels OD₆₀₀-Messung

Verdünnung	Bezeichnung	OD ₆₀₀ -Wert
1:10 aus Stammlösung	(1)	2,036
1:10 aus (1)	(2)	0,538
1:10 aus (2)	(3)	0,262

Demnach bestehen 50 mg Zellmaterial aus ca. 2×10^{10} Zellen.

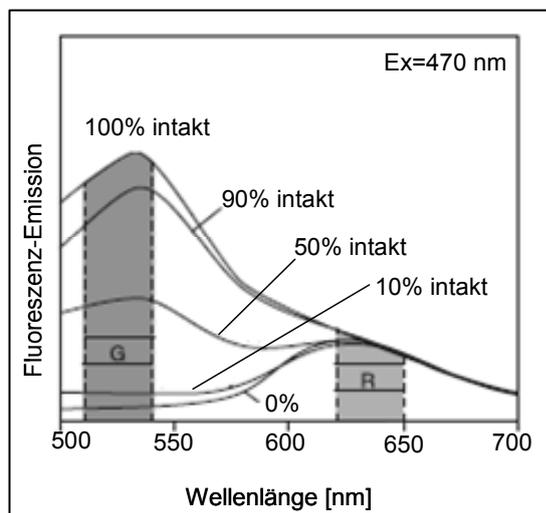


Abbildung 2.2.5.1-1: Fluoreszenzspektren verschiedener Bakterien suspensionen mit unterschiedlichem Anteil von aktiven Zellen (nach Lit^[105])

Des Weiteren ist es wichtig zu wissen, wie groß der Anteil an lebenden Zellen bei der Messung ist, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob eventuell ein Anteil des Antibiotikums in die Zelle gelangen konnte, um dort die Gyrase zu komplexieren. Zu diesem Zweck wurde ein Fluoreszenz-Assay mit dem BacLight-Kit[®] von Invitrogen durchgeführt. Dieses Kit besteht aus zwei unterschiedlichen Nukleinsäure-Farbstoffen, die unterschiedliche Permeationsfähigkeiten durch bakterielle Membranen besitzen. Der Farbstoff SYTO 9 (grün) penetriert durch alle Zellen, also sowohl durch aktive als auch durch inaktive Zellen, während Propidiumiodid (rot) nur in Zellen gelangt, deren Zellwand beschädigt ist. Wenn beide Farbstoffe in der inaktiven Zelle anwesend sind, kommt es zu einer Abschwächung der grünen Fluoreszenz von SYTO 9. Lebende Zellen fluoreszieren demnach grün, während tote Zellen rot fluoreszieren.^[105] Der Anteil an lebenden Zellen steht dabei in direkt-proportionalem Zusammenhang zu dem Verhältnis der Intensitäten im grünen und roten Bereich.

Um die Überlebensrate unmittelbar vor der NMR-Messung zu bestimmen, wurde zuerst eine Eichgerade aus vier verschiedenen Anteilen an Lebendzellen erstellt (0%, 50%, 75% und 100%). Dabei wurden die Emissionsintensitäten bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm bei 520 nm (grüner Bereich) und 630 nm (roter Bereich) bestimmt und das Verhältnis dieser beiden zueinander gegen den Anteil an lebenden Zellen aufgetragen. Es ergab sich eine Regressionsgerade der Form:

$$\text{Gleichung 2.2.5.1-1} \quad \text{Ratio}_{520\text{nm}/630\text{nm}} = 0,01578 \cdot f + 1,55455$$

Standardabweichung SD	0,9986
Korrelationskoeffizient R	0,99276

f ist dabei der prozentuale Anteil aktiver Zellen in der Bakteriensuspension.

Die eigentliche Analyse bestand aus der für die NMR-Messung vorbereiteten Bakteriensuspension, die ein Intensitätsverhältnis von 2,7006 aufwies und damit aus einem Anteil an lebenden Zellen von ca. 73% besteht. Ein Großteil der eingesetzten Bakterienzellen überlebt also den Prozess der Probenvorbereitung und könnte somit aktiv das Pharmakon über seine intakte Zellmembran aufnehmen.

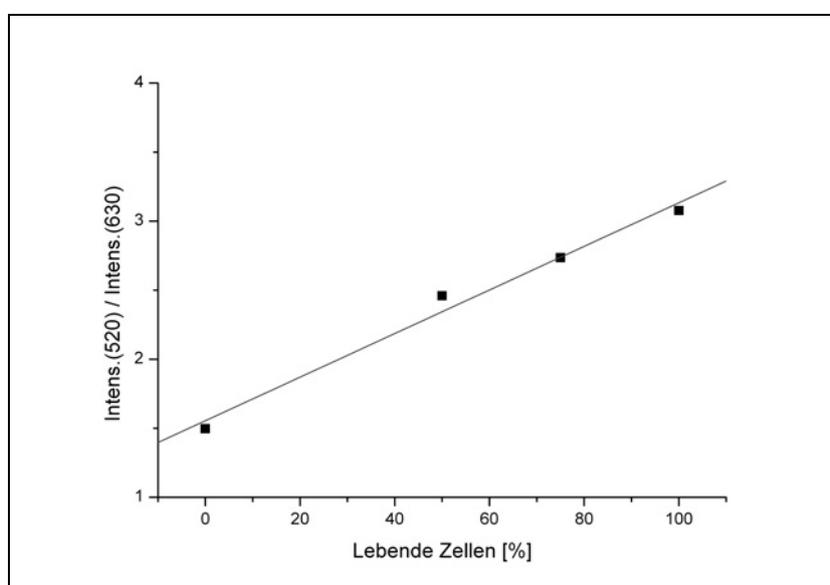
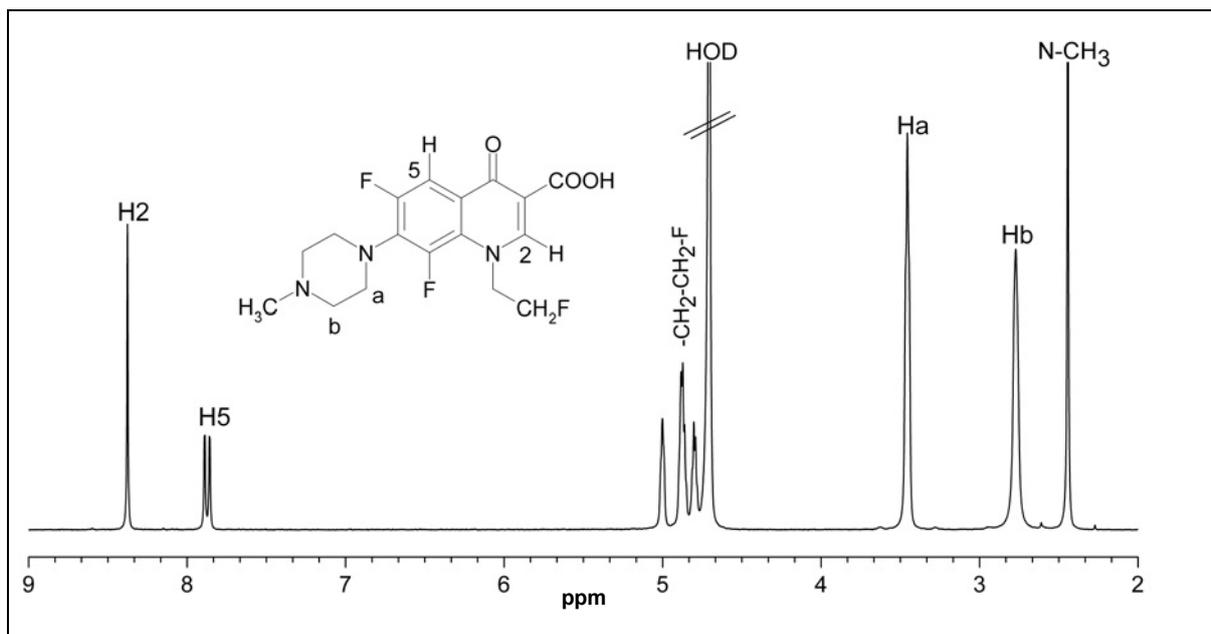


Abbildung 2.2.5.1-2: Eichgerade der Lebend-Tot-Bestimmung von *Micrococcus luteus*.

2.2.5.2. Bestimmung der Dissoziationskonstante von Fleroxacin

Abbildung 2.2.5.2-1: ^1H -NMR-Spektrum und Peakzuweisung von FleroxacinTabelle 2.2.5.2-1: ^1H -NMR-Spektroskopische Daten von Fleroxacin

Proton	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Integralwert
H2	8,30	s	-	0,9980
H5	7,89	dd	12,1 [$^3\text{J}(\text{H},\text{F})$]; 1,3 Hz $^5\text{J}(\text{H},\text{F})$	0,9760
Fluorethyl-Gruppe	4,91-4,89	m	-	4,1087
H _a	3,51	m	-	1,003
H _b	2,94	m	-	1,093
N-CH ₃	2,57	s	-	3,00

Beim Vermessen der Fleroxacin-Bakteriensuspension ändert sich das NMR-Spektrum von Fleroxacin nur unwesentlich. Die Resonanzen der Bakterienzellen sind als breite Bande zwischen 0 und 6 ppm erkennbar. Im Bereich der H2- und H5-Protonen erkennt man kaum noch Störungen der Grundlinie durch die Bakterien. In diesem Bereich ist es daher wesentlich einfacher Relaxationszeiten zu bestimmen, ohne dass überlagernde Signale der Bakterien stören würden (siehe Abbildung 2.2.5.2-2).

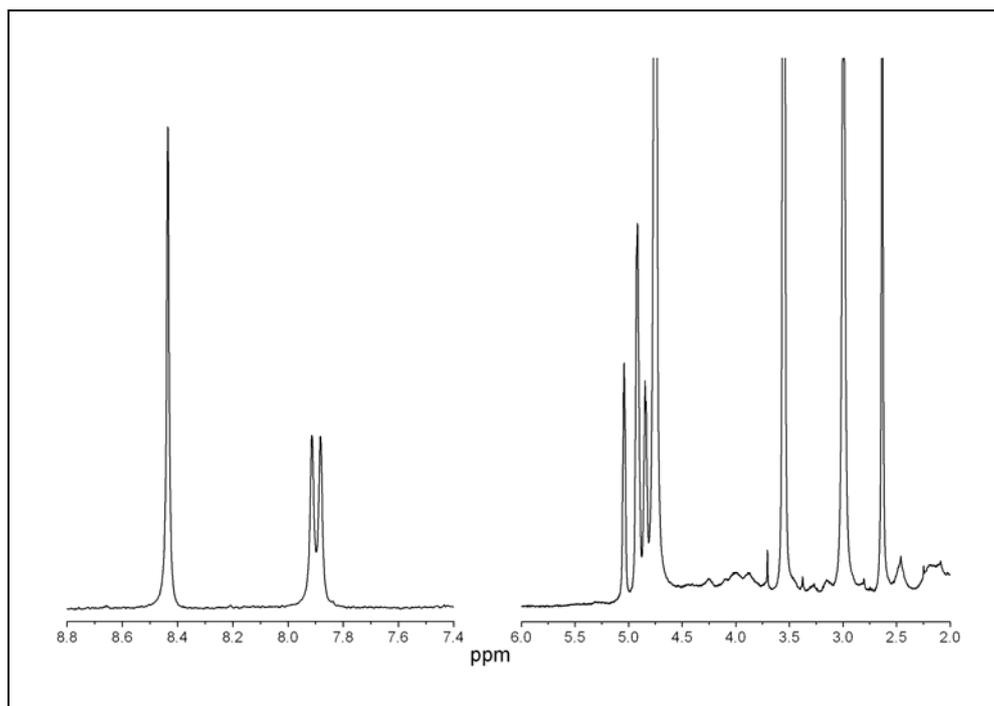


Abbildung 2.2.5.2-2: Ausschnitte aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Fleroxacin mit 50 mg Bakterienmasse

Über die T_1 -Messung der zwei Protonen H2, H5 und der N-Methylgruppe sollte ein Einblick in die Bindungsverhältnisse von Fleroxacin mit den Bakterienzellen erhalten werden. H2 als Bestandteil des 4-Pyridon, H5 als Vertreter des aromatischen Bereichs des Chinolin-Gerüsts und die N-Methylgruppe als Bestandteil des Piperazins sollten dabei den Einfluss der wichtigsten Substrukturen im Fleroxacin auf die Komplexierung aufzeigen. Die Relaxationsraten der übrigen Resonanzen im Spektrum waren aufgrund ihrer teilweise komplexen Struktur (Multipletts der Fluorethylgruppe) oder der starken Störung durch Bakteriensignale (H_a und H_b des Piperazins) schwierig korrekt zu bestimmen. Die Relaxationszeiten wurden daher nur für diese 3 Gruppen bei unterschiedlichen Pharmakon-Bakterien-Verhältnissen bestimmt und ausgewertet.

Allein durch die Zugabe von Bakterienzellen zeigte sich eine deutliche Vergrößerung der selektiven Relaxationsraten, wie aus Tabelle 2.2.5.2-2 zu sehen ist. Nichtselektive Messungen ergaben hierbei jedoch keine signifikante Änderung der Relaxationsraten. Noch deutlicher zeigt dies Tabelle 2.2.5.2-3. Diese beschreibt die selektiven Relaxationsdaten in Abhängigkeit zur Gesamtkonzentration von Fleroxacin.

Tabelle 2.2.5.2-2: Einfluss von 50,0 mg Masse *Micrococcus luteus* auf die selektiven und nichtselektiven Relaxationsraten von Fleroxacin (10mM)

	H2			H5			N-CH ₃		
	$R_{1,ns}$ (s ⁻¹)	$R_{1,s}$ (s ⁻¹)	$R_{1,ns}/R_{1,s}$	$R_{1,ns}$ (s ⁻¹)	$R_{1,s}$ (s ⁻¹)	$R_{1,ns}/R_{1,s}$	$R_{1,ns}$ (s ⁻¹)	$R_{1,s}$ (s ⁻¹)	$R_{1,ns}/R_{1,s}$
- <i>M. luteus</i>	0,769	0,722	1,066	0,597	0,549	1,088	1,414	1,595	0,887
+ <i>M. luteus</i>	0,907	1,367	0,663	0,542	0,996	0,544	1,515	1,771	0,855

Für H2 sind in Tabelle 2.2.5.2-3 auch die nichtselektiven Relaxationszeiten dargestellt, die deutlich machen, dass diese Art der Messung als Screening-Technik nicht geeignet ist, da ihr die direkte Abhängigkeit von der Ligandkonzentration fehlt.

Tabelle 2.2.5.2-3: Relaxationsdaten für Fleroxacin in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration

[L _{tot}] [mM]	H2		H5	N-CH ₃
	$R_{1,s}$ (s ⁻¹)	$R_{1,ns}$ (s ⁻¹)	$R_{1,s}$ (s ⁻¹)	$R_{1,s}$ (s ⁻¹)
2,5	1,806	0,986	n.b.	n.b.
5	1,608	0,930	1,226	1,777
7,5	1,473	0,993	1,124	1,773
10	1,367	0,998	0,996	1,771
15	1,187	0,931	0,893	1,759
25	1,004	1,015	0,765	n.b.
35	0,929	1,001	0,562	1,747

Auch die grafische Darstellung der Relaxationsdaten zeigt die Unterschiede zwischen nichtselektiven und selektiven Relaxationszeiten in Abhängigkeit der Ligandkonzentration sehr deutlich.

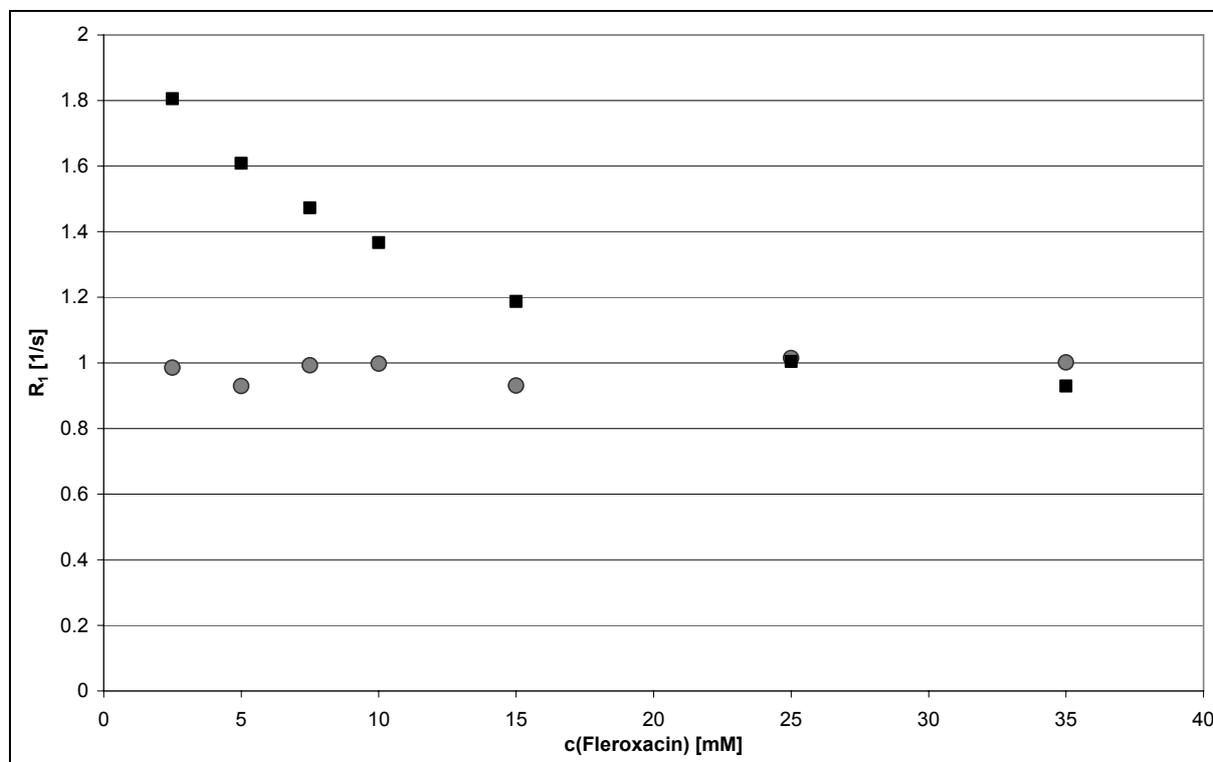


Abbildung 2.2.5.2-3: Nichtselektive (●) und selektive (■) Relaxationsraten von H2 in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration.

Um die Bindungskonstanten bestimmen zu können, wurde die in Kapitel 2.2.3.1 angesprochene Variation eines Lineweaver-Burk-Plots durchgeführt.

Abbildung 2.2.5.2-4 zeigt die Darstellung dieses Plots nach Titration mit Liganden und Tabelle 2.2.5.2-4 die erhaltenen Ergebnisse. Dabei wird deutlich, dass die beiden Protonen H2 und H5 am Chinolin-Grundgerüst ähnlich niedrige K_D -Werte aufweisen, woraus abgeleitet werden kann, dass die Bindung an die Zelle an diesem Strukturteil stattfinden muss. Auch zeigt die Übereinstimmung der beiden K_D -Werte die hohe Zuverlässigkeit dieser Methodik, da aufgrund der verwendeten Messmethode diese beiden Protonen dieselbe Dissoziationskonstante aufweisen müssen.

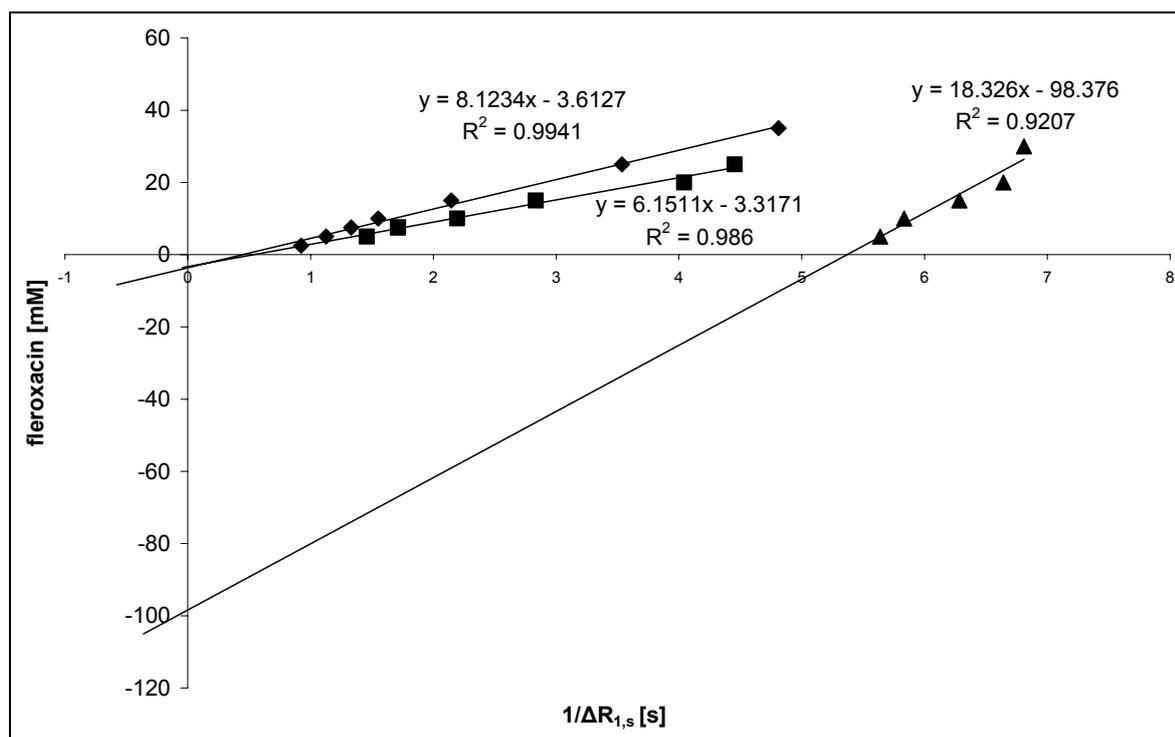


Abbildung 2.2.5.2-4: Lineweaver-Burk-Plot von H2 (◆), H5 (■) und N-CH3 (▲) von Fleroxacin mit den dazugehörigen Regressionsdaten

Tabelle 2.2.5.2-4: Ermittelte K_D -Werte für Fleroxacin

	Protonen		
	H2	H5	N-CH ₃
K_D [mM]	3,61	3,32	98,38
R^2 -Wert	0,994	0,986	0,921

Demgegenüber erwies sich die K_D -Wert-Bestimmung der N-Methylgruppe als eher problematisch, da sich die Relaxationszeiten in einem Bereich zwischen 562 ms (5mM) und 572 ms (30 mM) bewegten. Der ermittelte K_D -Wert von 98,376 mM legt aber nahe, dass sich an diesem Strukturelement keine Bindung abspielt. Da offensichtlich die Bindung nur am Chinolinring stattfindet, bleibt durch die freie Drehbarkeit der Bindung des Piperazinrings zum Chinolingerüst die Beweglichkeit (Korrelationszeit) der Protonen des Piperazinrings erhalten (siehe Kapitel 2.2.3.1). Dies äußert sich damit auch in den gemessenen Relaxationszeiten der N-Methylgruppe, die bei Zugabe der Bakterienzellen bei jedem Konzentrationsverhältnis annähernd die identische Relaxationszeit zeigt (siehe Tabelle 2.2.5.2-3).

2.2.5.3. ^{19}F -Relaxationsstudien von Fleroxacin

^{19}F -NMR-Messungen bieten enorme Vorteile gegenüber ^1H -Messungen. Bei einem etwa ähnlichen magnetogyrischen Verhältnis zwischen Fluor ($25,18 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$) und Wasserstoff ($26,75 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$) und einer etwa gleichen natürlichen Häufigkeit von ca. 100%, sind die ^{19}F -Spektren aus mehreren Gründen einfacher als ^1H -NMR-Messungen auszuwerten.

- Die Bakterienzellen enthalten keine Molekülstruktur, die ein Fluoratom enthält. Störende Signale durch die Zellen sind also bei diesen Messungen nicht zu erwarten.
- Das große Lösungsmittelsignal, wie es durch das Restwasser in D_2O bei Protonenspektren bedingt ist, kommt hier nicht zum Tragen.
- Die Bakteriensuspension kann direkt in dem Nährmedium vermessen werden, da auch dieses keine fluorierten Moleküle enthält. Somit entfällt die zeitaufwändige Waschprozedur der Zellsuspension.

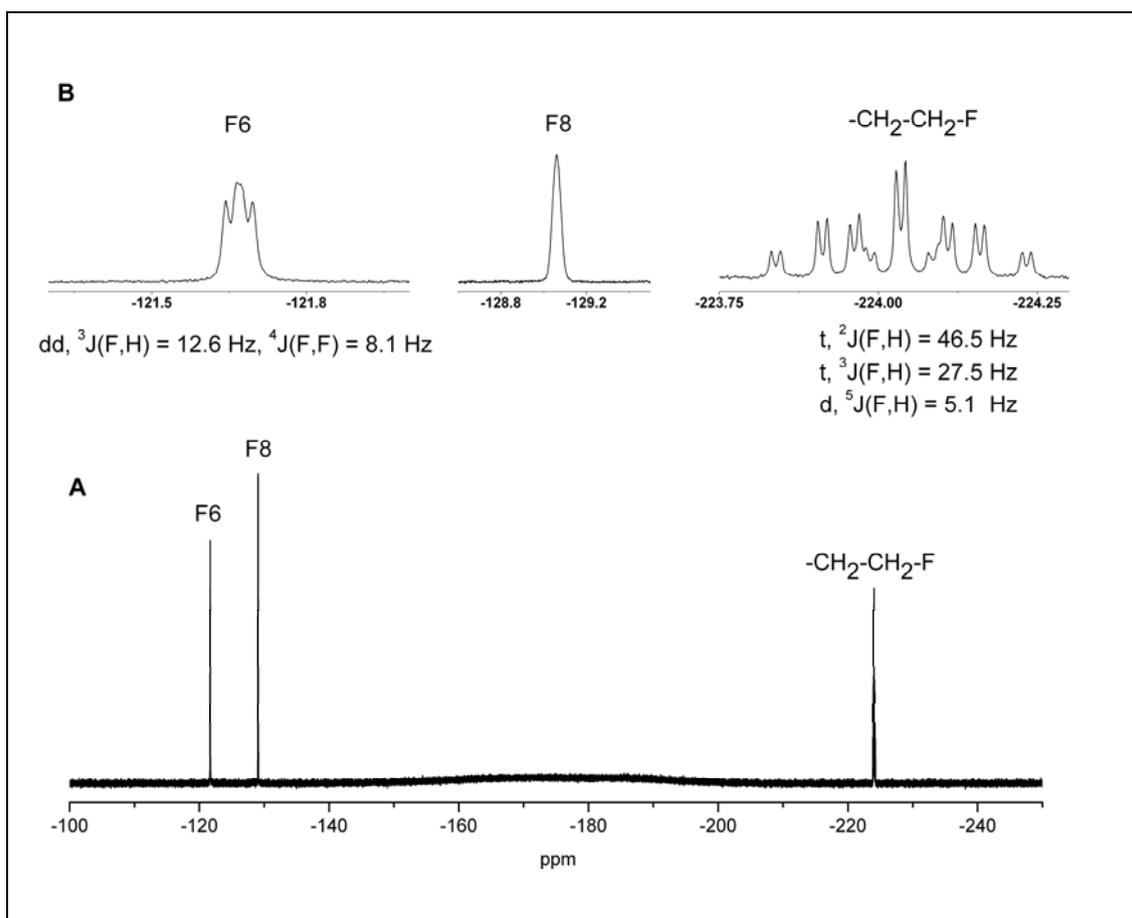


Abbildung 2.2.5.3-1: ^{19}F -Spektrum von Fleroxacin (A) und die jeweiligen Signalaufspaltungen (B)

Das ^{19}F -Spektrum von Fleroxacin (siehe Abbildung 2.2.5.3-1) zeigt die drei Resonanzen der Fluoratome. Die beiden aromatischen Fluoratome F6 und F8 finden sich im Tieffeldbereich und das Fluoratom der aliphatischen Seitenkette im hochfeldverschobenen Bereich. Auch die Kopplungen der Resonanzen lassen sich zuordnen. Das Signal der Fluorethyl-Gruppe spaltet sich in ein Multiplett mit dem Kopplungsmuster $^2\text{J}(\text{F},\text{H})$, $^3\text{J}(\text{F},\text{H})$ und $^5\text{J}(\text{F},\text{H})$ auf. Das aromatische Signal F6 zeigt ein doppeltes Dublett mit $^3\text{J}(\text{F},\text{H})$ und $^4\text{J}(\text{F},\text{F})$ -Kopplungen. Die leichte Störung der Grundlinie bei ca. -180 ppm entsteht durch den sogenannten „Fluor-Hintergrund“, der von enthaltenem Fluor in manchen Bauteilen des Messkopfes stammt. Dieser stört die T_2 -Bestimmung jedoch nicht und muss daher nicht durch eine „linear prediction“ ausgemittelt werden.

Die T_2 -Messungen ergaben für die Titration mit Fleroxacin bei konstanter Bakterienmasse von 50,0 mg folgende Ergebnisse für die transversale Relaxationsraten und die Halbwertsbreite (HLW) der einzelnen Fluorgruppen (siehe Tabelle 2.2.5.3-1).

Tabelle 2.2.5.3-1: Transversale Relaxationsraten und Halbwertsbreiten während der Ligandtitration

Fleroxacin Konzentration (mM)	F6		F8		-CH ₂ CH ₂ -F	
	HLW (Hz)	R_2 (s ⁻¹)	HLW (Hz)	R_2 (s ⁻¹)	HLW (Hz)	R_2 (s ⁻¹)
5	25.26	81.204	18.73	30.340	10.35	11.979
10	24.54	52.208	18.22	24.922	10.33	10.422
15	24.10	35.413	18.16	22.336	10.24	9.985
20	23.43	22.846	17.87	18.159	10.10	8.897
25	22.82	17.568	17.70	17.729	9.95	8.789
30	21.90	14.071	17.60	16.631	9.98	8.372

Die graphische Darstellung in Abbildung 2.2.5.3-2 dieser Ergebnisse zeigt deutlich den Einfluss der Komplexierung auf die unterschiedlichen Molekülstrukturen. Den größten Einfluss auf die Relaxationszeiten findet man für F6. Die Relaxationszeit des Fluoratoms direkt an der 4-Pyridon-Substruktur fällt von 71,07 ms bei 30 mM Ligandkonzentration auf 12,31 ms bei 5 mM ab. Auch die mit der Relaxationsrate verknüpfte Halbwertsbreite fällt deutlich ab. Zusätzlich ist das F8-Atom an der aromatischen Substruktur des Chinolin-Rings betroffen. Hier fallen jedoch die Relaxationsrate und die HLW weit weniger stark als bei F6. Für die Fluorethyl-Gruppe ist keine signifikan-

te Änderung, sowohl der transversalen Relaxationsrate, als auch der HLW ersichtlich. Auch diese Teilstruktur scheint, ebenso wie der Piperazin-Ring, nicht von der Komplexierung betroffen zu sein.

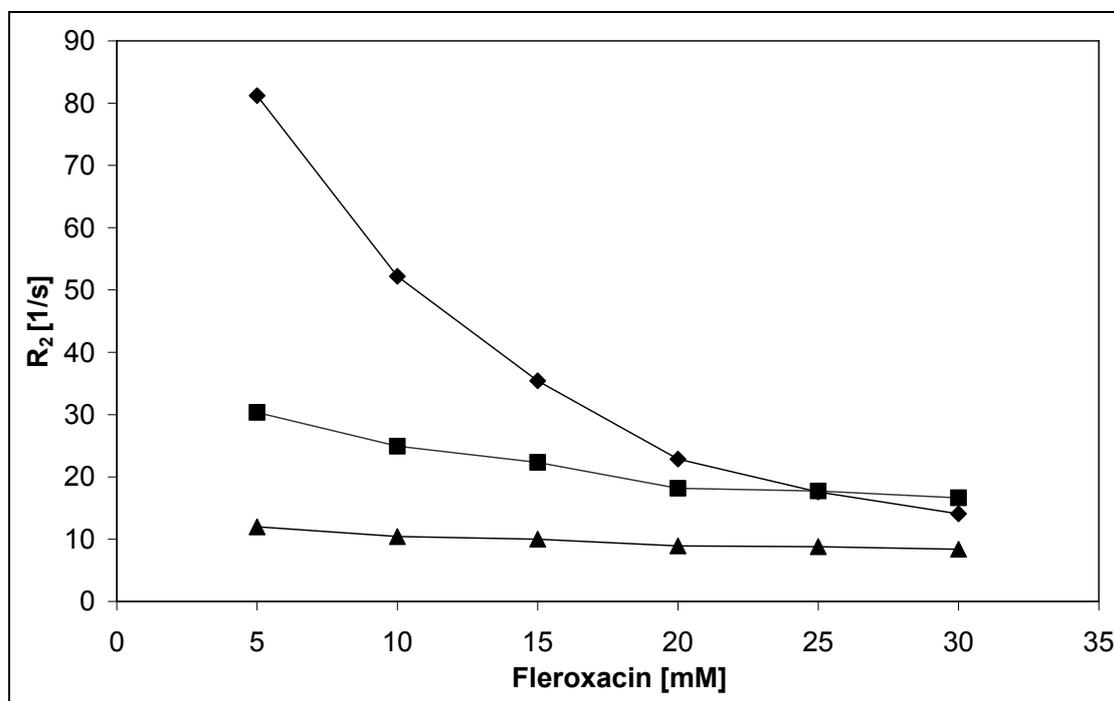


Abbildung 2.2.5.3-2: Transversale Relaxationsraten von F6 (♦), F8 (■) und CH_2-CH_2-F (▲) in Anwesenheit von 50,0 mg Bakterienmasse

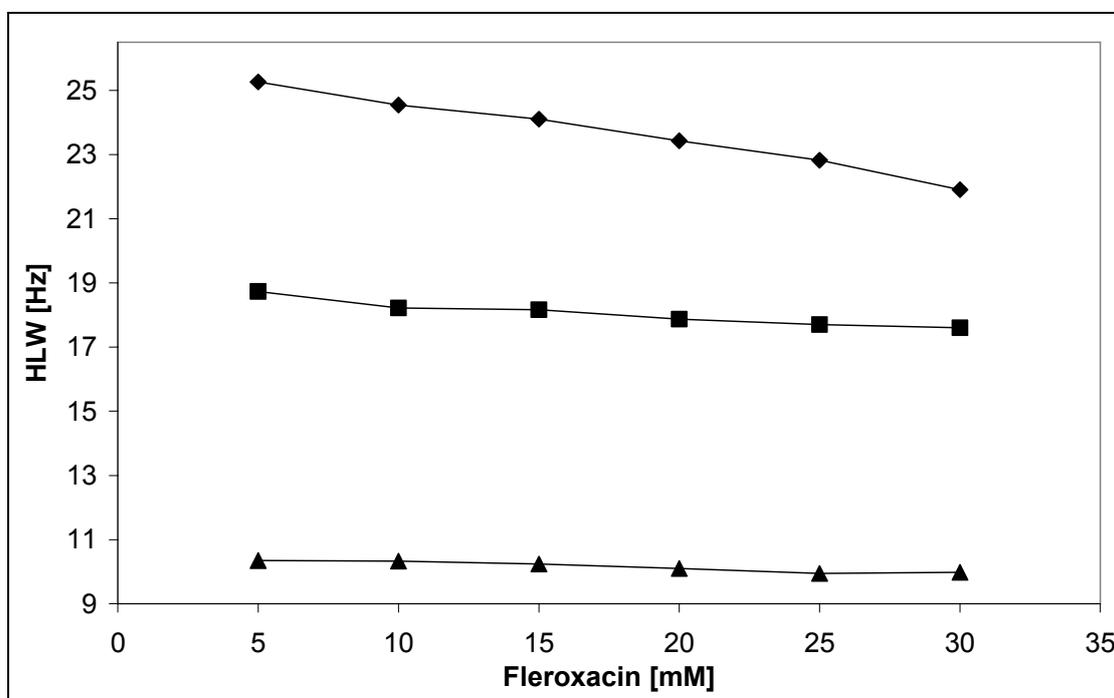


Abbildung 2.2.5.3-3: Halbwertsbreiten der Resonanzen von F6 (♦), F8 (■) und CH_2-CH_2-F (▲) in Anwesenheit von 50,0 mg Bakterienmasse

Über die ^{19}F - T_2 -Relaxationsmessungen konnte damit nachgewiesen werden, dass vor allem der Molekülteil C3 bis C6 des Fleroxacinmoleküls in die Bindung zur Bakterienzellwand oder Gyrase involviert ist. Für die Komplexbildung scheinen der Piperazinring und die Fluorethylgruppe keine Rolle zu spielen.

2.2.5.4. Relaxationsmessungen von Ofloxacin

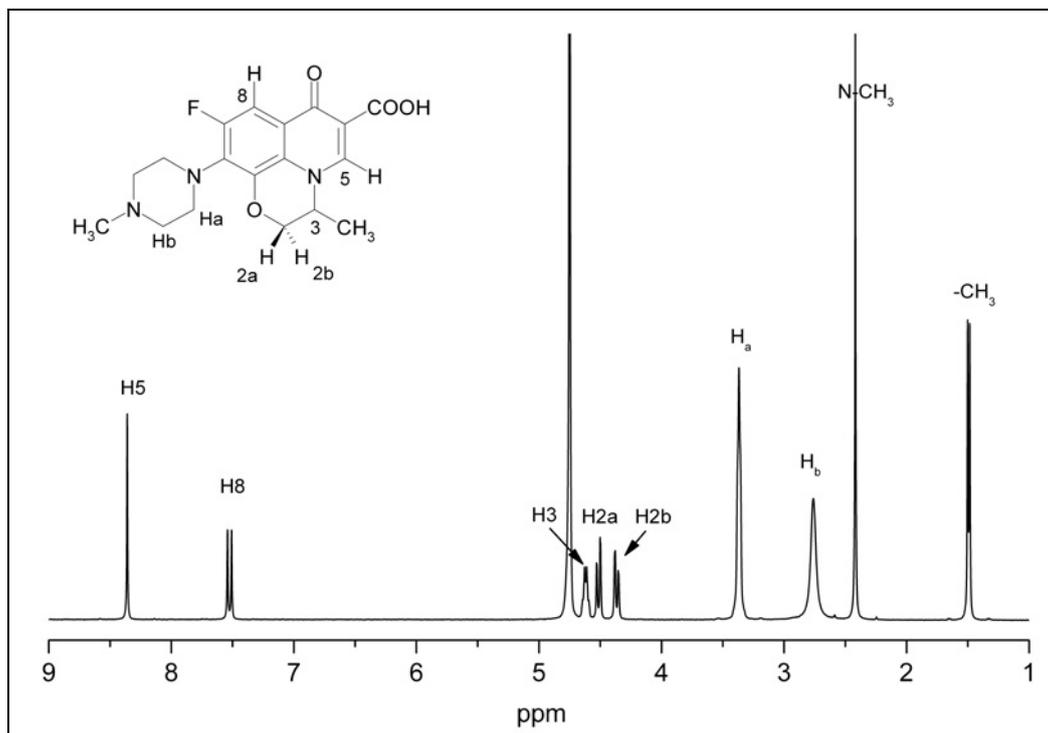


Abbildung 2.2.5.4-1: ^1H -NMR-Spektrum von Ofloxacin in D_2O

Tabelle 2.2.5.4-1: ^1H -NMR-Daten von Ofloxacin in D_2O referenziert auf den Restwasserpeak bei 4,75 ppm

Proton	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Integralwert
H5	8,36	s	-	0,950
H8	7,52	d	13,15 [$^3\text{J}(\text{H},\text{F})$]	0,920
H2a	4,51	dd	11,62 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]; 1,77 [$^2\text{J}(\text{H},\text{H})$]	0,990
H2b	4,37	dd	11,62 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]; 1,77 [$^2\text{J}(\text{H},\text{H})$]	1,003
H3	4,62	ddd	11,37; 6,82; 1,77 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]	1,063
- CH_3 (3)	1,49	d	6,82 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]	3,000
Ha	3,37	m	-	4,021
Hb	2,76	m	-	3,866
N- CH_3	2,42	s	-	2,999

In gleicher Weise wie für Fleroxacin wurde für Ofloxacin der K_D -Wert von drei Wasserstoffatomen bestimmt. Dabei handelt es sich um H5 und H8 des Chinolingerüsts und die N-Methylgruppe des Piperazinrings. In Abbildung 2.2.5.4-2 sind die zugehörigen Lineweaver-Burk-Plots dargestellt.

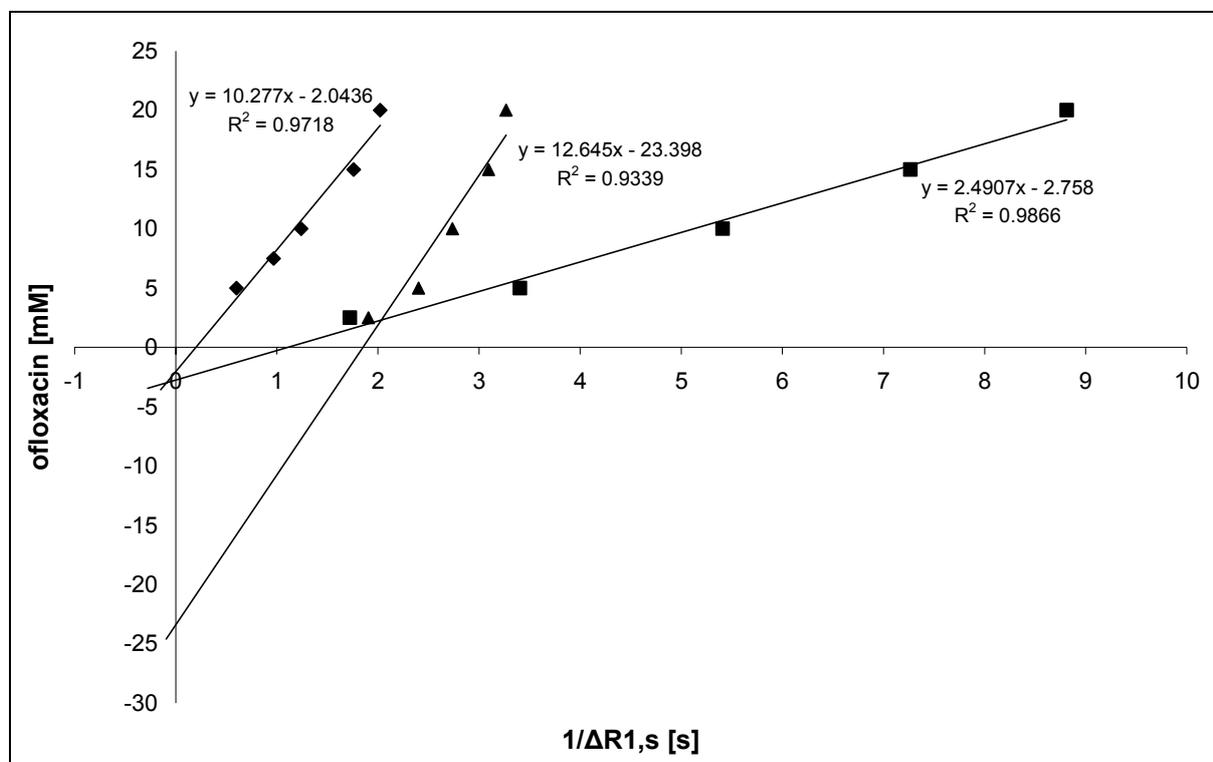


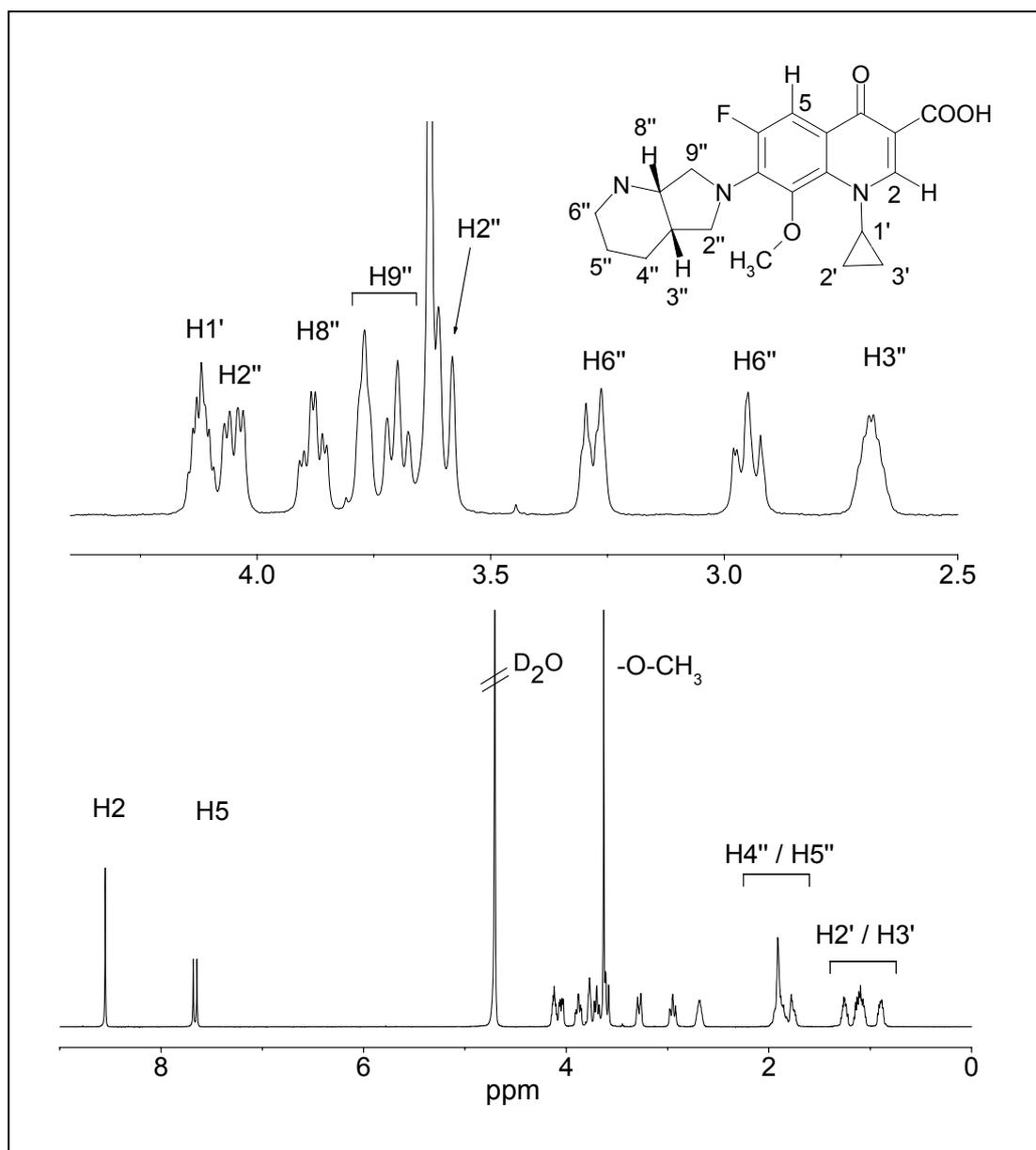
Abbildung 2.2.5.4-2: Lineweaver-Burk-Plot von H5 (◆), H8 (■) und N-CH₃ (▲) von Ofloxacin mit den dazugehörigen Regressionsdaten

Tabelle 2.2.5.4-2: Ermittelte K_D -Werte für Ofloxacin

	Protonen		
	H5	H8	N-CH ₃
K_D [mM]	2,04	2,76	23,40
R^2 -Wert	0,972	0,987	0,940

Für Ofloxacin ergeben sich dieselben Schlussfolgerungen wie für Fleroxacin: auch hier ist nur der Chinolinring an der Bindung mit der Bakterienzelle betroffen. Der Piperazinring zeigt zwar eine etwas höhere Bindungskonstante als dies bei Fleroxacin der Fall ist, jedoch kann auch hier nicht von einer direkten Bindung ausgegangen werden.

2.2.5.5. Relaxationsmessungen von Moxifloxacin

Abbildung 2.2.5.5-1: ¹H-Spektrum von Moxifloxacin in D₂OTabelle 2.2.5.5-1: ¹H-Spektroskopische Daten von Moxifloxacin

Proton	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Integralwert
H ₂ ' & H ₃ '	0,82 – 1,41	m	-	4,312
H ₄ '' & H ₅ ''	1,69 – 2,07	m	-	4,238
H ₃ ''	2,73	m	-	1,048
H ₆ ''a	2,99	t	10,6 [³ J(H,H)]	1,059
H ₆ ''b	3,33	dd	12,9 [³ J(H,H)]	1,053

Proton	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Integralwert
H2''a	3,66	d	11,1 [$^3J(H,H)$]	4,132
O-CH ₃	3,68	s	-	
H9''a	3,74	t	9,1 [$^3J(H,H)$]	1,084
H9'' b	3,81	m	-	1,086
H8''	3,92	dt	9,3 [$^3J(H,H)$], 3,6 [$^2J(H,H)$],	1,081
H2''b	4,10	dd	11,1 [$^3J(H,H)$], 4,3 [$^2J(H,H)$]	2,112
H1''	4,16	m	-	
H5	7,71	d	14,4 [$^3J(H,F)$]	0,92
H2	8,60	s	-	1,00

Auch für Moxifloxacin wurden Untersuchungen am Chinolinring und an einem Proton des (1S,6S)-2,8-Diazabicyclo[4.3.0]nonan-Rings (H3'') durchgeführt.

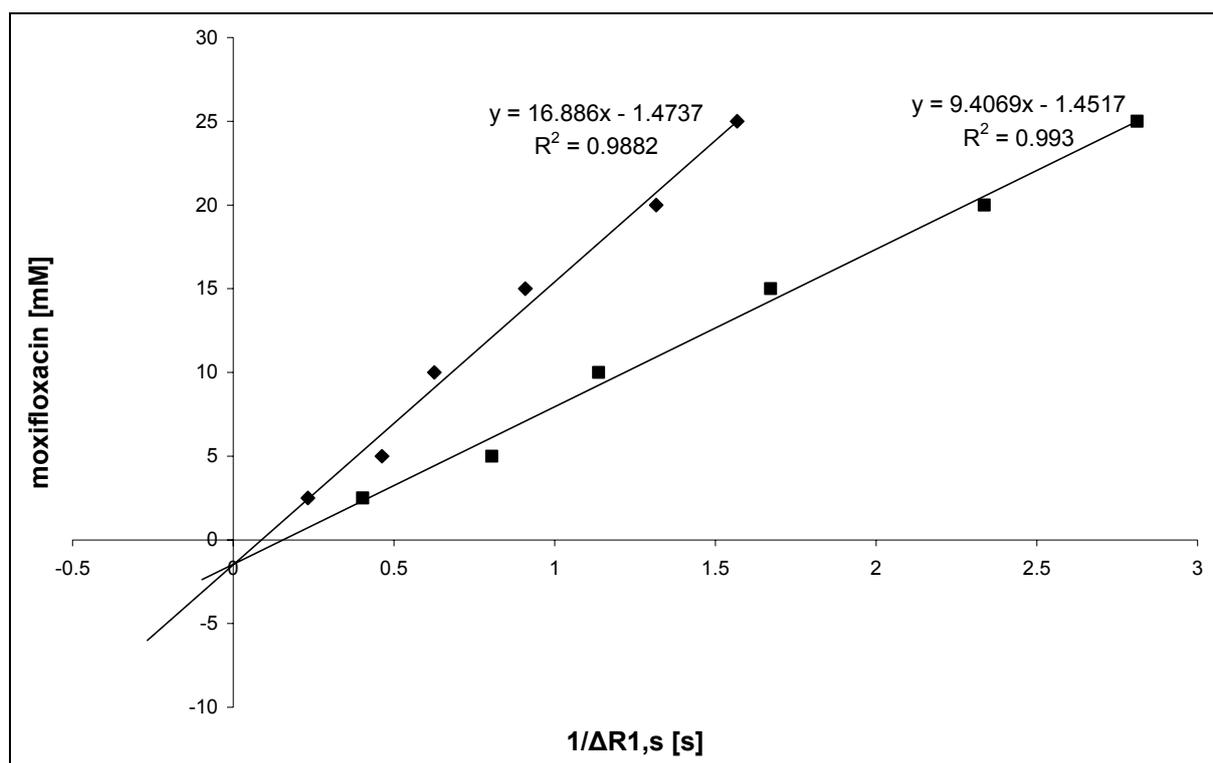


Abbildung 2.2.5.5-2: Lineweaver-Burk-Plot von H2 (♦), H5 (■) von Moxifloxacin mit den dazugehörigen Regressionsdaten

Tabelle 2.2.5.5-2: Ermittelte K_D -Werte für Moxifloxacin

	Protonen		
	H2	H5	H3''
K_D [mM]	1,47	1,45	n. b.
R^2 -Wert	0,988	0,993	-

n. b. = nicht bestimmbar

Das Proton H3'' ist in Abbildung 2.2.5.5-2 nicht dargestellt, da dessen Relaxationszeiten keine direkte Abhängigkeit zur Ligandkonzentration mehr erkennen lassen (siehe Abbildung 2.2.5.5-3). Dies zeigt deutlich, dass auch für dieses Ringsystem keine Bindung an der Bakterienzelle festzustellen ist. Ersichtlich wird dies aus der Tatsache, dass die freie Drehbarkeit des Systems auch bei Zugabe der Zellen erhalten bleibt und sich damit auch die Relaxationsraten nicht ändern.

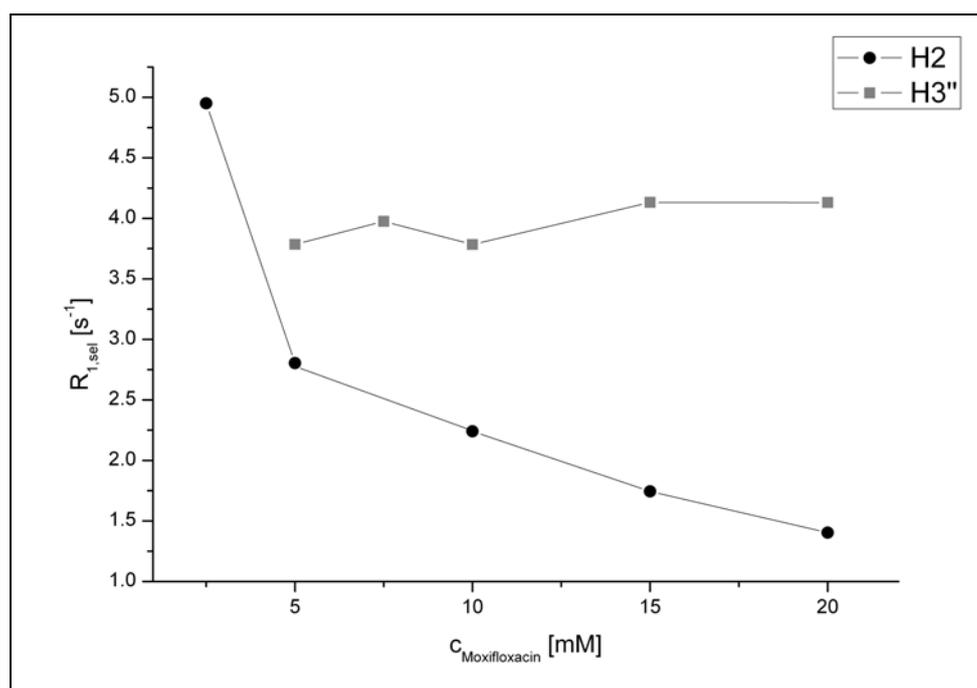


Abbildung 2.2.5.5-3: Vergleich der Relaxationsraten eines durch die Komplexbildung betroffenen Protons (H2) und eines nicht betroffenen Protons (H3'') von Moxifloxacin

2.2.6. Zusammenfassung

Die verwendeten NMR-Screening-Verfahren erwiesen sich als ein leistungsstarkes Werkzeug, um einen Einblick in den Bindungsmodus des Liganden zu erhalten, selbst wenn keine genaue Aussage darüber getroffen werden kann, an welchem Strukturelement der Bakterienzelle die bestimmten Dissoziationskonstanten detek-

tiert werden. Die Bestimmung der K_D -Werte der drei Gyrasehemmer führten zum gleichen Ergebnis: die Bindung an die Bakterienzellen findet bei allen untersuchten Fluorchinolonen ausschließlich am Chinolin-Ring statt. Dabei wurde der K_D -Wert des Chinolon-Ringsystems durch die Vermessung von zwei Protonen bestimmt, deren gute Übereinstimmung die Zuverlässigkeit dieser Messmethode zeigt.

Tabelle 2.2.6-1: K_D -Werte der drei untersuchten Gyrasehemmer

Gyrasehemmer	Dissoziationskonstante* [mM]	MHK-Werte gegen <i>S. aureus</i> [mg/l]
Fleroxacin	3,46	1,0 ^[106]
Ofloxacin	2,40	0,5 ^[106]
Moxifloxacin	1,46	0,06 ^[107]

* = gemittelter K_D -Wert der Protonen am Chinolinring

Da Literaturdaten von minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) an *M. luteus* nicht bekannt sind, werden in Tabelle 2.2.6-1 MHK-Werte einer anderen grampositiven Kokken-Spezies (*S. aureus*) mit den experimentell bestimmten K_D -Werten verglichen. Das am stärksten bindende Moxifloxacin zeigt dabei auch den kleinsten MHK-Wert, wohingegen Fleroxacin mit der geringsten Bindung auch die geringste Hemmung vorweist. Die ermittelten Dissoziationskonstanten können allerdings nicht als Absolutwert herangezogen werden, da es an anderen experimentellen Methoden mangelt, mit denen diese Daten verglichen und bestätigt werden könnten.

Auch die im Fall von Fleroxacin durchgeführten ¹⁹F-Spin-Spin-Relaxationsstudien konnten die beschriebene Theorie bestätigen und untermauern.

Mit den hier genutzten Untersuchungsmethoden war es jedoch nicht möglich festzustellen, an welches Zielprotein (Gyrase, Porine, Zellwand) die Fluorchinolone binden. Durch die Linearität der Regressionsgeraden kann jedoch eine unspezifische Bindung an der Zellwand ausgeschlossen werden. Um genauere Einblicke zu erhalten, wäre es sinnvoll, die jeweiligen Zielproteine der Zelle zu isolieren und Bindungskonstanten hiermit selektiv zu vermessen. Da die NMR-Spektroskopie jedoch eine sehr unsensitive Messmethode darstellt, wären extrem hohe Mengen an isoliertem Enzym notwendig. Ein Ansatz wäre es jedoch, Zelllysate nach ihren Bestandteilen aufzutrennen und an den einzelnen Fraktionen die Bindungsstudien zu wiederholen.

2.3. Proteinbindungsstudien von Gyrasehemmern an BSA

2.3.1. Albumine

Albumine (von lateinisch *albumen [ovi]* das Weiße [des Eis]) gehören zur Gruppe der globulären Moleküle. Diese sind Proteine mit einer kugelförmigen Tertiärstruktur, deren unpolare Seitengruppen ins Innere, die polaren hingegen nach außen ragen und damit ihre gute Wasserlöslichkeit gewährleisten. Zur Gruppe der globulären Proteine gehören neben den Albuminen Histone und Globuline.

Die Albumine umfassen im menschlichen Organismus folgende Aufgaben:

- **Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks**

Albumin bindet Wasser und verhindert damit den Austritt von Wasser aus Zellzwischenräumen. Der Mangel an Albumin führt zur Senkung des kolloidosmotischen Drucks und damit zur Entstehung von Ödemen.

- **Beitrag zur Pufferkapazität**

Aufgrund seiner Eigenschaft, Protonen abgeben und aufnehmen zu können, leistet Albumin einen geringen Beitrag zur Pufferkapazität im Blut.

- **Transport von wasserunlöslichen Substanzen**

Darunter fallen z. B. körpereigene Stoffe wie Fettsäuren, Bilirubin, Vitamine und manche Hormone. Des Weiteren werden auch Pharmaka über Albumin transportiert.

Humanes Serumalbumin (HSA) stellt ein 585 Aminosäuren großes Protein mit einer



Abbildung 2.3.1-1: Struktur von humanem Serumalbumin

molaren Masse von 66500 Da dar. Diese Polypeptidkette bildet ein herzförmiges Protein mit den Maßen von ca. 80x80x30 Å.^[108] 67% der Sekundärstruktur bestehen aus einer α -Helix.^[108,109] Das Protein ist aus 3 homologen Domänen (I-III) zusammengesetzt, die wiederum in 2 Subdomänen aufgeteilt werden können (A und B). Mit Ausnahme von einer sind alle Cystein-Aminosäuren des Proteins an der Ausbildung von 17 stabilisierenden Disul-

fidbrücken beteiligt.

HSA stellt etwa 60% der menschlichen Plasmaeiweißmenge dar, wobei täglich ca. 17 g Albumin neu in der Leber synthetisiert werden.

HSA interagiert reversibel mit einem breiten Spektrum an Pharmaka. Es existieren mindestens zwei hochaffine Bindungsstellen, die von *Sudlow et al.* charakterisiert wurden.^[110,111] Die typischen Assoziationskonstanten für diese Bindungsstellen liegen in einem Bereich von $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. Bindungsseite I liegt als Bindungstasche in der Subdomäne IIa vor, deren Inneres durch hydrophobe Aminosäureseitenketten geformt wird, wohingegen der Eingang der Tasche von positiv geladenen Resten umgeben ist.^[112] Aufgrund der Größe dieser Bindungsstelle können hier endogene Substanzen wie z. B. Bilirubin binden. Auch können in der Bindetasche mehrere unterschiedliche Liganden simultan gebunden werden.^[113,114] Die Modellsubstanz, die an dieser Bindungsseite bindet, ist das Warfarin.^[115]

Bindungsstelle II liegt in der Subdomäne IIIa und scheint kleiner und weniger flexibel als Bindungsstelle I zu sein. Dementsprechend wirkt sich dies auf die Selektivität dieser Bindungstasche aus. Ein Beispiel ist die Aminosäure Tryptophan. Das L-Tryptophan bindet 100mal stärker an diese Stelle als das D-Isomer.^[116]

Neben diesen Bindungsstellen existiert aber mindestens noch eine weitere hochaffine Stelle, da stark proteingebundene Arzneistoffe wie Probenecid an keiner der erläuterten Bindungsstellen binden. Zusätzlich zu diesen primären Bindungsstellen bestehen noch mehrere Stellen geringerer oder sehr geringer Affinität.

In den vorliegenden Experimenten wurde anstatt humanem Serumalbumin das preislich günstigere Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Obwohl die Albumine der Säugetiere eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz aufweisen (ca. 80% gleicher Aufbau), unterscheiden sich die Albumine in ihrer Bindungseigenschaft von Arzneistoffen.^[117]

2.3.2. Proteinbindung

Das Ausmaß und die Stärke der Proteinbindung eines Arzneistoffes ist eine bedeutende pharmakologische und pharmakokinetische Größe. Sie hat Einfluss auf die Wirksamkeit, das Verteilungsvolumen, die Metabolisierung und die Ausscheidung des Pharmakons. Der durch das Albumin gebundene Anteil ist – bis auf wenige Aus-

nahmen – pharmakologisch inaktiv, da nur der freie Anteil biologische Membranen überwinden und am Zielsystem binden kann. Die durch die Proteinbindung verzögerte Metabolisierung erhöht in vielen Fällen die Halbwertszeit und damit die Wirkdauer von bestimmten Stoffen. Ebenso werden die renale und hepatische Clearance durch die Proteinbindung beeinflusst, da gebundene Arzneistoffmoleküle nicht über Leber und Niere ausgeschieden werden können.

Das Ausmaß der Proteinbindung bzw. Proteinbindungskonstanten können über mehrere Analysetechniken bestimmt werden. Dazu gehören:

- **Gleichgewichtsdialyse**

Hierbei wird eine Dialysezelle durch eine semipermeable Membran definierter Porenweite, die ausschließlich für den Liganden durchlässig ist, getrennt. In einer Kammer befindet sich Albumin, in der anderen Kammer der Wirkstoff, der in die Albumin-Kammer diffundieren kann und dort am Makromolekül bindet. Nach Gleichgewichtseinstellung wird der freie Anteil an Arzneistoff z. B. mit optischen Methoden bestimmt. Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die diese Messtechnik verwenden.^[118,119]

- **Ultrafiltration**

Nach Inkubation des Arzneistoffes mit Albumin wird diese Lösung über eine Ultrafiltrationskartusche, die ebenfalls nur für freien Wirkstoff durchlässig ist, filtriert und die freie Wirkstoffkonzentration meist mittels HPLC^[120,121,122] oder beim Verfahren der kontinuierlichen Ultrafiltration über UV-Vis-Spektroskopie^[123] bestimmt.

- **Ultrazentrifugation**

Diese Technik nutzt die unterschiedliche Bewegungsgeschwindigkeit unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte aus. Entsprechend der Ultrafiltration erfolgt die Bestimmung der freien Wirkstoffkonzentration meist per HPLC.^[124]

- **Kapillarelektrophorese**

Die wichtigsten Techniken sind dabei die Affinitätskapillarelektrophorese^[125], „Vacancy affinity“-Elektrophorese^[126] und die Frontal-Analyse.^[127]

- **HPLC**

Bei der Proteinbindungsbestimmung setzt man ein Material mit immobilisiertem Protein als Säulenpackmittel ein.^[128] Die Auswertung erfolgt über den Vergleich der Retentionszeiten mit bekannten Retentionszeiten von Standardsubstanzen.

- **NMR-Spektroskopie**

Wie in Kapitel 1.2.5 aufgeführt, existieren zahlreiche Parameter, die zur Bestimmung der Proteinbindung verwendet werden können.^[129,130,131] Mit einigen Experimenten lassen sich weiterhin Aussagen über die Beschaffenheit des entstehenden Komplexes machen.

2.3.3. Grundlagen der NMR-Diffusionsmessungen

Neben der Bestimmungsmethode über die Relaxationszeiten (siehe Kapitel 2.2.3) ist die Ermittlung der Dissoziationskonstante ebenfalls über die Bestimmung der translationalen Diffusionsraten möglich. Bindet ein Ligand an ein Makromolekül, nimmt der Ligand den Diffusionskoeffizienten des Rezeptors an. Auch hier ist im Falle des schnellen Austauschs zwischen gebundener und freier Form des Liganden folgender Sachverhalt für den beobachteten Diffusionskoeffizienten (D_{obs}) gegeben:

Gleichung 2.3.3-1

$$D_{obs} = \frac{[EL]}{[L_{tot}]} \cdot D_G + \left(1 - \frac{[EL]}{[L_{tot}]}\right) \cdot D_F$$

D_F und D_G sind die Diffusionskoeffizienten des Liganden im freien und gebundenen Zustand $[L_{tot}]$ und $[EL]$ die dazugehörigen Konzentrationen des Liganden.

Diffusionskonstanten lassen sich über sogenannte „pulsed field gradient“ (PFG)-Pulssequenzen bestimmen. Die zwei Wichtigsten sollen im Folgenden besprochen werden.

- “Pulsed field gradient spin echo” (PFG-SE)-Experiment^[132]

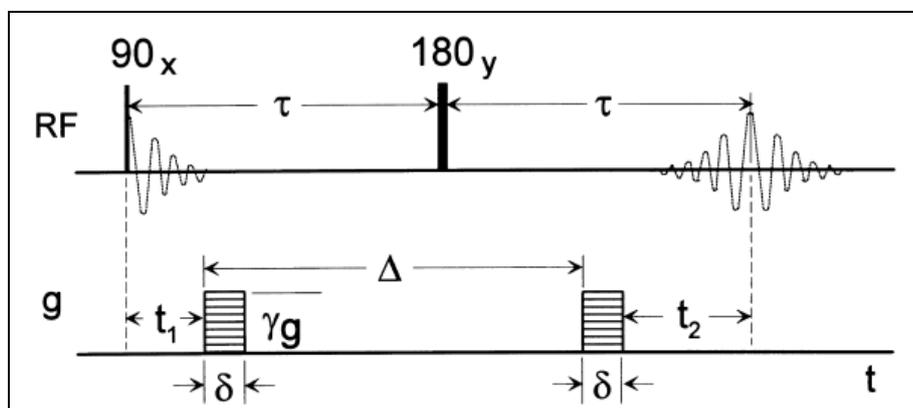


Abbildung 2.3.3-1: PFG-SE-Pulssequenz (nach Lit.^[133])

Das Basisexperiment, mit denen man Diffusionskonstanten ermitteln kann, ist als PFG-SE in Abbildung 2.3.3-1 dargestellt. In Abwesenheit der Gradienten würde dieses Experiment der in Kapitel 2.2.3.2 besprochenen CPMG-Pulssequenz entsprechen, wobei der Signalverlust allein durch die transversale Relaxation während 2τ begründet ist. In Anwesenheit der Gradienten kommt eine komplette Refokussierung der Vektoren nur zustande, wenn das lokale Feld eines Spins während der beiden Gradienten identisch ist. Das ist nur dann der Fall, wenn der Spin am selben Ort verweilen würde. Diffundiert das Molekül während der Diffusionszeit Δ von seinem ursprünglichen Ort, entspricht das lokale Feld während des zweiten Gradienten nicht mehr dem des ersten und der Spin kann nicht mehr komplett refokussieren. Dies geht automatisch mit einer Abschwächung des Signals einher. Um die Diffusionsraten zu charakterisieren, wäre es möglich, progressiv die Zeit Δ , die Länge des Gradientenpulses oder dessen Stärke zu verändern. Dabei erweist es sich als Nachteil, die Zeit zwischen den Gradienten zu verändern, da so eine Signalabschwächung auch durch transversale Relaxationseffekte entstünde. Durch die Variation der Gradientenstärke stören T_2 -Relaxationseffekte die Messung nicht, da hier für alle Einzelerperimente die gleichen Bedingungen vorliegen.

- “Pulsed field gradient stimulated echo” (PFG-STE)-Experiment.^[134]

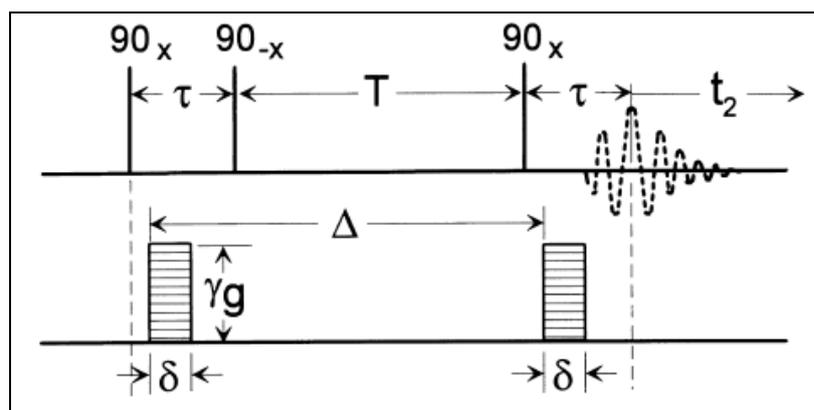


Abbildung 2.3.3-2: PFG-STE-Pulssequenz (nach Lit^[133])

Wenn man deutlich langsamere Prozesse – wie etwa die Selbstdiffusion stark viskoser Stoffe – untersuchen möchte, ist es unter Umständen sinnvoll, das Dephasierungsintervall (erste τ -Zeit in Abbildung 2.3.3-2) vom Rephasierungsintervall (zweite τ -Zeit) zu trennen. Dies kann durch die Aufteilung des 180° -Pulses in zwei

90° -Pulse erreicht werden. Dadurch lässt sich ein Teil der transversalen Kohärenz als longitudinale Polarisation speichern.

Das Experiment beginnt mit einem 90°_x -Puls, wobei die Situation der Phase nach der Zeit τ dem PFG-SE-Experiment entspricht. Nun folgt ein zweiter 90° -Puls entlang der $-x$ -Achse, der die x -Magnetisierung auf die z -Achse dreht. Durch die T_2 -Relaxation zerfällt die Magnetisierung in y -Richtung. Die Magnetisierung in z -Richtung relaxiert aufgrund der längeren T_1 -Zeit ($T_1 \gg T_2$) wesentlich langsamer. Durch den dritten 90°_x -Puls werden die z -Vektoren wieder auf die x -Achse gedreht und refokussieren nach der Zeit τ . Somit entsteht das stimulierte Echosignal. Bei den vorliegenden Diffusionsmessungen wurde eine leicht variierte Form eines PFG-STE-Experiments verwendet. Es wurden die Gradienten nochmals in zwei Gradienten mit unterschiedlicher Polarität aufgeteilt. Um wieder eine Refokussierung der Spins zu erreichen, muss zwischen diesen ein 180° -Puls eingeschoben werden. Der Vorteil dieser verwendeten „*stebpgp*“-Pulssequenz^[135] beruht auf dem Vorhandensein von bipolaren Gradienten, die ein stabileres Lock-Signal gewährleisten. Der „Spoil“-Gradient G_7 sorgt für die komplette Dephasierung restlicher Quermagnetisierung, die eventuell das Spektrum stören könnten.

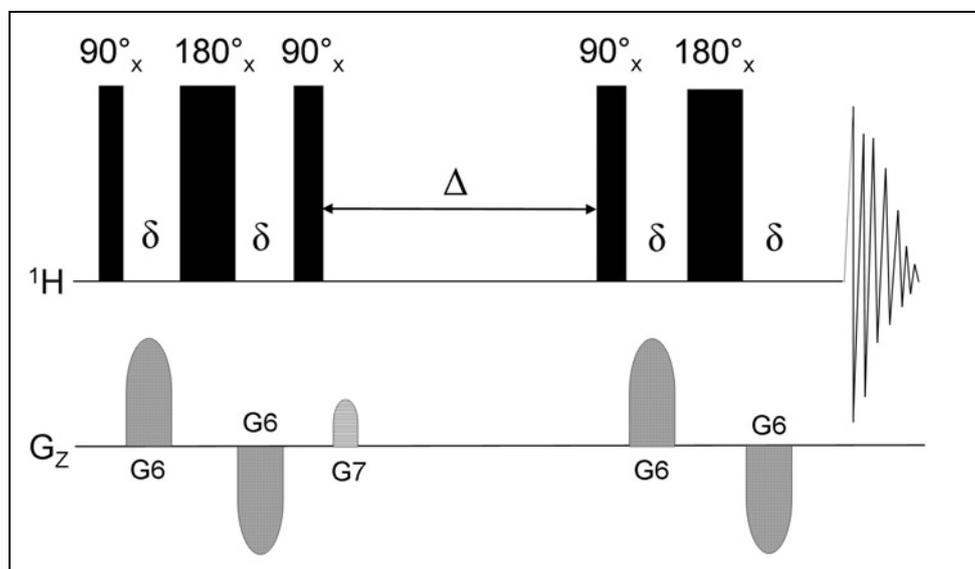


Abbildung 2.3.3-3: „*stebpgp1s*“-Pulssequenz

Der Abfall der Signalintensität I für das PFG-SE-Experiment folgt dabei folgender Gleichung.

Gleichung 2.3.3-2
$$I = I_0 \cdot e^{-D \cdot \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)}$$

Hierbei ist I_0 die Signalintensität bei einer Gradientenstärke von 0%, g die Gradientenstärke, D der Diffusionskoeffizient und Δ bzw. δ die Zeit zwischen den Gradienten bzw. die Gradientenlänge. Durch die Auftragung von I gegen g entsteht eine Exponentialfunktion, die nach D ausgewertet werden kann.

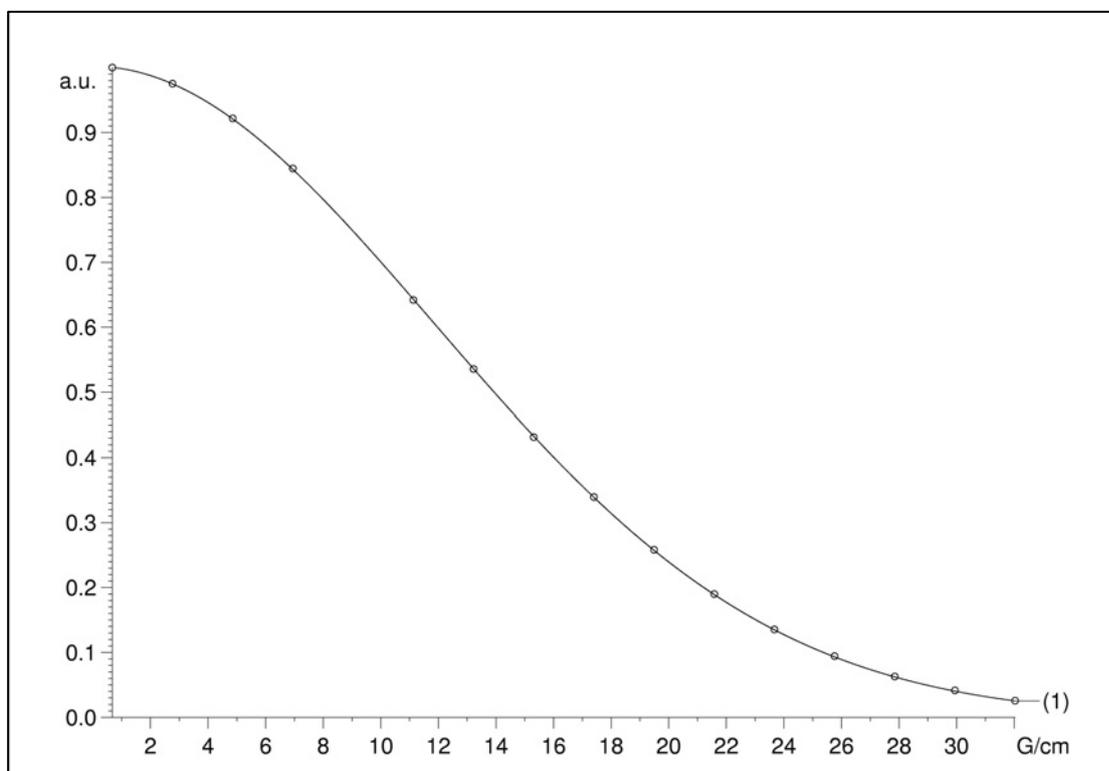


Abbildung 2.3.3-4: Diffusions-Plot für Nalidixinsäure in D_2O

Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten an Albumin über die Bestimmung von Diffusionskonstanten wurde bereits in früheren Arbeiten mit diversen nichtsteroidalen Antiphlogistika durchgeführt.^[136,137]

Ähnlich den Relaxationsmessungen werden dabei die beobachteten Diffusionskonstanten D_{obs} bei unterschiedlichen Antibiotikumkonzentrationen c_L ermittelt und gegeneinander aufgetragen. Es gilt:

$$\frac{2(D_{obs} - D_F)}{(D_G - D_F)} = 1 + \left(\frac{K_D}{C_P}\right) \cdot \left(\frac{C_P}{C_L}\right) + n \cdot \frac{C_P}{C_L} -$$

Gleichung 2.3.3-3

$$\left\{ \left[1 + \left(\frac{K_D}{C_P}\right) \cdot \left(\frac{C_P}{C_L}\right) + n \cdot \frac{C_P}{C_L} \right]^2 - 4n \left(\frac{C_P}{C_L}\right) \right\}^{1/2}$$

Hier entspricht D_F bzw. D_G der Dissoziationskonstante des freien bzw. des gebundenen Wirkstoffs, n der Anzahl der Bindungsstellen und c_P der Gesamtkonzentration an Protein.

2.3.4. Bestimmung der Messparameter

2.3.4.1. Gradientenkalibrierung

Bei der Bestimmung des exakten Diffusionskoeffizienten ist es nötig, die absolute Stärke des eingesetzten Gradienten zu kennen. Zur Kalibrierung der Gradientenstärke existieren zwei Methoden:

- In ein NMR-Röhrchen wird eine exakt 2 mm starke Teflonscheibe eingebracht und mittels des entstehenden ^1H -NMR-Spektrums die Gradientenstärke berechnet.^[138]
- Mit einer definierten Standardprobe („doped water“) aus 1% H_2O in 99% D_2O , dem 0,1% 3-(Trimethylsilyl)-Propionsäure- D_4 (TSP) als Referenz und 0,1 mg/ml Gadoliniumchlorid zugesetzt ist, wird die Gradientenstärke kalibriert. Gadoliniumchlorid unterdrückt Relaxationsprozesse, die die Diffusionsmessungen eventuell stören würden. Bei einer Temperatur von 25 °C beträgt der Diffusionskoeffizient von Wasser in einer solchen Probe $1,902 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.^[139] Eine maximale Gradientenstärke von 5,5 G/mm konnte für das hier verwendete Spektrometer bestimmt werden.

2.3.4.2. Temperaturkalibrierung

Des Weiteren ist die Kenntnis der exakten Temperatur von entscheidender Bedeutung, da Diffusionskoeffizienten – wie in Kapitel 1.2.5.5 bereits beschrieben – stark von der in der Probe vorliegenden Temperatur beeinflusst werden. Da sich der Temperaturfühler eines NMR-Spektrometers zwar in unmittelbarer Nähe zum Probenröhrchen befindet, jedoch die Temperatur in der Probe nicht exakt wiedergegeben werden kann, greift man auf Standardproben zurück, deren chemische Verschiebung von der Temperatur abhängig ist. Dadurch kann ein Zusammenhang zwischen der vom Fühler angezeigten Temperatur und der tatsächlich in der Probe vorliegenden Temperatur erstellt und mittels Kalibriergerade ermittelt werden.

Für Temperaturmessungen zwischen 170 und 300 Kelvin wird eine 4%ige Lösung von Methanol in deuteriertem Methanol verwendet. Im Bereich zwischen 290 und 420 K wird routinemäßig eine 80%ige Lösung von 1,2-Ethandiol in DMSO-d₆ benutzt. Da die Diffusionsmessungen bei 300 K durchgeführt wurden, wurde auf die letztgenannte Standardlösung zurückgegriffen. Hierbei wird über den Abstand der Resonanz der Hydroxylgruppen und der Resonanz der Methylengruppen mittels folgender Formel die Temperatur in der Messlösung berechnet.^[138]

$$\text{Gleichung 2.3.4.2-1} \quad T_{\text{gemessen}} = -108,33 \cdot \Delta\delta + 460,41$$

Durch diese Beziehung lassen sich bei unterschiedlichen Fühlertemperaturen die tatsächlich in der Probe vorliegenden Temperaturen ermitteln und als Regressionsgerade auftragen. Man erhält somit den linearen Zusammenhang aus Fühler- und tatsächlicher Temperatur im Probenröhrchen.

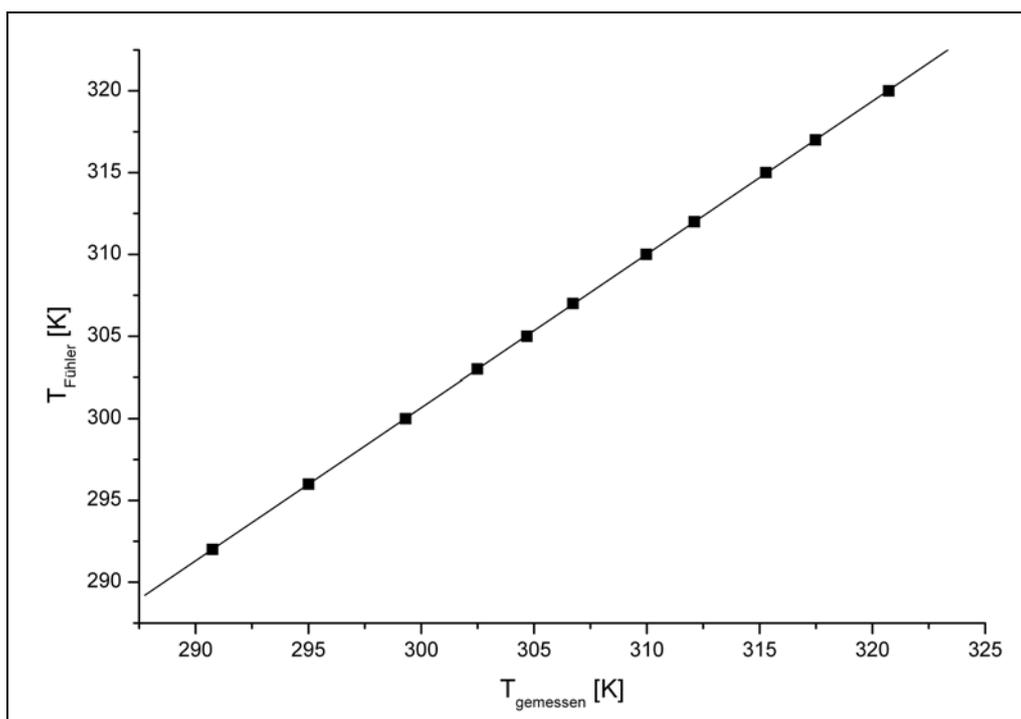


Abbildung 2.3.4.2-1: Temperaturkalibrierung mittels 1,2-Ethandiol

Die Regressionsdaten sind somit wie folgt festgelegt:

$$\text{Gleichung 2.3.4.2-2} \quad T_{\text{Fühler}} = 0,9354 \cdot T_{\text{gemessen}} + 20,0486$$

$$\text{Standardabweichung} \quad 0,0314$$

$$\text{Korrelationskoeffizient } R \quad 0,9999$$

Bei einer eingestellten Temperatur von 300 K liegt somit in der Probe eine reale Temperatur von 300,67 K vor.

Noch wichtiger als die Kenntnis der tatsächlichen Temperatur ist die Überprüfung der Temperaturkonstanz über die Messzeit. Zu diesem Zweck wurde jede Minute ein ^1H -Spektrum der 1,2-Ethandiolstandardprobe über eine Stunde aufgezeichnet und die Temperatur mittels Gleichung 2.3.4.2-1 berechnet. In Abbildung 2.3.4.2-2 ist der Temperaturverlauf graphisch dargestellt.

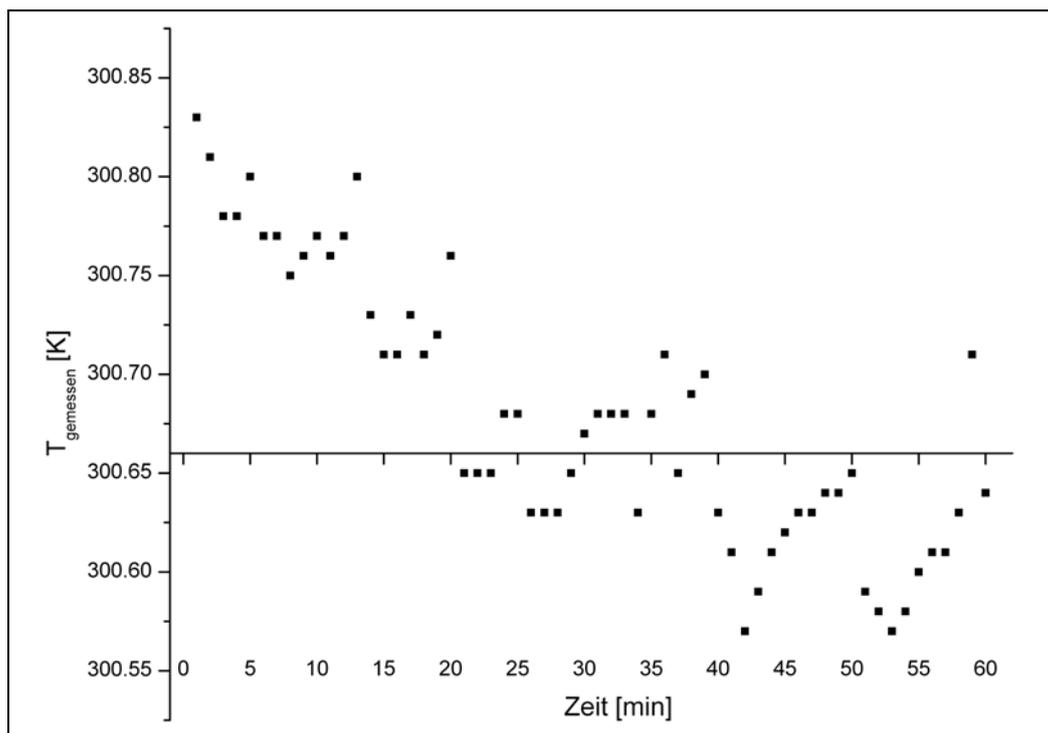


Abbildung 2.3.4.2-2: Überprüfung der Temperaturkonstanz mittels 1,2-Ethandiol (x-Achsenabschnitt ist auf die Solltemperatur von 300,67 K skaliert)

Die Temperaturmessungen liegen mit einem Mittelwert von 300,74 K und einer relativen Standardabweichung von 0,023% sehr nahe am eingestellten Messwert (300,67 K) und variieren in einem engen Bereich. In den ersten 20 Minuten zeigt das Heizersystem noch einen leichten Abwärtstrend. Da in dieser Zeit aber die Messung aufgesetzt und vorbereitet wird (Shimmen, Tunen, usw.), kann davon ausgegangen werden, dass während der eigentlichen Messung die Bestimmung der Diffusionskonstante nicht beeinflusst wird.

2.3.4.3. Parameteroptimierung

Wie im letzten Kapitel besprochen ist es möglich, bei der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten entweder die Gradientenstärke (g), die Diffusionszeit (Δ) oder die Gradientenlänge (δ) zu variieren. Um die Zeit während des Experimentes konstant zu halten, wird während der Diffusionsmessung nur die Gradientenstärke variiert, während die Werte der anderen beiden Parameter beibehalten werden. Dabei müssen die Werte für die Diffusionszeit und die Gradientenlänge sehr genau gewählt werden, um möglichst korrekte Ergebnisse zu erhalten. Um den passenden Wert für δ zu ermitteln, werden vor der eigentlichen Bestimmung der Diffusionskonstante bei $\Delta = 50$ ms zwei 1D-Spektren der STE-Diffusionssequenz mit 2%iger bzw. 95%iger Gradienten-

tenstärke aufgenommen. δ wird so angepasst, dass das Spektrum bei 95%iger Gradientenstärke ungefähr 5% an Rest-Signalintensität aufweist, verglichen mit dem Spektrum bei 2%iger Gradientenstärke. Als Beispiel wird in Abbildung 2.3.4.3-1 die Anpassung der Gradientenlänge dargestellt, bei der die Restintensität der Signale bei 95%iger Gradientenstärke bei $\delta = 4.2$ ms ungefähr 5% beträgt.

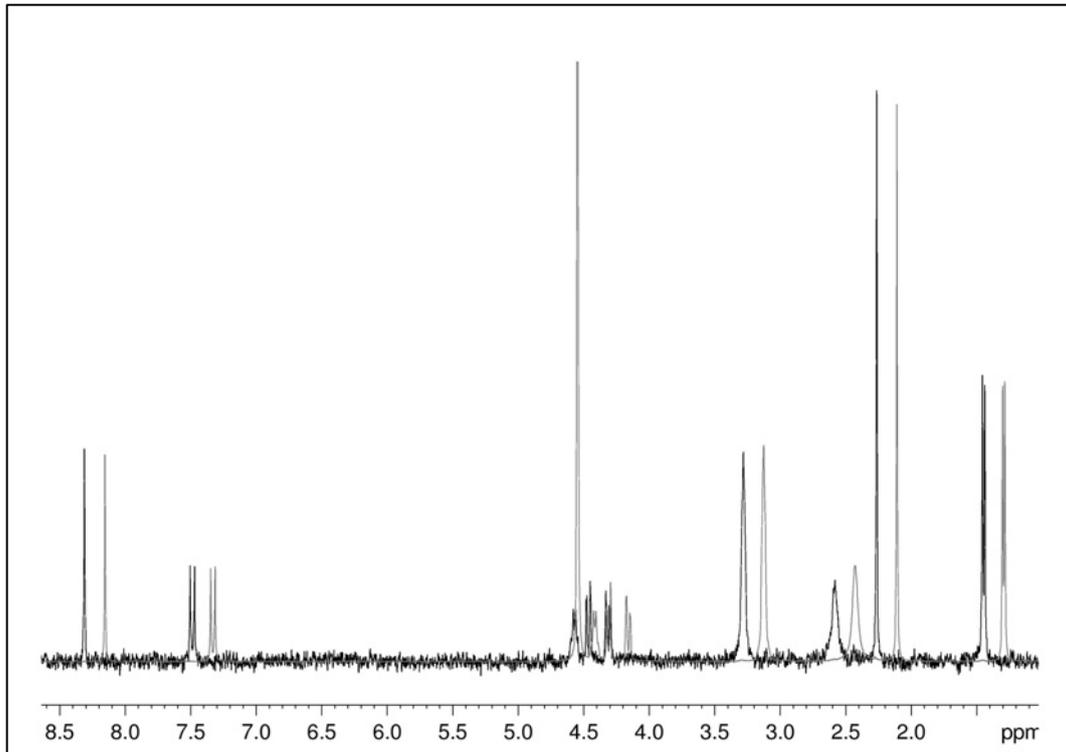


Abbildung 2.3.4.3-1: 1D-Diffusions-NMR-Spektren von Ofloxacin bei 2% (grau) und 95% Gradientenstärke (schwarz). Das Spektrum bei 2%iger Gradientenstärke wurde auf das 95%ige skaliert

2.3.5. K_D -Wert-Bestimmung von Gyrasehemmern an BSA mittels Diffusionsmessung

2.3.5.1. Nalidixinsäure

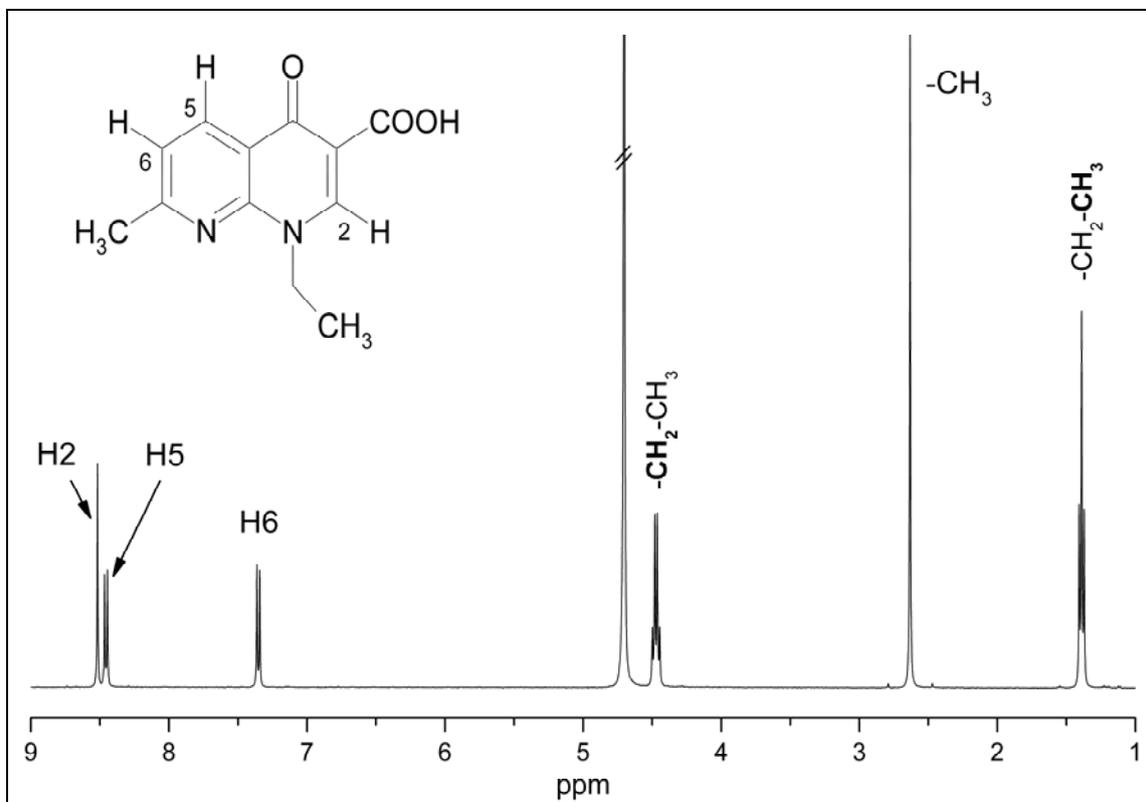


Abbildung 2.3.5.1-1: ^1H -NMR-Spektrum von Nalidixinsäure in D_2O

Tabelle 2.3.5.1-1: ^1H -NMR-Daten von Nalidixinsäure in D_2O referenziert auf den Restwasserpeak bei 4,75 ppm

Proton	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Integralwert
H2	8,36	s	-	0,865
H5	8,50	d	8,3 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]	0,895
H6	7,40	d	8,3 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]	0,916
$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	4,52	q	7,3 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]	2,131
$-\text{CH}_3$	2,68	s	-	2,853
$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	1,44	t	7,3 [$^3\text{J}(\text{H},\text{H})$]	3,000

Die folgenden Diffusionsmessungen wurden bei gleicher BSA-Konzentration (40 mg/ml) mit verschiedenen Antibiotikumkonzentrationen durchgeführt. Da das BSA-NMR-Spektrum breite Banden im Bereich zwischen 5 und 1 ppm zeigt, wurden für

die Bestimmung der Diffusionskonstante nur der Mittelwert der H2- und H5-Protonen verwendet, um eventuelle Störungen durch die BSA-Resonanzen zu vermeiden. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten wurden gegen das BSA/Antibiotikum-Verhältnis (c_p/c_L) aufgetragen und mittels Gleichung 2.3.3-3 gefittet.

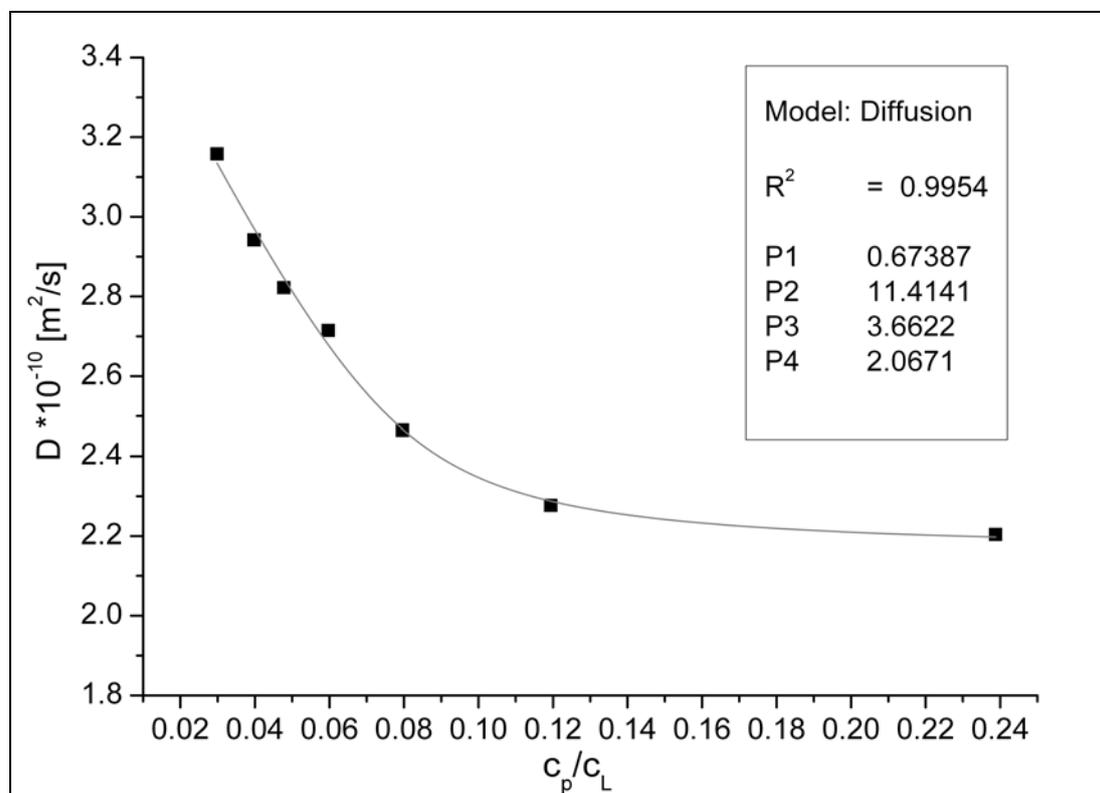


Abbildung 2.3.5.1-2: Plot der gemessenen Diffusionskoeffizienten als eine Funktion des Konzentrationsverhältnis BSA/Nalidixinsäure. $P1 = K_D/c_p$; $P2 = n$; $P3 = D_F$; $P4 = D_G$

Folgende Ergebnisse erhält man für die gefitteten Parameter:

K_D -Wert [mM]	Bindungsstellen n	D_F [$\cdot 10^{-10} m^2/s$]	D_G [$\cdot 10^{-10} m^2/s$]
0,40	11	3,66	2,07

Die Bestimmung der Diffusionskonstante reiner Nalidixinsäure in D_2O -PBS-Puffer ohne BSA ergab $4,125 \cdot 10^{-10} m^2/s$. Damit entspricht dieser experimentelle Wert von D_F annähernd dem extrapolierten D_F -Wert der Diffusionsmessungen (P3 in Abbildung 2.3.5.1-2) von $3,66 \cdot 10^{-10} m^2/s$. Diese Übereinstimmung ist ein deutlicher Hinweis auf Richtigkeit der Methode und der verwendeten Regressionsanalyse.

2.3.5.2. Ofloxacin

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Ofloxacin ist in Kapitel 2.2.5.4 dargestellt. Die Bestimmung des K_D -Werts und der anderen Parameter erfolgte analog zur Nalidixinsäure.

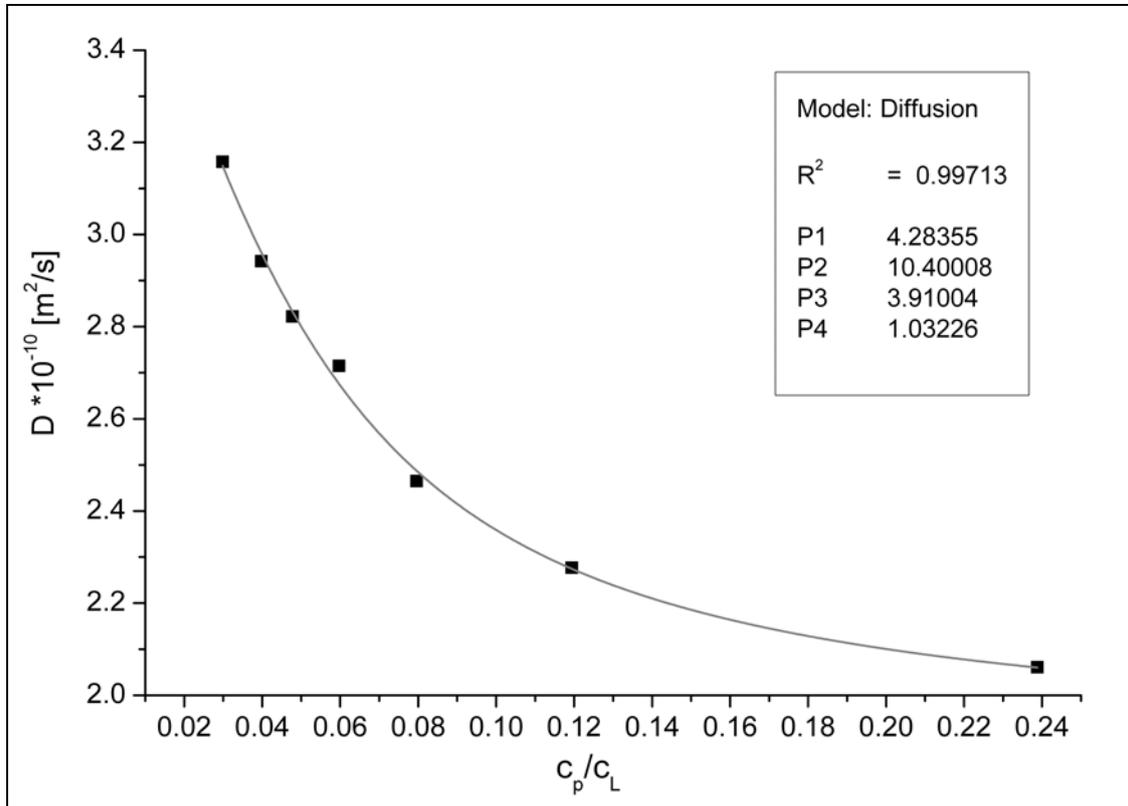


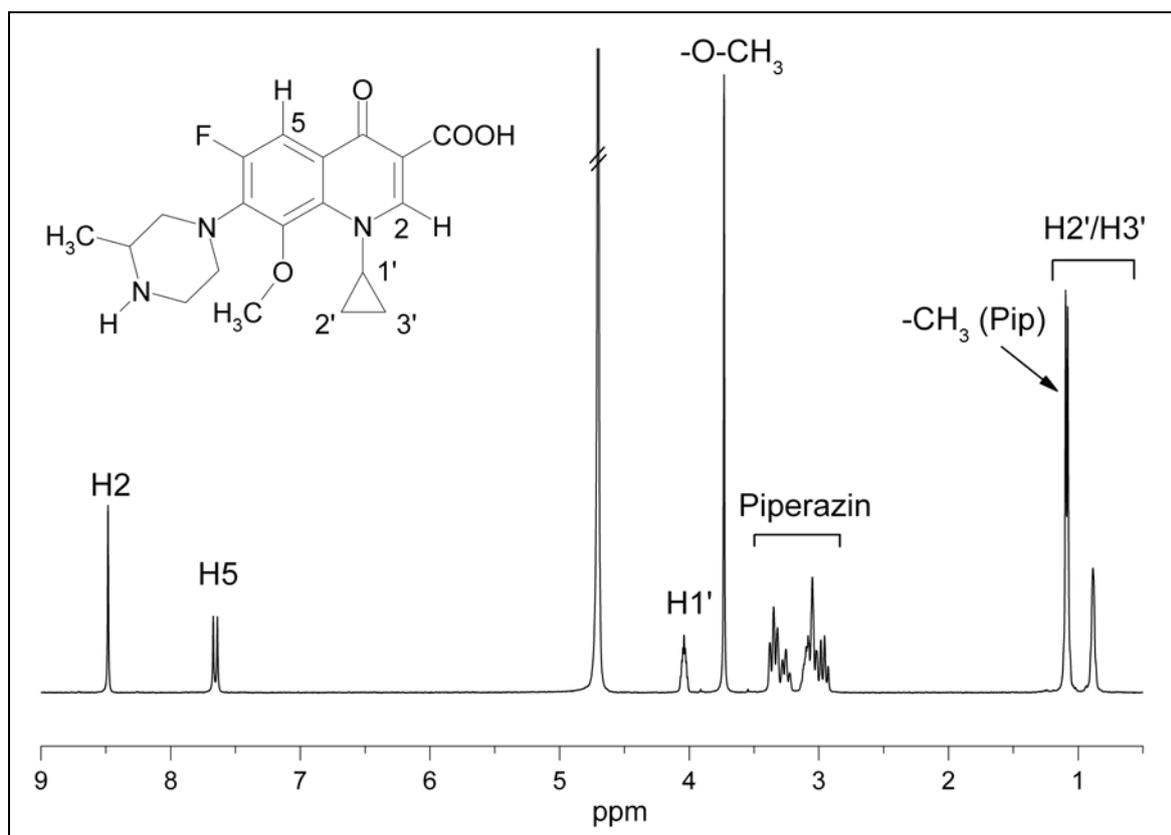
Abbildung 2.3.5.2-1: Plot der gemessenen Diffusionskoeffizienten als eine Funktion des Konzentrationsverhältnis BSA/Ofloxacin. $P1 = K_D/c_P$; $P2 = n$; $P3 = D_F$; $P4 = D_G$

Für Ofloxacin wurden folgende Ergebnisse aus den Diffusionsmessungen erhalten:

K_D -Wert [mM]	Bindungsstellen n	D_F [$\cdot 10^{-10}$ m 2 /s]	D_G [$\cdot 10^{-10}$ m 2 /s]
2,56	10	3,91	1,03

Auch hier zeigt das extrapolierte Ergebnis von D_F mit $3,91 \cdot 10^{-10}$ m 2 /s eine sehr gute Übereinstimmung mit der tatsächlich gemessenen Diffusionskonstante im freien Zustand ohne BSA ($4,066 \cdot 10^{-10}$ m 2 /s).

2.3.5.3. Gatifloxacin

Abbildung 2.3.5.3-1: ¹H-NMR-Spektrum von Gatifloxacin in D₂OTabelle 2.3.5.3-1: ¹H-NMR-Daten von Gatifloxacin in D₂O referenziert auf den Restwasserpeak bei 4,75 ppm

Proton	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplung [Hz]	Integralwert
H2	8,53	s	-	1,000
H5	7,70	d	12,8 [³ J(H,F)]	0,973
H1'	4,09	m	-	1,051
-O-CH ₃	3,78	s	-	3,091
Piperazin- Ring	3,49 - 2,93	m	-	7,306
-CH ₃ (Pip)	1,14	d	6,3 [³ J(H,H)]	
H2'/H3'	1,19 - 0,89	m	-	7,330

Die Bestimmung des K_D -Werts von Gatifloxacin gestaltete sich schwieriger als die der zuvor untersuchten Antibiotika, da sich die ermittelten Diffusionskonstanten in einem sehr engen Bereich bewegen.

Dabei reichen die Koeffizienten von $3,145 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ bei einer Antibiotikumkonzentration von 1,25 mM bis $3,271 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ bei 20 mM. Es ergibt sich folgende Darstellung:

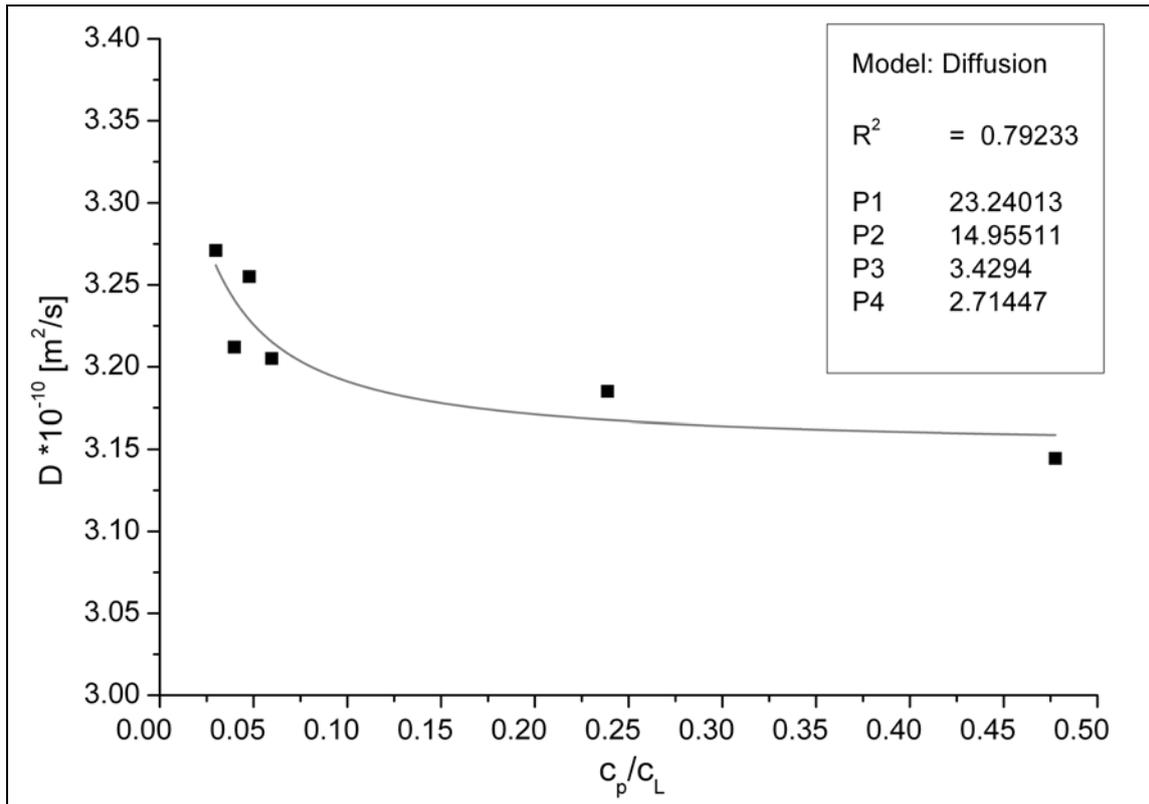


Abbildung 2.3.5.3-2: Darstellung der gemessenen Diffusionskoeffizienten als eine Funktion des Konzentrationsverhältnis BSA/Gatifloxacin. $P1 = K_D/c_P$; $P2 = n$; $P3 = D_F$; $P4 = D_G$

K_D -Wert [mM]	Bindungsstellen n	D_F [$\cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$]	D_G [$\cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$]
13,88	15	3,43	2,71

Die Schwierigkeit der genauen Aussage über den K_D -Wert lässt sich anhand des schlechten Regressionskoeffizienten ersehen. Es scheint dennoch erwiesen, dass Gatifloxacin mit einer geringen Proteinbindung (siehe Kapitel 2.3.8) auch den höchsten K_D -Wert besitzt.

2.3.6. K_D -Wert-Bestimmung von Gyrasehemmern an BSA mittels T_1 -Relaxationsmessung

2.3.6.1. Nalidixinsäure

Ersetzt man in Gleichung 2.3.3-3 die Diffusionskonstanten D_{obs} , D_F und D_B durch die entsprechenden Relaxationsdaten $R_{1,s}$, $R_{1,F}$ bzw. $R_{1,G}$ kann man hiermit ebenfalls den K_D -Wert bzw. die Anzahl der Bindungsstellen über diese Formel ermitteln.

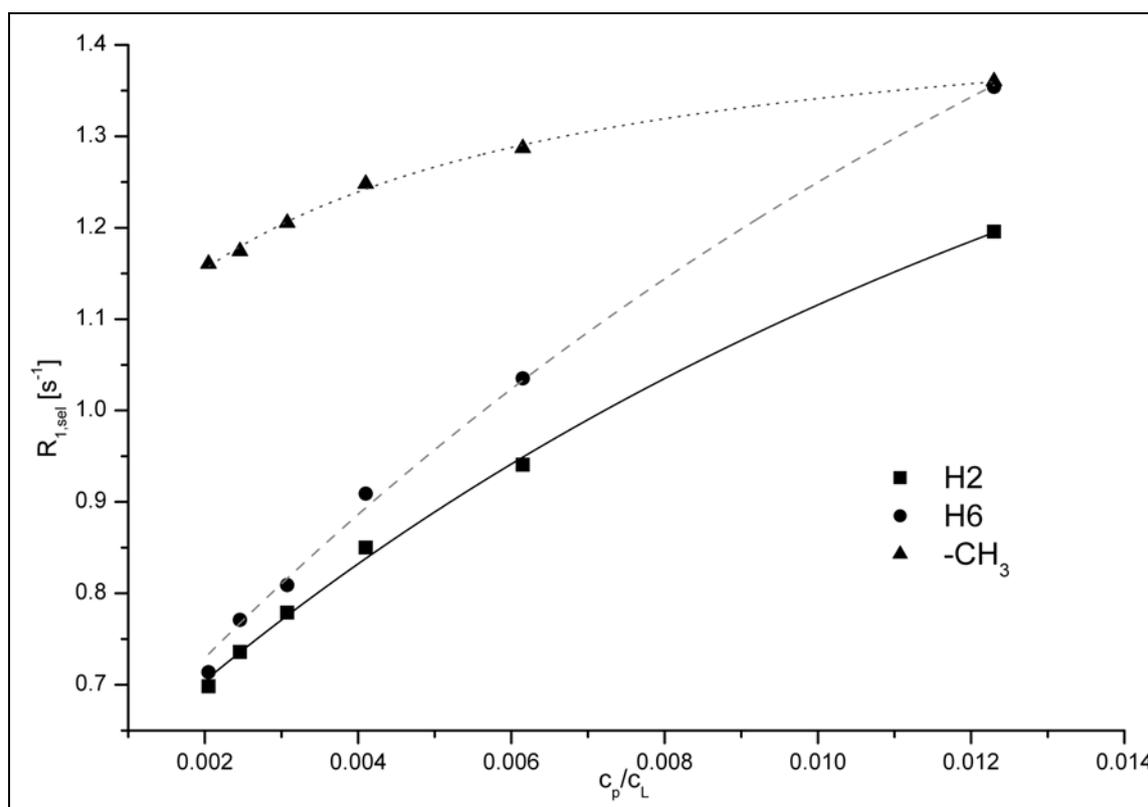


Abbildung 2.3.6.1-1: Darstellung der gemessenen Relaxationsraten von H2 und H6 gegen das Konzentrationsverhältnis c_p/c_L für das Nalidixinsäure/BSA-System.

Tabelle 2.3.6.1-1: Ergebnisse der Relaxationsmessungen von Nalidixinsäure mit BSA.

Proton	K_D -Wert [mM]	Bindungsstellen n	$R_{1,F}$ [s^{-1}]	$R_{1,G}$ [s^{-1}]
H2	0,99	15	0,551	6,800
H6	1,22	16	0,554	5,604
$-CH_3$	8,25	15	0,975	10,228

Es ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den untersuchten Resonanzen H2 und H6. Auch die Bestimmung der Anzahl der Bindungsstellen zeigt für

diese beiden Wasserstoffatome fast denselben Wert. Im Falle der Methylgruppe an Position 7 wurde ein höherer K_D -Wert ermittelt. Die Anzahl der Bindungsstellen liegt genau im Bereich von H2 und H6. Da bei den Relaxationsmessungen (im Gegensatz zu den Diffusionsmessungen) Mechanismen wie etwa Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Spin-Rotations-Wechselwirkungen, CSA, usw. für die Relaxation verantwortlich sind, die die verschiedenen Molekülgruppen unterschiedlich beeinflussen, kann es durch ungleiche Beweglichkeiten dieser Molekülgruppen zu Abweichungen im ermittelten K_D -Wert kommen (siehe Kapitel 1.2.5.2). Es muss daher sehr genau auf die richtige Auswahl der Protonen geachtet werden.

2.3.6.2. Ofloxacin

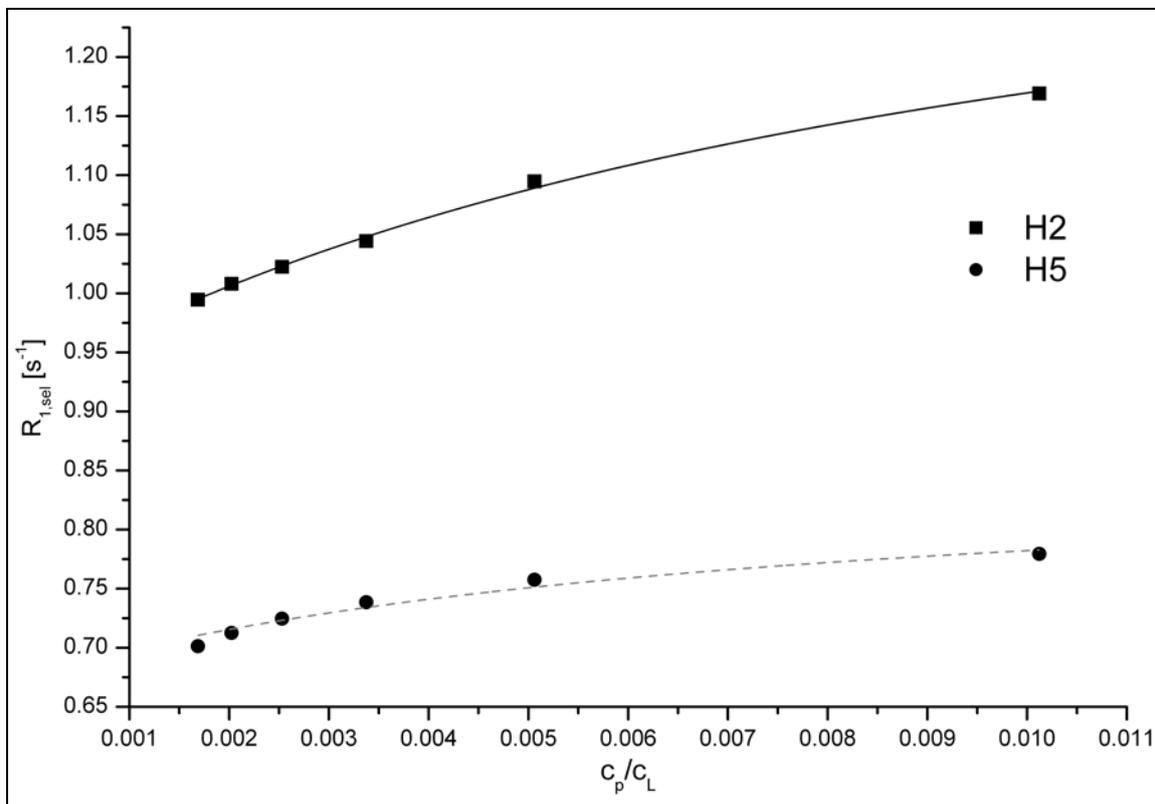


Abbildung 2.3.6.2-1: Darstellung der gemessenen Relaxationsraten von H2 und H5 gegen das Konzentrationsverhältnis c_p/c_L für das Ofloxacin/BSA-System.

Tabelle 2.3.6.2-1: Ergebnisse der Relaxationsmessungen von Ofloxacin mit BSA.

Proton	K_D -Wert [mM]	Bindungsstellen n	$R_{1,F}$ [s^{-1}]	$R_{1,G}$ [s^{-1}]
H2	2,65	13	0,926	4,376
H6	3,68	16	0,677	2,172

Bei der K_D -Bestimmung von Ofloxacin treten etwas größere Schwankungen zwischen den beiden untersuchten Protonen auf. Auch hier ist die Ursache in den oben beschriebenen Mechanismen zu suchen.

Die Relaxationsraten der Methylgruppe des Piperazinrings von Ofloxacin zeigt offensichtlich keine direkte Abhängigkeit zur Konzentration (siehe Tabelle 2.3.6.2-2) und ist daher in Abbildung 2.3.6.2-1 nicht aufgenommen. Auch mit diesen Relaxationsexperimenten konnte somit nachgewiesen werden, dass bei der Bindung an BSA die N-Methylgruppe nicht beteiligt ist.

Tabelle 2.3.6.2-2: Relaxationszeiten der N-Methylgruppe des Piperazinrings von Ofloxacin

Konzentration [mM]	3,04	6,08	9,11	12,15	15,18	18,22
$R_{1,sel}$ [s^{-1}]	2,630	2,512	2,592	2,520	2,545	2,596

2.3.6.3. Gatifloxacin

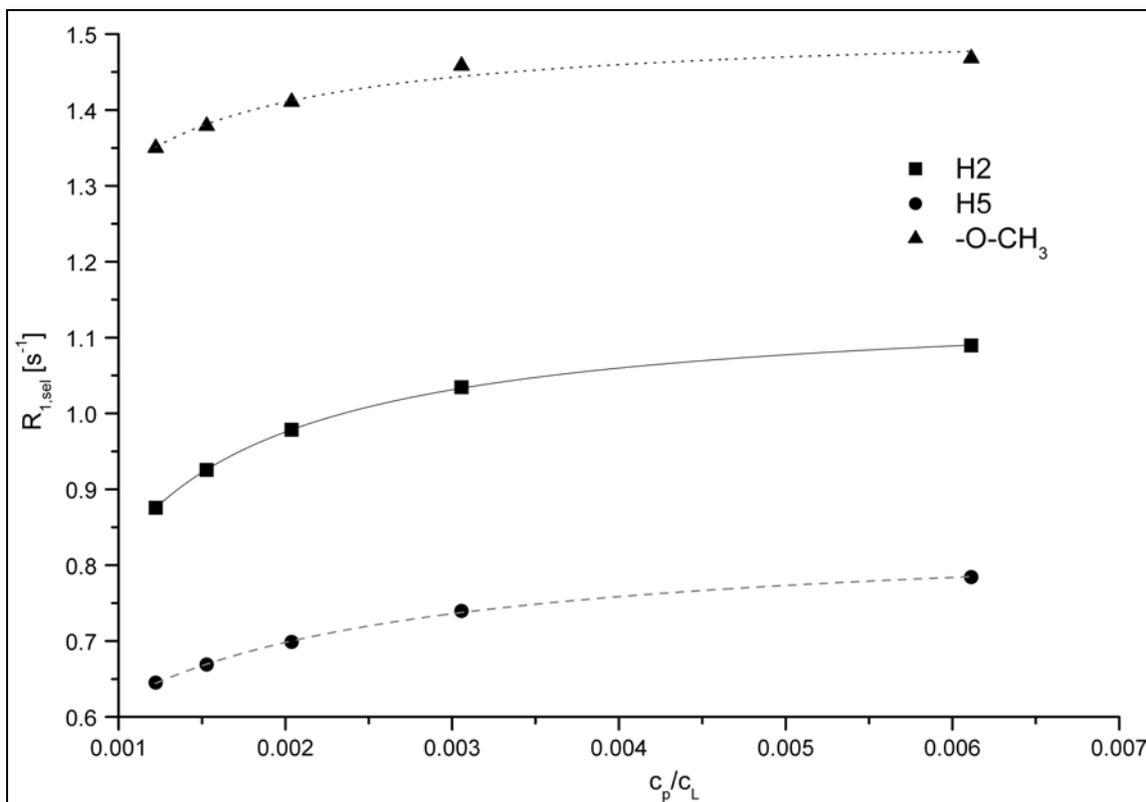


Abbildung 2.3.6.3-1: Darstellung der gemessenen Relaxationsraten von H2 und H5 gegen das Konzentrationsverhältnis c_p/c_L für das Gatifloxacin/BSA-System.

Tabelle 2.3.6.3-1: Ergebnisse der Relaxationsmessungen von Gatifloxacin mit BSA.

Proton	K_D -Wert [mM]	Bindungsstellen n	$R_{1,F}$ [s ⁻¹]	$R_{1,G}$ [s ⁻¹]
H2	204,92	441	-1,645	43,346
H5	29,03	67	0,386	7,282
-O-CH ₃	145,80	1315	-0,123	7,405

An den Ergebnissen von Gatifloxacin lässt sich ersehen, dass der K_D -Wert sehr schwach bindender Arzneistoffe nicht korrekt zu bestimmen ist. Ähnlich den in Kapitel 2.3.5.3 ermittelten Werten lassen die errechneten K_D -Werte und die Anzahl der Bindungsstellen nur Spekulationen über die tatsächliche Bindungsstärke zu. Gatifloxacin ist von den drei untersuchten Antibiotika das am schwächsten bindende und zeigt daher auch den höchsten K_D -Wert.

2.3.7. Bestimmung der „Affinitäts-Indices“

Die in Kapitel 2.2.3.1 gezeigte Gleichung 2.2.3.1-6 lässt sich auch in Abhängigkeit der Makromolekül-Konzentration $[M_0]$ ausdrücken. Wenn man annimmt, dass $[L] \gg [M_0]$ ist, gilt:

$$\text{Gleichung 2.3.7-1} \quad \Delta R_1 = \frac{K \cdot R_{1,G}}{1 + K[L]} \cdot [M_0]$$

wobei $\Delta R_1 = R_{1,s} - R_{1,F}$, K der thermodynamische Gleichgewichtskonstante, $R_{1,G}$ der Relaxationsrate im gebundenen Zustand und $[L]$ der Ligandkonzentration entspricht. Daher nimmt die Darstellung ΔR_1 versus $[M_0]$ eine Gerade durch den Ursprung mit folgender Steigung an:

$$\text{Gleichung 2.3.7-2} \quad [A]_L^T = \frac{K \cdot R_{1,G}}{1 + K[L]}$$

Diese Steigung wird als „Affinitätsindex“ $[l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ definiert.^[140,141] Dieser Index ist eine von der Temperatur- und Ligandkonzentration abhängige Größe. In vielen Studien wird dieser Affinitätsindex jedoch nur für ein Proton pro Molekül berechnet, in der Annahme, dass eine isotropische Bewegung für den Ligand vorliegt. Wie bereits gezeigt wurde, ist bei Relaxationsmessung die Auswahl des richtigen Protons von extremer Wichtigkeit. Bei unterschiedlicher Dynamik von Protonen ändert sich damit auch der Affinitätsindex. So kann ein Molekül für verschiedene Protonen unterschiedliche Affinitätsindices aufweisen.

Normalisiert man ΔR_1 zu

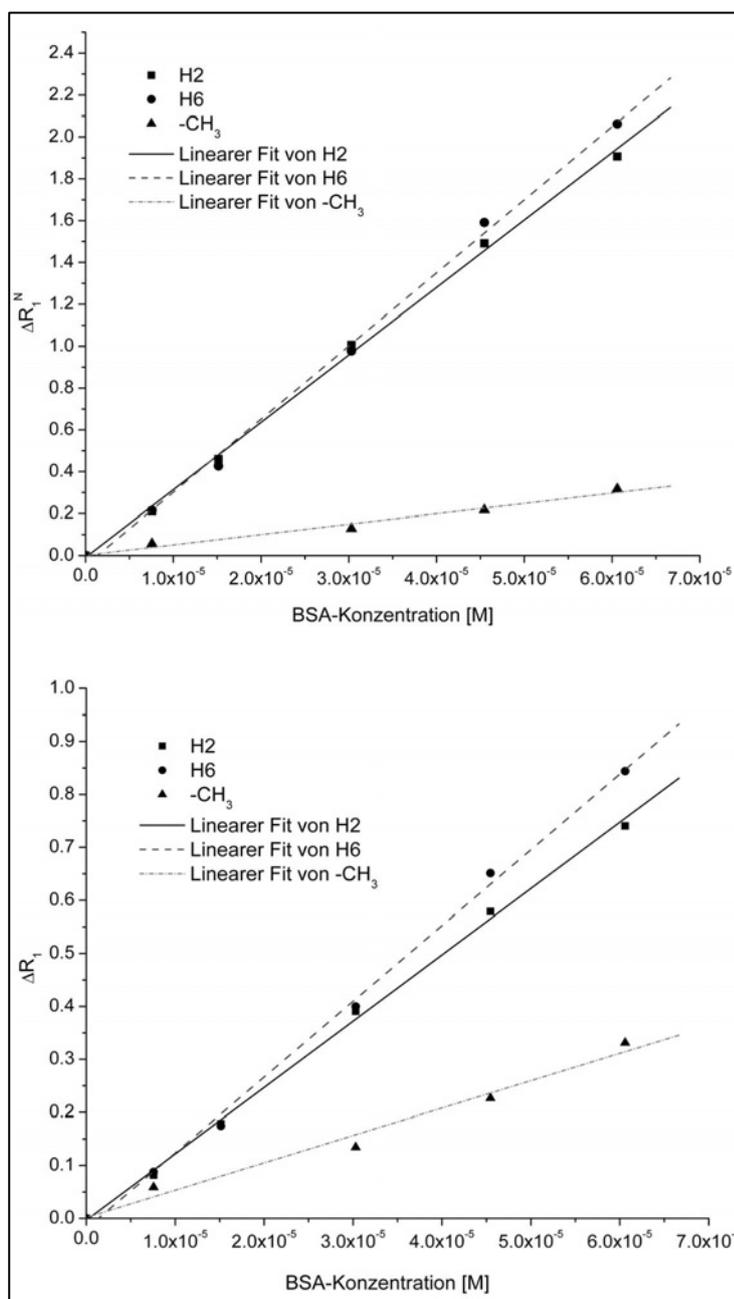
$$\text{Gleichung 2.3.7-3} \quad \Delta R_1^N = \frac{R_{1,s} - R_{1,F}}{R_{1,F}}$$

werden die angesprochenen Effekte der unterschiedlichen Korrelationszeiten und unterschiedlichen Protonendichten entfernt.

Dementsprechend gilt dann für die Steigung der normalisierten Geraden:

$$\text{Gleichung 2.3.7-4} \quad [A^N]_L^T = \frac{K \cdot R_{1,G}}{1 + K[L] \cdot R_{1,F}}$$

2.3.7.1. Nalidixinsäure



Proton	$[A^N]_L$ [l mol ⁻¹]
H2	32233,89
H6	34939,11
-CH ₃	4930,95

Proton	R
H2	0,9991
H6	0,9986
-CH ₃	0,9909

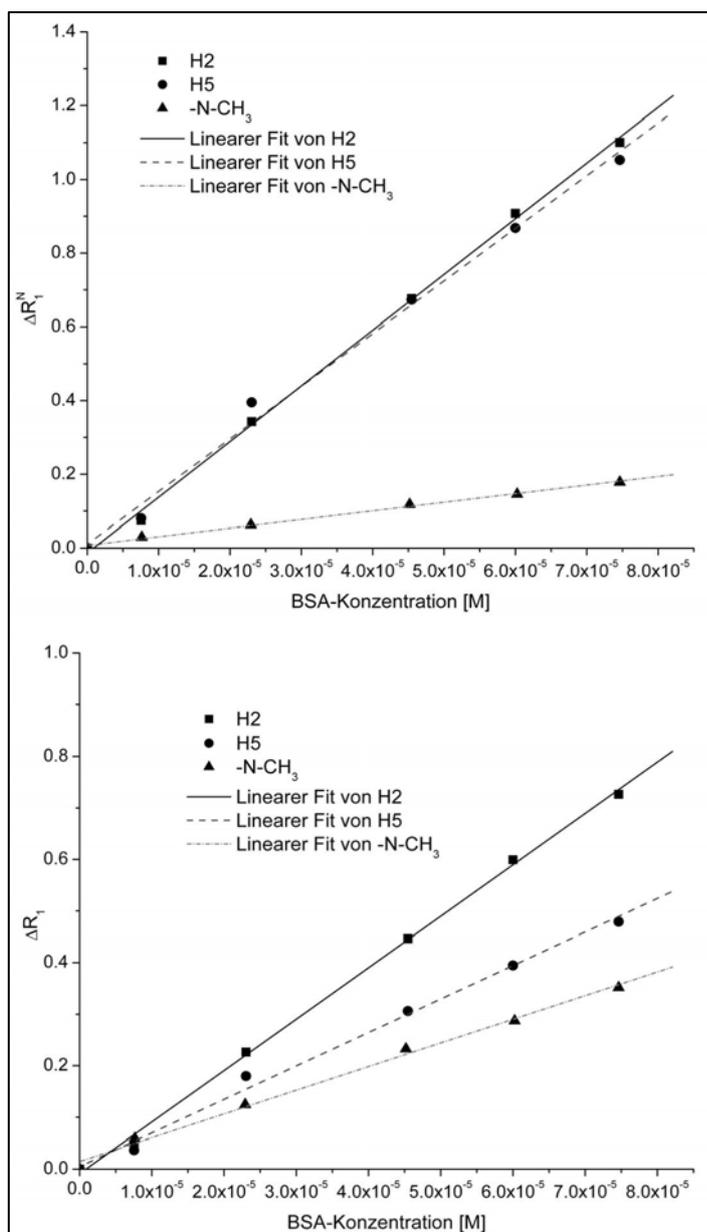
Proton	$[A]_L$ [l mol ⁻¹ s ⁻¹]
H2	12513,19
H6	14296,03
-CH ₃	5158,22

Proton	R
H2	0,9991
H6	0,9986
-CH ₃	0,9909

Abbildung 2.3.7.1-1: Darstellung der Regressionsanalyse (Nalidixinsäure) von ΔR_1^N gegen die BSA-Konzentration (oben) und von ΔR_1 gegen [M] (unten) mit den jeweiligen Affinitätsindices und Bestimmtheitsmaßen

Bei der Auswertung der normalisierten Indices zeigt sich deutlich, dass sich auch hier nur Protonen, die zum gleichen Strukturelement des Liganden gehören, anpassen lassen. Die Methylgruppe zeigt, verglichen mit den beiden Protonen am Chinolingerüst, eine sehr starke Abweichung.

2.3.7.2. Ofloxacin



Proton	$[A^N]_L^T$ [l mol^{-1}]
H2	15110,46
H5	14278,74
N-CH ₃	2327,87
Proton	R

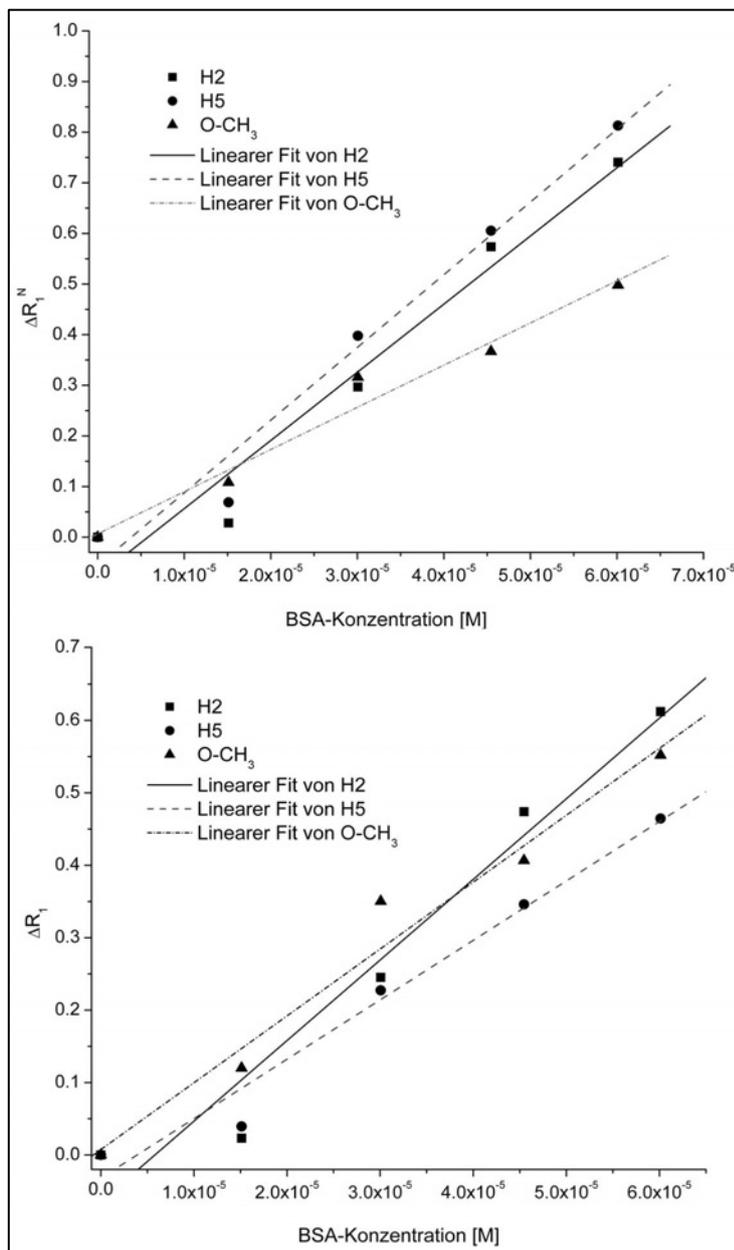
Proton	$[A]_L^T$ [$\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$]
H2	9973,96
H5	6493,26
N-CH ₃	4593,04
Proton	R

H2	0,9993
H5	0,9970
N-CH ₃	0,9975

Abbildung 2.3.7.2-1: Darstellung der Regressionsanalyse (Ofloxacin) von ΔR_1^N gegen die BSA-Konzentration (oben) und von ΔR_1 gegen $[M]$ (unten) mit den jeweiligen Affinitätsindices und Bestimmtheitsmaßen

Ofloxacin zeigt deutlich den Effekt der Normalisierung. Die unterschiedlichen Protonen zeigen mit dem herkömmlichen Affinitätsindex starke Differenzen. Selbst die Protonen des Chinolinrings variieren mit 9973 bzw. 6493 $\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ sehr stark. Nach der Normalisierung ist der Affinitätsindex dieser beiden Wasserstoffe annähernd gleich. Die Methylgruppe des Piperazinrings weicht wiederum sehr stark von den beiden anderen Protonen ab.

2.3.7.3. Gatifloxacin



Proton	$[A^N]_L^T$ [l mol^{-1}]
H2	13463,31
H5	14359,04
O-CH ₃	8328,79
Proton	R

Proton	R
H2	0,9786
H5	0,9872
O-CH ₃	0,9859

Proton	$[A]_L^T$ [l mol^{-1}]
H2	11126,76
H5	8205,18
O-CH ₃	9230,64

Abbildung 2.3.7.3-1: Darstellung der Regressionsanalyse (Gatifloxacin) von ΔR_1^N gegen die BSA-Konzentration (oben) und von ΔR_1 gegen $[M]$ (unten) mit den jeweiligen Affinitätsindices und Bestimmtheitsmaßen

Wie schon bei den Diffusionsmessungen und bei den Relaxationsmessungen mit Ligand ersichtlich wurde (siehe Kapitel 2.3.5.3 und 2.3.6.3), lässt sich die Bindungsstärke von Gatifloxacin nur sehr schwer korrekt bestimmen. Auch der Versuch der Bestimmung des Affinitätsindex zeigt diese Schwierigkeit. Es ergeben sich Regressionsgeraden mit schlechten Korrelationskoeffizienten. Aber auch hier

lassen sich durch die Normalisierung der Affinitätsindices die Geraden der Protonen H2 und H5 in ihrer Steigung angleichen. Ähnlich zu den bereits zuvor besprochenen Antibiotika weicht der normalisierte Affinitätsindex der Methoxy-Gruppe von den beiden anderen Wasserstoffatomen ab.

2.3.8. Zusammenfassung der Bindungsstudien an BSA

Um die Dissoziationskonstanten diverser Gyrasehemmer an BSA zu ermitteln, wurden ausführliche NMR-Diffusions- und Relaxationsmessungen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 2.3.8-1 zusammengefasst.

Tabelle 2.3.8-1: Vergleich der Ergebnisse der K_D -Wert-Bestimmung mittels Diffusionsmessung und Relaxationsmessung

	K_D -Wert mittels Diffusions-Messung	K_D -Wert mittels Relaxations-Messung	Literaturwert der Proteinbindung an BSA
Nalidixinsäure	0,40 mM (n=11)	1,11 mM (n=15)	86,0 % ^[142]
Ofloxacin	2,56 mM (n=10)	3,16 mM (n=14)	55,5 % ^[143]
Gatifloxacin	13,88 mM (n=15)	n. a.	~ 20 % ^[144]

n. a. = nicht auswertbar

Insgesamt zeigt sich eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den mittels Diffusionsmessungen und Relaxationsmessungen ermittelten Ergebnissen. Allerdings lässt sich festhalten, dass sich die Auswertung der Diffusionsmessungen wesentlich einfacher gestaltet, da hier keine Effekte unterschiedlicher Protonen zu berücksichtigen waren. Die Diffusionskonstante des Liganden ändert sich als Ganzes und ist nicht, wie die Relaxationszeiten, abhängig von der Molekülstruktur. Auch bei diesen Bindungsstudien ist bei der Wahl der Relaxationszeit als NMR-Parameter die korrekte Wahl des Wasserstoffatoms von entscheidender Bedeutung. Um Relaxations-Bindungsstudien durchführen zu können, müssen Protonen ausgewählt werden, die Teil eines Strukturelements sind, das direkt an der Bindung beteiligt ist.

Des Weiteren war zu beobachten, dass mit abnehmender Proteinbindung die K_D -Werte schwerer zu ermitteln waren.

Tabelle 2.3.8-2: Vergleich konventioneller Methoden zur Proteinbestimmung mit NMR-Spektroskopie

	Gleichgewichtsdialyse	Ultrafiltration	NMR-Spektroskopie
Bedingungen	nicht physiologisch	physiologisch	nicht physiologisch
Messdauer	~ 15 – 20 h zur Gleichgewichtseinstellung danach Bestimmung des freien Liganden per HPLC	~ 30 min Gleichgewichtseinstellung bis zur Filtration danach Bestimmung des freien Liganden per HPLC	Dauer einer Messung ~ 2 h
Messvorbereitung	lange Vorbereitungszeit	mittlere Vorbereitungszeit	kurze Vorbereitungszeit
Materialkosten	geringe Kosten	hohe Kosten (pro Versuch eine Kartusche nötig)	mittlere Kosten
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> ▪ geringe Probenmengen ▪ konstante Proteinkonzentration ▪ Messung im Gleichgewichtszustand ▪ robuste Methode 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ einfache Ausführung ▪ konstante Proteinkonzentration ▪ kein Verdünnungseffekt ▪ kurze Analysendauer 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ liefert wichtige Informationen über die Natur der Bindung ▪ Messung im Gleichgewicht
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Volumenverschiebung durch Osmose ▪ Adsorptionseffekte an der Membran ▪ sehr lange Versuchsdauer ▪ starke Fehlerstreuung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ keine Messung im Gleichgewicht ▪ Adsorptionseffekte an der Membran 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ hoher apparativer Aufwand ▪ meist Messung mehrerer Kerne an unterschiedlichen Strukturelementen notwendig

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante von Gatifloxacin (Proteinbindung < 20%) kann nur als grobe Abschätzung des wahren Wertes angesehen werden, da die NMR-Parameter (Relaxationszeiten und Diffusionskonstanten) in keiner direkter Abhängigkeit mehr zum Antibiotikum/BSA-Verhältnis stehen.

Im Vergleich zu etablierten Methoden zur Proteinbindung weist die NMR-Spektroskopie einige Vorteile, aber auch Nachteile auf. Als Beispiel werden in Tabelle 2.3.8-2 kurz die wichtigsten konventionellen Methoden (Gleichgewichtsdialyse und Ultrafiltration) mit der NMR-Spektroskopie verglichen.^[145,146,147] Der wichtigste Vorteil der NMR-Spektroskopie besteht darin, dass sich über die Messungen der Relaxationsrate nicht nur die Bindungseigenschaften berechnen lassen, sondern auch direkt das bindende Strukturelement des Liganden ermittelt werden kann.

Um reproduzierbarere und vergleichbare Ergebnisse aus den NMR-spektroskopischen Daten zu erhalten, wäre es sinnvoll, Mehrfachmessungen der einzelnen Protein-Ligand-Konzentrationsverhältnisse durchzuführen und die erhaltenen Ergebnisse mit orthogonalen Methoden (wie z. B. kontinuierlicher Ultrafiltration) zu vergleichen.

3. Zusammenfassung

In der modernen Arzneimittelforschung spielt die NMR-Spektroskopie eine herausragende Rolle, da es mit ihr möglich ist, die Natur eines Komplexes zwischen einem Makromolekül und einem Liganden besser verstehen zu können, von dem keine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden kann. Neben der eigentlichen Strukturklärung dieser Komplexe sind mittels NMR-Spektroskopie auch Bindungseigenschaften ermittelbar.

Komplexstrukturen können über NMR-Experimente aufgeklärt werden, die intermolekulare Wechselwirkungen über den Raum detektieren können. Meist kommen dabei NOE- bzw. ROE-Experimente und Weiterentwicklungen dieser Sequenzen zum Einsatz. Auch mit einfachen Versuchen, wie der Bestimmung der Veränderung der chemischen Verschiebungen bei Komplexbildung, lassen sich wertvolle Strukturinformationen gewinnen. Durch die Bindung eines Liganden an ein Makromolekül ändern sich viele NMR-spezifische Parameter des Liganden. Dazu gehören NMR-Relaxationszeiten und Diffusionskoeffizienten mit deren Hilfe sich Dissoziationskonstanten der Komplexe ermitteln lassen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Möglichkeiten der Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Makromolekül-Interaktionen mittels NMR-Spektroskopie. Drei unterschiedliche Fragestellungen wurden bearbeitet.

Einfluss von Harnstoff auf β -Cyclodextrin-Einschlusskomplexe mit Dipeptiden

Bei kapillarelektrophoretischen Enantiomerentrennungen von Dipeptiden mittels β -Cyclodextrin kommen häufig sehr hohe Konzentrationen an Harnstoff zum Einsatz, um die Wasserlöslichkeit des β -CD zu verbessern. Dabei wird die eventuelle Beteiligung des Harnstoffs am Komplex oftmals außer Acht gelassen. Durch den Einsatz unterschiedlichster Techniken konnte die Beteiligung des Harnstoffs an dem Komplex untersucht und aufgeklärt werden.

Kapillarelektrophoretische Trennungen zeigten einen mehr oder weniger deutlichen Einfluss des Harnstoffs auf den Einschluss der Enantiomere der Dipeptide Ala-Tyr und Ala-Phe in der β -CD-Kavität.

Durch die Untersuchungen der Änderungen in den chemischen Verschiebungen (CICS) der unterschiedlichen Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe bei unterschiedlichen pH-Werten in An- und Abwesenheit von Harnstoff zeigte sich, dass die CICS

der Enantiomere von Ala-Tyr mit Harnstoff größere Differenzen aufwiesen, als dies bei den Ala-Phe-Enantiomeren der Fall war.

ROESY-Messungen bestätigten diese CICS-Resultate. Durch Integration der betreffenden Kreuzsignale im ROESY-Experiment wurde deutlich, dass Ala-Tyr unter Einfluss von Harnstoff wesentlich tiefer in die β -CD-Kavität eintaucht als Ala-Phe. Beim Vergleich der diastereomeren Komplexe von Ala-Tyr mit β -CD zeigten sich deutliche Unterschiede in Anwesenheit von Harnstoff (das DD-Enantiomer taucht tiefer ein), wohingegen ohne Harnstoff die beiden Enantiomere fast identisch in der Kavität lokalisiert sind.

Zusätzlich wurden MD-Simulationen der Einschlussverbindungen durchgeführt, die auf eine deutliche Beteiligung von Harnstoff an der Komplexbildung hinwiesen. Ala-Tyr zeigte auch hier ein tieferes Eintauchen in die Kavität als Ala-Phe.

Da der einzige strukturelle Unterschied zwischen den beiden Dipeptiden die phenolische Hydroxygruppe des Tyrosins darstellt, ist wahrscheinlich, dass durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen diesem Strukturelement und Harnstoff die "tiefe" Lage von Ala-Tyr in der Kavität stabilisiert wird.

Relaxationsstudien von Fluorchinolonen mit *Micrococcus luteus*

Ziel dieser Versuchsreihe war es, anhand von longitudinalen und transversalen Relaxationsmessungen Einblick in das Bindungsverhalten von Fluorchinolonen (Gyrasehemmer) an Bakterienzellen zu erhalten. Mittels der Bestimmung von selektiven $^1\text{H-T}_1$ -Zeiten in Abhängigkeit des Antibiotikum/Bakterien-Verhältnisses konnten Dissoziationskonstanten der untersuchten Pharmaka an die Bakterienzelle ermittelt werden. Dies gelang mit Hilfe einer Variation des Lineweaver-Burk-Plots für jeweils drei Wasserstoffkerne der Fluorchinolone. Bei zweien handelte es sich um Wasserstoffatome des Chinolinrings, der dritte Wasserstoffkern ist Teil des Piperazinrings (bei Fleroxacin und Ofloxacin) bzw. eines Diazabicyclo[4.3.0]nonan-Rings im Falle von Moxifloxacin. Alle untersuchten Fluorchinolone binden nur mit dem Chinolinring an das Bakterium. Andere Strukturteile sind bei der Ausbildung des Komplexes nicht beteiligt. Moxifloxacin, als Vertreter der 3. Fluorchinolon-Generation, zeigte in den Messungen den kleinsten K_D -Wert und damit die stärkste Bindung an die Zelle.

Des Weiteren wurden Spin-Spin-Relaxationsstudien der ^{19}F -Kerne von Fleroxacin durchgeführt, um die ^1H -Relaxationsmessungen zu bestätigen. ^{19}F -NMR-Spektro-

skopie erwies sich als sehr effektive Methode, da die Messung dieses Kerns keine störenden Signale der Bakterienzellen und des Restwassers zeigt. Auch mit diesen Experimenten konnte die Bindung des Fluorchinolongerüsts an Makromoleküle der Bakterienzelle nachgewiesen werden.

Proteinbindungsstudien von Gyrasehemmern an BSA

Durch die Bindung von Fluorchinolonen an bovines Serumalbumin ändern sich die scheinbare Molekülmasse und der hydrodynamische Radius des Arzneistoffs stark. Durch selektive T_1 -Relaxationsmessungen konnten für drei Gyrasehemmer mit unterschiedlichen Proteinbindungseigenschaften die jeweiligen Dissoziationskonstanten an das Albumin ermittelt werden. Analog zu den Literaturwerten der prozentualen Proteinbindung zeigte Nalidixinsäure den kleinsten, Ofloxacin einen mittleren und Gatifloxacin den größten K_D -Wert. Es wurde jedoch deutlich, dass sich der K_D -Wert von Arzneistoffen mit einer niedrigen Proteinbindung mit dieser Methode nur schwer bestimmen lässt.

Die Dissoziationskonstanten für alle untersuchten Fluorchinolone ließen sich ebenso anhand von NMR-Diffusionsmessungen bestimmen. Die Diffusionskoeffizienten waren im Vergleich zu den Relaxationsmessungen wesentlich schneller und unproblematischer zu bestimmen, da die Auswertung aller Kerne eines Moleküls die gleiche Diffusionskonstante liefert und dementsprechend hier nicht auf die Auswahl des richtigen Wasserstoffkerns geachtet werden muss. Über die Ermittlung sogenannter „Affinitätsindices“ war es möglich, die Stärke der Proteinbindung zu charakterisieren. Um den Effekt unterschiedlicher Korrelationszeiten verschiedener Kerne auszumitteln, wurde eine Normalisierung dieser Indices durchgeführt. Auch die Werte dieser Affinitätsindices gaben die Stärke der Proteinbindung der unterschiedlichen Antibiotika sehr gut wider.

4. Summary

NMR-spectroscopy plays a decisive role in modern drug research capable of characterizing complexes whose X-ray analysis is not feasible. Beside the determination of the molecular complex structures, NMR-spectroscopy is able to provide information on their binding mode.

The structure of a complex can be clarified by NMR-experiments, which detect intermolecular interactions through space e.g. NOE- and ROE-experiments or further developments of these techniques. Beside these, the determination of the chemical shifts provides useful structural informations. Upon binding to a macromolecule, several NMR-parameters of a small ligand change dramatically. This includes parameters such as different NMR-relaxation times and diffusion coefficients which can be used to determine dissociation constants.

The present thesis deals with the possibility of identification and characterization of complexes by NMR-spectroscopy. Three different problems were investigated.

Influence of urea to β -cyclodextrin inclusion complexes with dipeptides

Due to the limited aqueous solubility of β -CD, enantioseparations utilizing β -CD as chiral selector are often performed in buffers containing high concentrations of urea. Therefore, the involvement of urea in the constitution of the complex should be kept in mind. In this project the influence of urea was investigated and elucidated by using different techniques.

Urea showed a more or less strong effect upon the separation of the enantiomers of Ala-Tyr and Ala-Phe by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis.

Determining the changes in the complexation induced chemical shifts (CICS) of the enantiomers of Ala-Tyr and Ala-Phe at different pH values in presence and absence of urea revealed the CICS of the Ala-Tyr enantiomers to exhibit greater discrepancies than the CICS of the Ala-Phe enantiomers.

ROESY-experiments confirmed the CICS results. By means of integration of the respective cross-peaks ROE-spectroscopy revealed the deeper penetration of Ala-Tyr in presence of urea compared to Ala-Phe. Comparing the diastereomeric complexes of Ala-Tyr with β -CD, the DD-enantiomer is located deeper in the cavity than the LL-enantiomer in presence of urea. Without urea, both enantiomers showed almost the same integration pattern assuming the identical position of both enantiomers in the cavity.

Additionally, MD simulations of the inclusion structures were performed. They clearly showed the influence of urea since the simulations also displayed the deeper penetration of Ala-Tyr than Ala-Phe.

Since the only structural difference between the two dipeptides is the phenolic hydroxyl group of the tyrosine, the formation of hydrogen bonds between this component and urea seems to stabilize the “deeper” position of Ala-Tyr in the cavity.

Relaxation studies of fluoroquinolones with *Micrococcus luteus*

The main goal of this investigation was to get an insight in the binding behaviour of fluoroquinolones to a bacterial cell by performing longitudinal and transversal relaxation experiments. Using the determination of selective ^1H - T_1 -relaxation times in dependence of varying the antibiotic/bacteria-relation, dissociation constants of the antibiotic to bacterial cells could be identified. By employing a variation of a Lineweaver-Burk-plot, the K_D of three different hydrogen nuclei could be evaluated. Two of the hydrogens belong to the quinolone moiety; the third nucleus is part of the piperazine-ring (in case of fleroxacin and ofloxacin) and of the diazabicyclo[4.3.0]nonan-ring of moxifloxacin, respectively. All investigated antibiotics only interact via the quinolone-ring to the bacterial cell. Other structural elements are not involved in the complex. Moxifloxacin as a representative of the 3rd generation of the quinolones exhibited the smallest K_D -value and for this the highest binding to the bacteria.

Furthermore, spin-spin-relaxation studies of ^{19}F of fleroxacin were performed to establish another method which could confirm the ^1H -relaxation experiments. ^{19}F -NMR-spectroscopy proved to be a very effective method since no resonances of bacteria and the residual solvent peak are present in the spectra. These experiments could also verify the binding of the quinolone-moiety to macromolecules of the bacterial cell.

Protein binding studies of fluoroquinolones to BSA

By binding of the fluoroquinolones to bovine serum albumin the apparent molecular mass and the hydrodynamic radius of the ligand strongly change. In this project dissociation constants of three different fluoroquinolones with different binding characteristics were determined by measuring selective relaxation rates. According to the data in literature of protein binding, nalidixic acid offered the smallest K_D -value, gati-

floxacin the highest and the dissociation constant of ofloxacin were found to be between both. However, it was obvious that antibiotics with a very low protein binding were hard to analyze with this method because of the small differences of the relaxation rates.

Another possibility to assess dissociation constants of fluoroquinolons was the determination of the antibiotics diffusion constants at different concentration levels. Diffusion experiments were faster and easier to handle than relaxation experiments because all nuclei of the ligand yield the same diffusion constant and according to this the selection of correct hydrogen nuclei is not needed. The determination of the so called "affinity indices" offered a further possibility to evaluate the degree of protein binding. To eliminate the effect of different correlation times of different nuclei, a normalization of the affinity indices was performed. The fitted affinity indices also reflect the protein binding of the antibiotics properly.

5. Experimenteller Teil

5.1. β -Cyclodextrin-Einschlusskomplexe

5.1.1. Geräte

Spektrometer

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Bruker Avance 400	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	^1H -Frequenz: 400,13 MHz ^{13}C -Frequenz: 100,61 MHz <u>Messköpfe:</u> 5 mm BBI
Bruker DMX 600	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	^1H -Frequenz: 600,13 MHz. <u>Messköpfe:</u> 5 mm PABBO BB

Software

XWIN-NMR 3.5	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	Visualisiert wurden die Spektren mit dem im Programmpaket enthaltenen XWINPLOT
Windows NT	Microsoft, Unterschleißheim, D	Betriebssystem

Sonstige Geräte

NMR-Röhrchen 5 mm Econmic NMR-Röhrchen Professional	Schott, Mainz, D	Für Standard ^1H -Messungen
NMR-Röhrchen 5 mm 527-PP Coaxial Insert –Röhrchen 5 mm	Wilmad, Buena, NJ, USA	Für CICS-Messungen
Gefriertrocknungsanlage Alpha II-12	Christ, Osterode am Harz, D	Verwendete Vakuumpumpe: Vacuumbrand RZ5

Sonstige Geräte

Waage Kern 770-60	Kern, Balingen- Frommern, D	
pH-Meter PHM220	Radiometer Copen- hagen, Lyon, F	Verwendete Elektrode: pHC3359 (Radiometer)
Research Mikroliterpipetten	Eppendorf, Ham- burg, D	In 100 µl, 1000 µl und 5000 µl.

5.1.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit / Anmerkung	
<ul style="list-style-type: none"> • D-Ala-D-Phe x H₂O • L-Ala-L-Phe x 0.5 H₂O • L-Ala-L-Tyr x 3 H₂O 	} Bachem, Weil am Rhein, D	<ul style="list-style-type: none"> • >99% • 96,3% • 82% 	
<ul style="list-style-type: none"> • D-Ala-D-Tyr 		Arbeitsgruppe Scriba	Hergestellt aus N-Benzyloxy- carbonyl-geschütztem D-Ala- nin-N-Hydroxysuccinimid mit D-Tyrosin. ^[148]
Maleinsäure		Aldrich, Steinheim, D	≥ 99%
Harnstoff p.a.	Merck, Darmstadt, D	≥ 99%	
Natriumhydrogenphosphat	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%	
Phosphorsäure 10%	Institutsversorgung	-	
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Euriso-Top, Gif-Sur- Yvette, F	99,9%	

5.1.3. Probenvorbereitung und Messparameter

5.1.3.1. CICS-Messungen „zgpr“-Pulssequenz

Probenvorbereitung: Es wurde eine Lösung, die jeweils 265 µl einer 12 mM Dipeptid- und 12 mM β-Cyclodextrin-Lösung enthielt, in einem Phosphatpuffer (50 mM) hergestellt. Der Puffer wurde zuvor mit 10% Phosphorsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Bei Messungen mit Harnstoff enthielt der Puffer zusätzlich 0,681 M Harnstoff. Diese Lösung wurde in einem Koaxial-Röhrchen gemessen, in dessen Innenröhrchen eine 50 mM Maleinsäure-Standard-Lösung verwendet wurde.

Messparameter

Aquisition (Pulssequenz: „zgpr“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	48k
Anzahl der Scans (ns)	128
Dummy Scans (ds)	4
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	10,013 ppm / 4006,41 Hz.
Digitale Auflösung	0,163 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	6,134 s
Offset (O1)	auf dem Wassersignal
90°-Pulslänge (p1)	9,55 µs
Pulsleistung (pl1)	-2,6 dB
Presat.-Pulsleistung (pl19)	60 dB

Prozessierung

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	32k
Fensterfunktion (WDW)	keine
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

5.1.3.2. ROESY-Messungen „roesyph“-Pulssequenz

Die Zusammensetzung der Analysenlösung entsprach den Lösungen von 5.1.3.1. Jeweils 2 ml von Dipeptid-Lösung und β -CD-Lösung wurden gefriergetrocknet und der Rückstand wieder in 4 ml D₂O aufgenommen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt.

Messparameter

Aquisition F2 (Pulssequenz: „roesyph“) gemessen auf Bruker DMX 600

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	8k
Anzahl der Scans (ns)	112
Dummy Scans (ds)	64
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	8,14 ppm / 4882,81 Hz.
Digitale Auflösung	0,596 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	0,839 s
Offset (O1)	4,166 ppm
90°-Pulslänge (p1)	10,0 μ s
90°-Pulsleistung (pl1)	-5,75 dB
„Mixing Time“ (p15)	300 ms
ROESY-spinlock-Leistung (pl11)	14,5 dB

Aquisition F1

Parameter	Wert
Datenpunkte	512
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	8,14 ppm / 4882,81 Hz.
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

Prozessierung F2

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	4k
Fensterfunktion (WDW)	QSINE
Verschiebung der Fensterfunktion (SSB)	2 (=90°)

Prozessierung F1

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	2k
Fensterfunktion (WDW)	QSINE
Verschiebung der Fensterfunktion (SSB)	2 (=90°)

5.1.3.3. MD-Simulationen

Siehe Kapitel 2.1.7

5.2. Relaxationsstudien von Fluorchinolonen mit *Micrococcus luteus*

5.2.1. Geräte

Spektrometer

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Bruker Avance 400	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	¹ H-Frequenz: 400,13 MHz ¹³ C-Frequenz: 100,61 MHz ¹⁹ F-Frequenz: 376,43 MHz <u>Messköpfe:</u> 5 mm BBO, sel. ¹⁹ F- Probenkopf

Software

XWIN-NMR 3.5	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	Visualisiert wurden die Spektren mit dem im Pro- grammpaket enthaltenen XWINPLOT
Windows NT	Microsoft, Unter- schleißheim, D	Betriebssystem
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Unter- schleißheim, D	Erstellen der Lineweaver- Burk-Plots
Origin 7.5	OriginLab, Northampton, USA	Als Add-In wurde ONMR verwendet

Sonstige Geräte

NMR-Röhrchen 5 mm Professional	Schott, Mainz, D	Für alle Relaxations- und Diffusionsmessungen
--------------------------------	------------------	--

Waage Kern 770-60	Kern, Balingen- Frommern, D	
Brutschrank	Heraeus, Hanau, D	
Fluoreszenz-Spektrometer	Varian, Darmstadt, D	Ausgestattet mit einem Microplate-Reader
Zentrifuge	Hettich, Kirchlen- gern, D	EBA 12
Agarplatten	Oxoid, Wesel, D	Mueller-Hinton-Agar: Fleischinfus 2,0 g/L Caseinhydrolysat 17,5 g/L AgarAgar 13,0 g/L
Research Mikroliterpipetten	Eppendorf, Ham- burg, D	In 100 µl, 1000 µl und 5000 µl.

5.2.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit / Anmerkung
Fleroxacin	Hoffmann-La Roche, Basel, CH	99,5 %
Ofloxacin	Hoechst, Frankfurt a. M., D	≥ 99%
Moxifloxacin	Bayer, Leverkusen, D	≥ 99%
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Euriso-Top, Gif-Sur- Yvette, F	99,9%
NaOD 30%ig in D ₂ O	Deutero, Kasellaun, D	99,5%
Natriumhydrogenphosphat	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%

5.2.3. Bakterienproben

5.2.3.1. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller	Anmerkung
<i>Micrococcus luteus</i>	DSMZ, Braunschweig, D	DSM Nr.: 20030 Vakuum getrocknet

Der Bakterienstamm wurde auf Mueller-Hinton-Agarplatten bei 37°C kultiviert und einmal wöchentlich überimpft. Die benötigte Bakterienmasse wurde nach 36 h direkt von der Platte zur Probenvorbereitung entnommen.

5.2.3.2. Bestimmung des Lebend/Tot-Verhältnis der Bakterien

Marker	Hersteller	Anmerkung
LIVE/DEAD <i>BacLight</i> Bacterial viability kit (L-7012)	Molecular Probes, MobiTec, Göttingen, D	Bestehend aus: SYTO9 und Propidiumiodid

Um das Lebend/Tot-Verhältnis zu bestimmen, wurden Zellproben mit genau eingestelltem Verhältnis von lebenden zu toten Bakterien angefertigt. Dazu wurde durch Suspension in 70%igem Isopropanol ein Zelllysate hergestellt, das nach 1 Stunde aus 100% toten Zellen bestand. Bei der 100% lebend Zellsuspension handelte es sich um frisch von der Platte entnommen und zweimal mit Wasser gewaschene Zellen. Aus diesen beiden Suspensionen wurden 4 verschiedene Lebend/Tot-Verhältnisse hergestellt (0, 50, 75 und 100%) und auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,25 eingestellt. Zu 200 µl der Bakteriensuspension wurden jeweils 1 µl SYTO 9 (0,33 mM) und 1 µl Propidium-iodid (2 mM) zugegeben und 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm bei 520 nm (grün) und 630 nm (rot) gemessen. Das Verhältnis Grün/Rot wurde in Beziehung zum Lebend/Tot-Anteil der Bakterienzellen gesetzt und eine Kalibriergerade erstellt, mit deren Hilfe der Anteil an noch lebenden Bakterien vor der eigentlichen NMR-Messung bestimmt werden konnte.

5.2.3.3. Probenvorbereitung der Bakterienzellsuspension für die Relaxationsmessung

50,0 mg Bakterienmasse wurden direkt von der Agar-Platte geerntet und in 1 ml eines D₂O-PBS-Puffer suspendiert.

Zusammensetzung des PBS-Puffers:

Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	3,208 g/l
NaH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	0,637 g/l
NaCl	5,844 g/l

Die Salze wurden in D₂O gelöst und gegebenenfalls mit 30%iger NaOD auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde für 30 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die Bakteriensuspension wurde bei 3200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und das Bakterienpellet wieder in 1 ml des D₂O-PBS-Puffers aufgenommen. Dieser Vorgang

wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in der benötigten Menge Puffer aufgenommen und die entsprechende Konzentration an Antibiotikum-Lösung zugegeben, sodass eine Analysenlösung von 1 ml entstand.

Für die Antibiotikum-Lösung wurde in allen Versuchen eine 50 mM-Stammlösung des zu untersuchenden Antibiotikums hergestellt. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Fluorchinolone in D₂O wurden 1 ml der Stammlösung 10 µl 30%ige NaOD-Lösung zugefügt. Die hergestellte Analysenlösung wurde 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend direkt vermessen.

5.2.4. NMR-Relaxationsmessungen

Die Messungen wurden alle bei einer Temperatur von 310,2 K aufgenommen. Um die Temperaturkonstanz während der Messung zu gewährleisten, wurde der Heizgasfluss auf 535 l/h reguliert.

5.2.4.1. Selektive ¹H T₁-Relaxationsmessungen

Messparameter

Aquisition („selt1ir.dp“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	32k
Anzahl der Scans (ns)	8 oder 16
Dummy Scans (ds)	2
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	20,689 ppm / 8278,146 Hz.
Digitale Auflösung	0,252 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	1,979 s
Offset (O1)	auf dem zu untersuchenden Signal
90°-Pulslänge (p1)	9.00 µs
Pulsleistung (pl1)	-2 dB
Gaus 1.1000-Pulslänge (p12)	47,0 ms

Parameter	Wert
Gaus 1.1000-Pulsleistung (sp2)	kalibriert (59,5-60,1 dB)*
vd-Liste (10 vd-Zeiten)	10 ms, 100 ms, 250 ms, 500 ms, 1 s, 2s, 3 s, 6 s, 10 s, 15 s

* = Die Pulsleistung des selektiven 180°-Pulses (sp2) wurde vor jedem Versuch auf den Nulldurchgang kalibriert.

Prozessierung (Spektren)

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	64k
Fensterfunktion (WDW)	EM
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

Analyse („edt1“)

Parameter	Wert
Fitting-Typ	Signalintensität („intensity“)
Drift	1000
Funktionsstyp	t1/t2 („ct1“)
Anzahl der Terme	3
Anzahl Komponenten	1

5.2.4.2. ¹⁹F-Standard-NMR-Messungen

Messparameter

Aquisition („zg“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	256k
Anzahl der Scans (ns)	16

Parameter	Wert
Dummy Scans (ds)	2
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	199,739 ppm / 75187,970 Hz
Digitale Auflösung	0,574 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	1,743 s
Offset (O1)	-180,00 ppm
90°-Pulslänge (p1)	9,75 µs
Pulsleistung (pl1)	2 dB
Vc-Liste (Anzahl der Loops)	2, 4, 6, 12, 18, 24, 32, 58, 100, 150

5.2.4.3. ¹⁹F-T₂-Relaxationsmessungen

Messparameter

Aquisition („cpmg“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	128k
Anzahl der Scans (ns)	8
Dummy Scans (ds)	16
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	24,064 ppm / 9057,97 Hz.
Digitale Auflösung	0,138 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	7,235 s
Offset (O1)	-223,871 ppm
90°-Pulslänge (p1)	12,1 µs
Pulsleistung (pl1)	2 dB
d20	2,5 ms
Vc-Liste (Anzahl der Loops)	2, 4, 6, 12, 18, 24, 32, 58, 100, 150

Prozessierung (Spektren)

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	128k
Fensterfunktion (WDW)	EM
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

Analyse („edt1“)

Parameter	Wert
Fitting-Typ	Fläche („area“)
Drift	1000
Funktionstyp	t1/t2 („ct2“)
Anzahl der Terme	3
Anzahl Komponenten	1

5.3. Proteinbindung von Fluorchinolonen an BSA

5.3.1. Geräte

Spektrometer

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikationen
Bruker Avance 400	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	¹ H-Frequenz: 400,13 MHz ¹³ C-Frequenz: 100,61 MHz <u>Messkopf:</u> 5 mm BBO

Software

XWIN-NMR 3.5	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	Visualisiert wurden die Spektren mit dem im Programmpaket enthaltenen XWINPLOT
Windows NT	Microsoft, Unterschleißheim, D	Betriebssystem
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Unterschleißheim, D	Erstellen der Lineweaver-Burk-Plots
Origin 7.5	OriginLab, Northampton, USA	Als Add-In wurde ONMR verwendet

Sonstige Geräte

NMR-Röhrchen 5 mm Professional	Schott, Mainz, D	Für alle Relaxations- und Diffusionsmessungen
Waage Kern 770-60	Kern, Balingen-Frommern, D	

Vortex–Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA	
Research Mikroliterpipetten	Eppendorf, Ham- burg, D	In 100 µl, 1000 µl und 5000 µl.

5.3.2. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Reinheit / Anmerkung
Nalidixinsäure	Acros Organics, New Jersey, USA	99,5 %
Ofloxacin	Hoechst, Frankfurt a. M., D	≥ 99%
Gatifloxacin	Grünenthal, Aachen, D	≥ 99%
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Euriso-Top, Gif-Sur- Yvette, F	99,9%
Bovines Serum Albumin	Fluka Chemie, Buchs, D	Fraktion V > 98%
NaOD 30%ig in D ₂ O	Deutero, Kasellaun, D	99,5%
Natriumhydrogenphosphat	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%

5.3.3. Probenvorbereitung und Messparameter

5.3.3.1. Temperaturkalibrierung

Für die Erstellung der Kalibrierkurve wurde die 1,2-Ethandiol-Standardlösung benutzt. Mit dieser Lösung wurden Standard-Protonenspektren (s. u.) bei einem Heizgasfluss von 535 l/h aufgenommen und wie unter Kapitel 2.3.4.2 beschrieben ausgewertet.

Aquisition („zg“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	32k
Anzahl der Scans (ns)	1
Dummy Scans (ds)	1
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	8,01 ppm / 3205,13 Hz.
Digitale Auflösung	0,195 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	5,112 s
Offset (O1)	4,0 ppm
90°-Pulslänge (p1)	9,30 µs
Pulsleistung (pl1)	-1,0 dB

Prozessierung

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	16k
Fensterfunktion (WDW)	EM
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

5.3.3.2. Gradientenkalibrierung

Für die Bestimmung der Gradientenstärke wurde die „Doped Water“-Standardprobe verwendet. Der Heizgasfluss lag bei 535 l/h.

Aquisition („stebp1s“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	64k
Anzahl der Scans (ns)	8
Dummy Scans (ds)	4
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	10,01 ppm / 4006,41 Hz.
Digitale Auflösung	0,122 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	3,958 s
Offset (O1)	5,0 ppm
90°-Pulslänge (p1)	9,00 μ s
Pulsleistung (pl1)	-2,0 dB
„Spoil“-Gradient	-17,3% bei 1,1 ms
Diffusionszeit (Δ)	50 ms
Gradientenlänge (δ)	1 ms
Gradientenrampe (linear)	32 Einzelmessungen von 95% bis 2% Gradientenstärke

5.3.3.3. Diffusionsmessungen

Über eine 50 mM Stammlösung in D₂O-PBS-Puffer (siehe Kapitel 5.2.3.3) des jeweiligen Antibiotikums wurden die entsprechenden Analysenlösungen mit unterschiedlichen Antibiotikum-BSA-Verhältnis hergestellt. Jede dieser vermessenen Lösungen enthielt 40,0 mg BSA.

Die Diffusionsmessungen wurden bei einer Temperatur von 300 K und bei einem Heizgasfluss von 535 l/h durchgeführt. Vor der eigentlichen Diffusionsmessung wurde der korrekte δ -Wert mittels der Sequenz „stebp1s1d“ abgestimmt. Bei einer Gradientenstärke von 95% mussten die Signale auf eine Restintensität von 2% abfallen. Mit diesem Wert wurde die eigentliche Ermittlung des Diffusionskoeffizienten durchgeführt.

Aquisition („stebpgp1s“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	64k
Anzahl der Scans (ns)	16
Dummy Scans (ds)	4
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	10,01 ppm / 4006,41 Hz.
Digitale Auflösung	0,122 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	8,1789 s
Offset (O1)	5,0 ppm
90°-Pulslänge (p1)	9,00 μ s
Pulsleistung (pl1)	-2,0 dB
„Spoil“-Gradient	-17,3% bei 1,1 ms
Diffusionszeit (Δ)	50 ms
Gradientenlänge (δ)	4 – 4,6 ms (zuvor kalibriert)
Gradientenrampe (linear)	16 Einzelmessungen von 95% bis 2% Gradientenstärke

Prozessierung

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	32k
Fensterfunktion (WDW)	EM
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

Analyse („edt1“)

Parameter	Wert
Fitting-Typ	Intensität („intensity“)
Drift	1000
Funktionstyp	simfit
Anzahl der Terme	2
Anzahl Komponenten	1

5.3.3.4. Selektive $^1\text{H-T}_1$ -Relaxationsmessungen zur K_D -Wert-Bestimmung

Jede Analysenlösung enthielt 40 mg/ml (0,6 mM) BSA in D_2O -PBS-Puffer. Für die Titrationsreihe wurde eine 50 mM Stammlösung des jeweiligen Antibiotikums hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden die entsprechenden Protein-/Antibiotikum-Konzentrationsverhältnisse hergestellt.

Die Relaxationsexperimente wurden bei 300 K bei einem Heizgasfluss von 535 l/h durchgeführt.

Aquisition („selt1ir.dp“) gemessen auf Bruker Avance 400

Parameter	Wert
Datenpunkte (td)	32k
Anzahl der Scans (ns)	8
Dummy Scans (ds)	2
Spektrale Bandbreite (sw/swh)	20,6885 ppm / 8278,146 Hz.
Digitale Auflösung	0,505 Hz/Pt.
Aquisitionszeit (AQ)	1,979 s
Offset (O1)	Auf dem zu untersuchenden Signal
90°-Pulslänge (p1)	9.00 μs
Pulsleistung (pl1)	-2 dB

Parameter	Wert
Gaus 1.1000-Pulslänge (p12)	47,0 ms
Gaus 1.1000-Pulsleistung (sp2)	Kalibriert (59,5-60,1 dB)*
Vd-Liste (10 vd-Zeiten)	10 ms, 100 ms, 250 ms, 500 ms, 1 s, 2s, 3 s, 6 s, 10 s, 15 s

* = Die Pulsleistung des selektiven 180°-Pulses (sp2) wurde vor jedem Versuch auf den Nulldurchgang kalibriert.

Prozessierung (Spektren)

Parameter	Wert
Prozessierte Datenpunkte (SI)	64k
Fensterfunktion (WDW)	EM
Phasenkorrektur	Alleinige Absorption

Analyse („edt1“)

Parameter	Wert
Fitting-Typ	Signalintensität („intensity“)
Drift	1000
Funktionstyp	t1/t2 („ct1“)
Anzahl der Terme	3
Anzahl Komponenten	1

5.3.3.5. Selektive $^1\text{H-T}_1$ -Relaxationsmessungen zur Bestimmung des Affinitätsindex

Jede Analysenlösung enthielt 0,01 mmol Antibiotikum in D₂O-PBS und unterschiedlich große Anteile an BSA. Diese wurden mittels einer 1,5 mM Stammlösung BSA erstellt. Die Messungen wurden bei einer Messtemperatur von 300 K bei einem Heizgasfluss von 535 l/h durchgeführt. Die verwendete Pulssequenz, Aquisitionsparameter, Prozessierung und Analyse war analog zu Kapitel 5.3.3.4.

6. Anhang

6.1. Publikationsverzeichnis

6.1.1. Originalarbeiten

U. Holzgrabe, R. Deubner, C. Schollmayer, **B. Waibel**, *Quantitative NMR spectroscopy – applications in drug analysis*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2005**, 38, 806-812

B. Waibel, U. Holzgrabe, *¹H and ¹⁹F NMR relaxation studies of fleroxacin with *Micrococcus luteus**, J. Pharm. Biomed. Anal., **2007**, 43, 1595-1601

B. Waibel, J. Scheiber, C. Meier, M. Hammitzsch, K. Baumann, G. Scriba, U. Holzgrabe, *Comparison of cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes in absence and presence of urea by means of capillary electrophoresis, nuclear magnetic resonance and molecular modelling*, Eur. J. Org. Chem., **2007**, 2007, 2921-2930

6.1.2. Posterpräsentationen / Abstracta

B. Waibel, J. Scheiber, C. Kahle, U. Holzgrabe, *Analysis of β -Cyclodextrin inclusion complexes with dipeptides in presence of urea by NMR spectroscopy*
DPhG-Jahrestagung 2004 in Regensburg

B. Waibel, J. Scheiber, C. Kahle, U. Holzgrabe, *Scrutinizing β -Cyclodextrin-dipeptid inclusion complexes: a combination of practical and theoretical approaches*
DPhG-Jahrestagung 2005 in Mainz

U. Holzgrabe, **B. Waibel**, J. Scheiber, C. Meier, K. Baumann, *Experimental and computational approaches to scrutinize β -cyclodextrin inclusion complexes*
Drug Analysis 2006 in Namur (Belgien)

B. Waibel, U. Holzgrabe, *¹H and ¹⁹F NMR relaxation studies of fleroxacin to analyse complexation to bacterial cells*

DPhG-Jahrestagung 2006 in Marburg

B. Waibel, U. Holzgrabe, *¹H and ¹⁹F NMR relaxation studies of fleroxacin in presence of bacterial cells*

Doktorandentagung der DPhG 2006 in Heroldsberg

B. Waibel, U. Holzgrabe, *Application of ¹H and ¹⁹F NMR relaxation for the investigation of drug binding to bacterial cells*

DPhG-Jahrestagung 2007 in Erlangen

7. Abkürzungen und Symbole

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Bemerkung
ADC	Analog-Digital-Converter	Analog-Digital-Umwandler
B_0	Statische Induktion	Magnetisierung in z-Achse
B_1	Induktion durch Hochfrequenz-Wechselfeld	
BSA	Bovines Serum Albumin	
CD	Cyclodextrin	
CE	Capillary Electrophoresis	Kapillarelektrophorese
CICS	Complexation Induced Chemical Shifts	Durch Komplexierung bedingte Änderung der chemischen Verschiebung
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Pulssequenz	
CSA	Chemical Shift Anisotropy	Anisotropie der chemischen Verschiebung
CW	Continous Wave	Variation der Sendefrequenz bei Einsatz eines statischen Magnetfeldes
d	Dublett	
dd	Dublett vom Dublett	
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure	
FID	Free Induction decay	Freier Induktionsabfall
HSA	Humanes Serum Albumin	
HTS	High-Throughput-Screening	Testverfahren mit einem hohen Durchsatz von Analyten

Abkürzung	Bedeutung	Bemerkung
m	Multiplett	
MD	Molecular Dynamic	Simulation der Moleküldynamik
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Magnetische Kernresonanz
NOE	Nuclear Overhauser Effect	Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	2D-Experiment durch den NOE
PBS	Phosphate Buffered Saline	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFG	Pulsed Field Gradient	Gepulste Feldgradienten
PFT	Pulse Fourier Transform	Gleichzeitige Anregung aller Kerne mit anschließender Fourier-Transformation
rf	Radio Frequency	Radiofrequenz
ROESY	Rotating-Frame NOE Spectroscopy	2D-Experiment des NOE im rotierenden Koordinatensystem
SW	Spectral Width	Spektrale Breite
t	Triplett	
TMS	Tetramethylsilan	
TSP	3-(Trimethylsilyl)-propionsäure-D ₄	

7.2. Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
$[A]_L^T$	Affinitätsindex	$\text{l mol}^{-1} \text{s}^{-1}$
$[A^N]_L^T$	Normalisierter Affinitätsindex	l mol^{-1}
D	Diffusionskoeffizient	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
δ	chemische Verschiebung	ppm
γ	Magnetogyrisches Verhältnis	$\text{rad T}^{-1} \text{s}^{-1}$
h	Plancksches Wirkungsquantum	J s
\hbar	reduziertes Plancksches Wirkungsquantum	$h/2\pi$
I	Kernspinquantenzahl	
J	Kopplungskonstante	Hz
k	Boltzmann-Konstante	J K^{-1}
K_D	Dissoziationskonstante	mol l^{-1}
μ	magnetisches Moment	A m^2
ν	Larmorfrequenz	Hz
R	Relaxationsrate	s^{-1}
σ	Abschirmungskonstante	
T	Absolute Temperatur	K
T_1	Zeit-Konstante der Spin-Gitter-Relaxation	s

Symbol	Bedeutung	Einheit
T_2	Zeitkonstante der Spin-Spin-Relaxation	s
T_2^*	effektive Spin-Spin-Relaxationszeit	s
Θ	Pulswinkel	°
τ_c	Korrelationszeit	μs
τ_M	Mischzeit	μs

8. Literaturverzeichnis

- ¹ I.D. Kuntz, *Structure-based strategies for drug design and discovery*, Science, **1992**, 257, 1078-1082
- ² F.C.L. Almeida, G.C. Amorim, V.H. Moreau, V.O. Sousa, A.T. Creazola, T.A. Américo, A.P.N. Pais, A. Leite, L.E.S. Netto, R.J. Giordano, A.P. Valente, *Selectively labeling the heterologous protein in Escherichia coli for NMR studies: a strategy to speed up NMR spectroscopy*, J. Magn. Reson., **2001**, 148, 142-146
- ³ T. Otomo, N. Ito, Y. Kyogoku, T. Yamazaki, *NMR observation of selected segments in a larger protein: central-segment isotope labeling through Intein-mediated ligation*, Biochemistry, **1999**, 3, 16040-16044
- ⁴ T. Otomo, K. Teruya, K. Uegaki, T. Yamazaki, Y. Kyogoku, *Improved segmental isotope labeling of proteins and application to a larger protein*, J. Biomol. NMR, **1999**, 14, 105-114
- ⁵ L.E. Kay, *Protein dynamics from NMR*, Biochem Cell Biol., **1998**, 76, 145-152
- ⁶ P.J. Hajduk, E.T. Olejniczak, S.W. Fesik, *One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules*, J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119, 12257-12261
- ⁷ B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Screening mixtures for biological activity by NMR*, Eur. J. Biochem., **1997**, 246, 705-709
- ⁸ S.B. Shuker, P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik, *Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR*, Science, **1996**, 274, 1531-1534
- ⁹ M. Mayer, B. Meyer, *Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectra*, Angew. Chem. Int. Ed., **1999**, 38, 1784-1788

- ¹⁰ I. I. Rabi, S. Millman, P. Kusch, J.R. Zacharias, *The molecular beam resonance method for measuring nuclear magnetic moments the magnetic moments of ${}^6_3\text{Li}$, ${}^7_3\text{Li}$ and ${}^{19}_9\text{F}$* , Phys. Rev., **1939**, 55, 526-535
- ¹¹ F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard, *Nuclear Induction*, Phys. Rev., **1946**, 69, 127
- ¹² E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound, *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid*, Phys. Rev., **1946**, 69, 37
- ¹³ R.R. Ernst, W.A. Anderson, *Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance*, Rev. Sci. Instr., **1966**, 37, 93-102
- ¹⁴ R.K. Harris, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A Physicochemical View*, Pitman, London, **1983**
- ¹⁵ J. Mason (Ed.), *Multinuclear NMR*, Plenum Press, New York, **1987**
- ¹⁶ R.K. Harris, E.D. Becker, S.M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, *NMR nomenclature. Nuclear spin properties and convention for chemical shifts (IUPAC Recommendation 2001)*, Pure Appl. Chem., **2001**, 73, 1795-1818
- ¹⁷ F.A.L. Anet, A.J.R. Bourn, *Nuclear magnetic resonance spectral assignments from nuclear Overhauser effects*, J. Am. Chem. Soc., **1965**, 87, 5250-5254
- ¹⁸ H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie – Eine Einführung*, VCH, Weinheim, **1999**
- ¹⁹ A. Otter, G. Kotovych, *The solution conformation of the synthetic tubulin fragment Ac-tubulin- α (430–441)-amide based on two-dimensional ROESY experiments*, Can. J. Chem., **1988**, 66, 1814-1820

- ²⁰ J.Szejtli, *Chemistry, Physical and Biological Properties of Cyclodextrins*, in: J. Szejtli, T. Osa, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3: *Cyclodextrins*, Elsevier Science Ltd.: Oxford, **1996**
- ²¹ M.A. Villiers, *Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique*, *Comp. Rend.*, **1891**, 112, 536-538
- ²² F. Schardinger, *Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlehydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristalline Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke*, *Zeitschrift f. Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel*, **1903**, 6, 865-880
- ²³ F. Schardinger, *Bildung kristalliner Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microbien*, *Centr. Bakt. Parasitenk.*, **1911**, Abt. II, 29, 188-197
- ²⁴ F. Cramer, W. Saenger, H.C. Spatz, *Inclusion compounds. XIX.^{1a} The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 14-20
- ²⁵ K.A. Connors, *The stability of cyclodextrin complexes in solution*, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1325-1357
- ²⁶ F.W. Lichtenthaler, S. Immel, *On the hydrophobic characteristics of cyclodextrins: computer-aided visualization of molecular lipophilicity patterns*, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1996**, 1996, 27-37
- ²⁷ W. Saenger, *Cyclodextrin-Einschlussverbindungen in Forschung und Industrie*, *Angew. Chem.*, **1980**, 92, 343-361
- ²⁸ H. Nishi, *Enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with polysaccharides*, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 792, 327-347

- ²⁹ P.V. Demarco, A.L. Thakkar, *Cyclohepta-amylose inclusion complexes. A proton magnetic resonance study*, J. Chem. Soc. D, **1970**, 2-4
- ³⁰ H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese*, Springer, Berlin, 1. Auflage, **1994**
- ³¹ S.Fanali, *Separation of optical isomers by capillary zone electrophoresis based on host-guest complexation with cyclodextrins*, J. Chromatogr. A, **1989**, 474, 441-446
- ³² A. Guttman, A. Paulus, A.S. Cohen, N. Grinberg, B.L. Karger, *Use of complexing for selective separation in High Performance Capillary Electrophoresis: Chiral resolution via cyclodextrins incorporated within polyacrylamide gel columns*, J. Chromatogr. A, **1988**, 448, 41-53
- ³³ S. Sabah, G.K.E. Scriba, *Electrophoretic stereoisomer separation of aspartyl dipeptides and tripeptides in untreated fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries using charged cyclodextrins*, J. Chromatogr. A, **1998**, 822, 137-145
- ³⁴ J. Li, K.C Waldron, *Estimation of the pH-independent binding constants of alanyl-phenylalanine and leucylphenylalanine stereoisomers with β -cyclodextrin in the presence of urea*, Electrophoresis, **1999**, 20, 171-179
- ³⁵ S. Sabbah, G.K.E. Scriba, *Separation of dipeptide and tripeptide enantiomers in capillary electrophoresis using carboxymethyl- β -cyclodextrin and succinyl- β -cyclodextrin: Influence of the amino acid sequence, nature of the cyclodextrin and pH*, Electrophoresis, **2001**, 22, 1385-1393
- ³⁶ A.M. Rizzi, L. Kremser, *pKa shift-associated effects in enantioseparations by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis*, Electrophoresis, **1999**, 20, 2715-2722

- ³⁷ F. Süß, C. Kahle, U. Holzgrabe, G.K.E. Scriba, *Studies on the chiral recognition of peptide enantiomers by neutral and sulfated β -cyclodextrin and heptakis-(2,3-di-O-acetyl)- β -cyclodextrin using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance*, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 1301-1307
- ³⁸ M. Hammitzsch-Wiedemann, G.K.E. Scriba, *Influence of buffer substances and urea on the β -cyclodextrin-mediated chiral separation of dipeptides in CE*, *Electrophoresis*, **2007**, 28, 2619-2628
- ³⁹ B. Chankvetadze, G. Schulte, D. Bergenthal, G. Blaschke, *Comparative capillary electrophoresis and NMR studies of enantioseparation of dimethindene with cyclodextrins*, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 798, 315-323
- ⁴⁰ A. De Marco, *pH dependence of internal references*, *J. Magn. Res.*, **1977**, 26, 527-528
- ⁴¹ Z. Li, Q. Guo, T. Ren, X. Zhu, Y. Liu, *Can TMS and DSS be used as NMR references for cyclodextrin species in aqueous solution?* *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **1993**, 15, 37-42
- ⁴² A.A. Salem, H.A. Mossa, B.N. Barsoum, *Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole, and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine sample*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 41, 654-661
- ⁴³ P.K. Glasoe, F.A. Long, *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide*, *J. Phys. Chem.*, **1960**, 64, 188-190
- ⁴⁴ M. Paabo, R.G. Bates, *Standards for a practical scale of pD in heavy water*, *Anal. Chem.*, **1969**, 41, 283-285

- ⁴⁵ F.G.K. Baucke, *Further insight into the dissociation mechanism of glass electrodes. The response in heavy water*, J. Phys. Chem. B, **1998**, 102, 4835-4841
- ⁴⁶ M.Guéron, P. Plateu, M. Decorps, *Solvent signal suppression in NMR*, Prog. NMR Spectrosc., **1991**, 23, 135-209
- ⁴⁷ M. Guéron, P. Plateu, *Exchangeable proton NMR without base-line distortion, using new strong-pulse sequences*, J. Am. Chem. Soc., **1982**, 104, 7310-7311
- ⁴⁸ M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions*, J. Biomol. NMR, **1992**, 2, 661-666
- ⁴⁹ C. Meier, *Dissertation*, Würzburg **2005**
- ⁵⁰ C. Kahle, R. Deubner, C. Schollmayer, J. Scheiber, K. Baumann, U. Holzgrabe, *NMR spectroscopic and molecular modeling studies on cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes*, Eur. J. Org. Chem., **2005**, 8, 1578-1589
- ⁵¹ S. Sabbah, F. Süß, G.K.E. Scriba, *pH-Dependence of complexation constants and complex mobility in capillary electrophoresis separations of dipeptide enantiomers*, Electrophoresis, **2001**, 22, 3163-3170
- ⁵² A. Zaks, A. Klibanov, *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1985**, 82, 3192-96
- ⁵³ H.T. Vakos, H. Kaplan, B. Black, B. Dawson, M.A. Hefford, *Use of the pH memory effect in lyophilized proteins to achieve preferential methylation of α -amino groups*, J. Protein Chem., **2000**, 19, 231-37
- ⁵⁴ B.J. Alter, T.E. Wainwright, *Phase transition for a hard sphere system*, J. Chem. Phys., **1957**, 27, 1208-1209

⁵⁵ B.J. Alter, T.E. Wainwright, *Studies in molecular dynamics. I. General Method*, J. Chem. Phys., **1959**, 31, 459-466

⁵⁶ F.H. Stillinger, A. Rahman, *Improved simulation of liquid water by molecular dynamics*, J. Chem. Phys., **1974**, 60, 1545-1557

⁵⁷ B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*, J. Comp. Chem., **1983**, 4, 187–217

⁵⁸ W.F. van Gunsteren, H.J.C. Berendsen, *Gromos-87 manual*, Biomos BV Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands **1987**

⁵⁹ S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, D.A. Case, *An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids*, J. Comp. Chem., **1986**, 7, 230–252

⁶⁰ F.H. Allen, *The Cambridge structural database: a quarter of a million crystal structures and rising*, Acta Crystallogr. B, **2002**, 58, 380-388

⁶¹ H.M. Bermann, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Baht, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, *The Protein Data Bank*, Nucleic Acids Res., **2000**, 28, 235-242

⁶² http://www.accelrys.com/dstudio/ds_viewer/, Accelrys, San Diego, CA, USA

⁶³ <http://www.tripos.com/scitech/insilicodisc/moleculemodeling/sybase.html>, Tripos, St. Louis, MO, USA

⁶⁴ J.M. Alexander, J.L. Clark, T.J. Brett, J.J. Stezowski, *Chiral discrimination in cyclodextrin complexes of amino acid derivatives: betacyclodextrin/N-acetyl-L-phenylalanine and N-acetyl-D-phenylalanine complexes*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **2002**, 99, 5115-5120

⁶⁵ <http://openbabel.sourceforge.net/>

⁶⁶ J.M. Martínez, L. Martíne, *Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking*, J. Comput. Chem. **2003**, 24, 819-825

⁶⁷ A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, *VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs*, J. Mol. Graph, **2002**, 21, 47-49

⁶⁸ A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, *VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using a plug-in architecture and script programming*, J. Comput. Aided Mol. Des., **2004**, 18, 167-173

⁶⁹ <http://www.ddl.unimi.it>

⁷⁰ L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, K. Schulten, *NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics*, J. Comput. Phys., **1999**, 151, 283-312

⁷¹ <http://www.ks.uiuc.edu/research/NAMD>

⁷² The Mathworks Inc., Natick, MA, USA

⁷³ <http://www.ks.uiuc.edu/development/MDtools/matdcd/>

⁷⁴ G.Y. Leshner, E.J. Froelich, M.D. Gruett, *1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents*, J. Med. Pharm. Chem., **1962**, 5, 1063-1068

⁷⁵ R.C. Owens, P.G. Ambrose, *Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones*, Clin. Infect. Dis., **2005**, 40, 144-157

- ⁷⁶ T.D. Gootz, K.E. Brighty, *Fluorquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance and clinical aspects*, Med. Res. Rev., **1996**, 16, 433-486
- ⁷⁷ J.M. Domagala, *Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials*, J. Antimicrob. Chemother., **1994**, 33, 685-706
- ⁷⁸ X. Zhao, C. Xu, J.M. Domagala, K. Drlica, *DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1997**, 94, 13991-13996
- ⁷⁹ W.A. Goss, W.H. Deitz, T.M. Cook, *Mechanism of action of nalidixic acid on Escherichia coli. II. Inhibition of desoxyribonucleic acid synthesis*, J. Bacteriol., **1965**, 89, 1068-1074
- ⁸⁰ M. Gellert, K. Mizuuchi, M.H. O'Dea, T. Itoh, J. Tomizawa, *Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity*, Proc. Natl. Sci. USA, **1977**, 74, 4772-4776
- ⁸¹ A. Sugino, C.L. Peebles, K.N. Kreuzer, N.R. Cozzarelli, *Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme*, Proc. Natl. Sci. USA, **1977**, 74, 4767-4771
- ⁸² P.Heisig, B. Wiedemann, *Actio und Reactio: Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone*, Pharmazie in unserer Zeit, **2001**, 30, 382-393
- ⁸³ C.J.R. Willmottt, A. Maxwell, *A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex*, Antimicrob. Agents Chemother., **1993**, 37, 126-127

- ⁸⁴ K. Hoshino, A. Kitamura, I. Morrissey, K. Sato, J.I. Kato, H. Ikeda, *Comparison of inhibition of Escherichia coli topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition*, Antimicrob. Agents Chemother., **1994**, 38, 2623-2627
- ⁸⁵ S.P. Cohen, H. Hächler, S.B. Levy, *Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (mar) locus in Escherichia coli*, J. Bacteriol., **1993**, 175, 1484-1492
- ⁸⁶ L.J.V. Piddock, *Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells*, J. Antimicrob. Chemother., **1991**, 27, 399-403
- ⁸⁷ L.J.V. Piddock, Y.F. Jin, V. Ricci, A.E. Asuquo, *Quinolone accumulation by Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Escherichia coli*, J. Antimicrob. Chemother., **1999**, 43, 61-70
- ⁸⁸ K. Hirai, H. Aoyama, T. Irikura, S. Iyobe, S. Mitsuhashi, *Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of Salmonella typhimurium and Escherichia coli*, Antimicrob. Agents Chemother., **1986**, 29, 535-538
- ⁸⁹ J. Bedard, S. Wong, L.E. Bryan, *Accumulation of Enoxacin by Escherichia coli and Bacillus subtilis*, Antimicrob. Agents Chemother., **1987**, 31, 1348-1354
- ⁹⁰ A.M. Geddes, *Safety of fleroxacin in clinical trials*, Am. J. Med., **1993**, 94, 201-203
- ⁹¹ K. Sato, Y. Matsuura, M. Inoue, T. Une, Y. Osada, H. Ogawa, S. Mitsuhashi, *In vitro and in vivo activity of DL-8280, a new oxazine derivate*, Antimicrob. Agents Chemother., **1982**, 22, 548-553
- ⁹² U. Neugebauer, U. Schmid, K. Baumann, U. Holzgrabe, W. Ziebuhr, S. Kozitskaya, W. Kiefer, M. Schmitt, J. Popp, *Characterization of bacterial growth and the influence of antibiotics by means of UV Resonance Raman Spectroscopy*, Biopolymers, **2006**, 82, 306-311

- ⁹³ V. Hoerr, W. Ziebuhr, S. Kozitskaya, E. Katzowitsch, U. Holzgrabe, *Laser-Induced Fluorescence-Capillary Electrophoresis and Fluorescence Microplate Reader Measurement: two methods to quantify the effect of antibiotics*, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 7510-7518
- ⁹⁴ R. Bourne, U. Himmelreich, A. Sharma, C. Mountford, T. Sorrell, *Identification of Enterococcus, Streptococcus, and Staphylococcus by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectroscopic data from plate cultures*, *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, 39, 2916-2923
- ⁹⁵ S. Lecomte, M.H. Baron, M.T. Chenon, C. Coupry, N.J. Moreau, *Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, 38, 2810-2816
- ⁹⁶ P.J. Hajduk, E.T. Olejniczak, S.W. Fesik, *One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 12257-12261
- ⁹⁷ G. Corbini, S. Martini, C. Bonechi, M. Casolaro, P. Corti, C. Rossi, *Synthetic polymers as biomacromolecular models for studying ligand-protein interactions: a nuclear spin relaxation approach*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 40, 113-121
- ⁹⁸ E. Gaggelli, G. Valensin, T. Kushnir, G. Navon, *Determination of absolute values of dipolar cross-relaxation rates for ligands bound to macromolecules using double-selective T_1* , *Magn. Reson. Chem.*, **1992**, 30, 461-465
- ⁹⁹ C. Rossi, C. Bonechi, S. Martini, M. Ricci, G. Corbini, P. Corti, A. Donati, *Ligand-macromolecule complexes: affinity index determination by selective nuclear relaxation analysis*, *Magn. Reson. Chem.*, 2001, 39, 457-462

- ¹⁰⁰ M. Delfini, R. Gianferri, V. Dubbini, C. Manetti, E. Gaggelli, G. Valensin, *¹H NMR relaxation investigation of inhibitors interacting with *Torpedo californica* acetylcholinesterase*, J. Magn. Reson., **2000**, 144, 129-133
- ¹⁰¹ S. Martini, C. Bonechi, M. Casolaro, G. Corbini, C. Rossi, *Drug-protein recognition processes investigated by NMR relaxation data: A study on corticosteroid-albumin interactions*, Biochem. Pharmacol., **2006**, 71, 858-864
- ¹⁰² G. Valensin, T. Kushnir, G. Navon, *Selective and nonselective proton spin-lattice relaxation studies of enzyme-substrate interactions*, J. Magn. Reson., **1982**, 46, 23-29
- ¹⁰³ S. Meiboom, D. Gill, *Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times*, Rev. Sci. Instr., **1958**, 29, 688-691
- ¹⁰⁴ V. Hoerr, A. Stich, U. Holzgrabe, *Critical aspects of analysis of *Micrococcus luteus*, *Neisseria cinerea* and *Pseudomonas fluorescens* by means of capillary electrophoresis*, Electrophoresis, **2004**, 25, 3132-3138
- ¹⁰⁵ <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0930.html>
- ¹⁰⁶ A.E. Asuquo, L.J.V. Piddock, *Accumulation of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa**, J. Antimicrob. Chemother., **1993**, 31, 865-880
- ¹⁰⁷ L.J.V. Piddock, Y.F. Jin, *Antimicrobial activity and accumulation of moxifloxacin in quinolone-susceptible bacteria*, J. Antimicrob. Chemother., **1999**, 43, 39-42
- ¹⁰⁸ S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi, *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*, Protein Eng., **1999**, 12, 439-446

- ¹⁰⁹ S. Curry, J.X. Ho, *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites*, *Adv. Protein. Chem.*, **1998**, 5, 827-835
- ¹¹⁰ G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*, *Mol. Pharmacol.*, **1975**, 11, 824-832
- ¹¹¹ G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*, *Mol. Pharmacol.*, **1976**, 12, 1052-1061
- ¹¹² X.M. He, D.C. Carter, *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*, *Nature*, **1992**, 358, 209-215
- ¹¹³ U. Kragh-Hansen, *Relations between high-affinity binding sites for L-tryptophan, diazepam, salicylate and phenol red on human serum albumin*, *Biochem. J.*, **1983**, 209, 135-142
- ¹¹⁴ U. Kragh-Hansen, *Relations between high-affinity binding sites of markers for binding regions on human serum albumin*, *Biochem. J.*, **1985**, 225, 629-638
- ¹¹⁵ H. Watanabe, U. Kragh-Hansen, S. Tanase, K. Nakajou, M. Mitarai, Y. Iwao, T. Maruyama, M. Otagiri, *Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants*, *Biochem. J.*, **2001**, 357, 269-274
- ¹¹⁶ R.H. McMenemy, J.L. Oncley, *The specific binding of L-tryptophan to serum albumin*, *J. Biol. Chem.*, **1958**, 233, 1436-1447
- ¹¹⁷ T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, *Species differences of serum albumins: drug binding sites*, *Pharm. Res.*, **1997**, 14, 1607-1612

- ¹¹⁸ D.N. Bailey, J.R. Briggs, *The binding of selected therapeutic drugs to human serum α_1 -acid glycoprotein and human serum albumin in vitro*, Ther. Drug Monitoring, **2004**, 26, 40-43
- ¹¹⁹ O. Borga, B. Borga, *Serum protein binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a comparative study*, J. Pharm. Biopharm., **1997**, 25, 63-77
- ¹²⁰ K. Paal, J. Müller, L. Hegedus, *High affinity binding of paclitaxel to human serum albumin*, Eur. J. Biochem., **2001**, 268, 2187-2191
- ¹²¹ H. Lam, M. Davies, C.E. Lunte, *Vacuum ultrafiltration sampling for determination of plasma protein binding of drugs*, J. Pharm. Biomed. Anal., **1996**, 14, 1753-1757
- ¹²² G. Zlotos, A. Bückner, J. Jürgens, U. Holzgrabe, *Protein binding in a congeneric series of antibacterial quinolone derivatives*, Int. J. Pharm., **1998**, 169, 229-238
- ¹²³ A. Heinze, U. Holzgrabe, *Determination of the extend of protein binding of antibiotics by means of an automated continuous ultrafiltration method*, Int. J. Pharm., **2006**, 311, 108-112
- ¹²⁴ M. Arkin, J.D. Lear, *A new data analysis method to determine binding constants of small molecules to proteins using equilibrium analytical ultracentrifugation with absorption optics*, Anal. Biochem., **2001**, 299, 98-107
- ¹²⁵ N.H.H. Heegaard, *A heparin-binding peptide from human serum amyloid P component characterized by affinity capillary electrophoresis*, Electrophoresis, **1998**, 19, 442-447
- ¹²⁶ F.B. Erim, J.C. Kraak, *Vacancy affinity capillary electrophoresis to study competitive protein-drug binding*, J. Chromatogr. B, **1998**, 710, 205-210

- ¹²⁷ T. Ohnishi, N.A.L. Mohamed, A. Shibukawa, Y. Kuroda, T. Nakagawa, S.E. Gizawy, H.F. Askal, M.E. El Kommos, *Frontal analysis of drug-plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2002**, 27, 607-614
- ¹²⁸ V.N. Russeva, Z.D. Zhivkova, *Albumin binding sites studied by high-performance liquid affinity chromatography*, Int. J. Pharm., **1998**, 168, 23-29
- ¹²⁹ Y.F. Cui, G.Y. Bai, C.G. Li, C.H. Ye, M.L. Liu, *Analysis of competitive binding of ligands to human serum albumin using NMR relaxation measurements*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2004**, 34, 247-254
- ¹³⁰ B.W. Dubois, A.S. Evers, *¹⁹F-NMR Spin-Spin Relaxation (T_2) method for characterizing volatile anesthetic binding to proteins. Analysis of isoflurane binding to serum albumin*, Biochemistry, **1992**, 31, 7069-7076
- ¹³¹ M.T. Chenon, *Application of fluorine-NMR for studying interactions of quinolones with albumin*, Analusis, **1990**, 18, i51-i57
- ¹³² E.O. Stejskal, J.E. Tanner, *Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient*, J. Chem. Phys., **1965**, 42, 288-292
- ¹³³ C.S. Johnson Jr., *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications*, Prog. NMR Spectroscopy., **1999**, 34, 203-256
- ¹³⁴ J.E. Tanner, *Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies*, J. Chem. Phys., **1970**, 52, 2523-2526
- ¹³⁵ D. Wu, A. Chen, C.S. Johnson, *Flow imaging by means of 1D pulsed-field-gradient NMR with application to electroosmotic flow*, J. Magn. Reson. A, **1995**, 115, 123-126

- ¹³⁶ R.S. Luo, M.L. Liu, X.A. Mao, *NMR diffusion and relaxation study of drug-protein interaction*, *Spectrochimica Acta. A*, **1999**, 55, 1897-1901
- ¹³⁷ M. Liu, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Analysis of drug-protein binding using nuclear magnetic resonance based molecular diffusion measurements*, *Anal. Commun.*, **1997**, 34, 225-228
- ¹³⁸ S. Braun, H.O. Kalinowski, S. Berger, *150 and more basic NMR experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 2. Auflage, 430-432
- ¹³⁹ M. Holz, H. Weingärtner, *Calibration in accurate spin-echo self-diffusion measurements using ¹H and less-common nuclei*, *J. Magn. Reson.*, **1991**, 92, 115-125
- ¹⁴⁰ C. Rossi, A. Donati, C. Bonechi, G. Corbini, R. Rappuoli, E. Dreassi, P. Corti, *Nuclear relaxation studies in ligand-macromolecule affinity index determinations*, *Chem. Phys. Lett.*, **1996**, 264, 205-209
- ¹⁴¹ C. Rossi, C. Bonechi, S. Martini, M. Ricci, G. Corbini, P. Corti, A. Donati, *Ligand-macromolecule complexes: affinity index determination by selective nuclear relaxation analysis*, *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, 39, 457-462
- ¹⁴² T. Izumi, T. Kitagawa, *Protein binding of quinolonecarboxylic acids*, *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37, 742-745
- ¹⁴³ A. Heinze, *Dissertation*, Würzburg **2005**
- ¹⁴⁴ M. Nakashima, T. Uematsu, K. Kosuge, H. Kusajima, T. Ooie, Y. Masuda, R. Ishida, H. Uchida, *Single- and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, 39, 2635-2640
- ¹⁴⁵ H. Bisswanger, *Practical Enzymology*, Wiley-VCH Weinheim, **2004**, 170-173

¹⁴⁶ J. Oravcova, B. Böhs, W. Lindner, *Drug-protein binding studies: New trends in analytical and experimental methodology*, J. Chromatogr. B., **1996**, 677, 1-28

¹⁴⁷ J.D. Huang, *Errors in estimating the unbound fraction of drugs due to the volume shift in equilibrium dialysis*, J. Pharm. Sci., **1983**, 72, 1368-1369

¹⁴⁸ M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The practice of peptide synthesis*, 2. Auflage, **1994**, Berlin: Springer-Verlag, 110