

Optimierte Methoden der
Magnetresonanz-Spektroskopie zur molekularen
Charakterisierung neuartiger Wirkstoffe gegen
Infektionskrankheiten

von

Kai F. Schwedhelm

Würzburg 2009

Optimierte Methoden der
Magnetresonanz-Spektroskopie zur molekularen
Charakterisierung neuartiger Wirkstoffe gegen
Infektionskrankheiten

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

vorgelegt von

Kai Florian Schwedhelm
aus Würzburg am Main

Würzburg 2009

Eingereicht am: 27. Mai 2009

bei der Fakultät für Physik und Astronomie

1. Gutachter: Professor Dr. Cornelius Faber

2. Gutachter: Professor Dr. Peter M. Jakob
der Dissertation

1. Prüfer: Professor Dr. Cornelius Faber

2. Prüfer: Professor Dr. Peter M. Jakob

3. Prüfer: Professor Dr. Carsten Honerkamp
im Promotionskolloquium

Tag des Promotionskolloquiums: 23. September 2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinem Vater.

„Results! I have gotten a lot of results. I know several thousand things that won't work.”

Thomas Alva Edison

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Von der Aminosäure zum Protein	3
2.2	Magnetische Resonanz	5
2.2.1	Die Entstehung des MR Signals	6
2.3	NMR-Spektroskopie	7
2.3.1	Chemische Verschiebung	7
2.3.2	J-Kopplung	8
2.3.3	Produktoperator-Formalismus	9
2.3.4	Spin-Echo	14
2.3.5	Relaxation	18
2.3.6	Paramagnetische Relaxation	19
2.3.7	Nuclear Overhauser Effect	26
2.3.8	Mehrdimensionale Spektroskopie	27
2.4	Magnetische Suszeptibilität und Paramagnetismus	29
2.5	Ligandenfeldtheorie	31
2.6	Moleküldynamiksimulation	32
2.7	Docking	34
3	Projekte	35
3.1	Der MIP-Kollagen IV-Komplex	35
3.1.1	Legionellen	35
3.1.2	Zielsetzung	37

3.1.3	Material und Methoden	38
3.1.4	Ergebnisse	45
3.1.5	Diskussion	64
3.1.6	Zusammenfassung	68
3.2	Strukturaufklärung paramagnetischer Komplexe	69
3.2.1	Malaria und die Naphthylisoquinolin-Alkaloide	69
3.2.2	Problemstellung und Zielsetzung	72
3.2.3	Material und Methoden	73
3.2.4	Ergebnisse	83
3.2.5	Vergleich und Diskussion	94
3.2.6	Zusammenfassung	99
4	Summary	101
4.1	The MIP-collagen IV complex	101
4.2	Structure elucidation of paramagnetic complexes formed by novel antimalarial agents	102
	Literaturverzeichnis	105
	Originalarbeiten	111
A	Anhang	113
A.1	Abkürzungsverzeichnis	113
A.2	Konstanten und Symbole	114
A.3	Der MIP-Kollagen IV-Komplex	115
A.3.1	^1H - ^{15}N -HSQC Pulssequenz (fhsqcN15_T2.ks)	115
A.3.2	Haddock	118
A.3.3	MIP ⁷⁷⁻²¹³	119
A.3.4	Gromacs	119
A.3.5	Moleküldynamiksimulation des MIP-Dimer-Kollagen IV Komplexes . .	122
A.4	Strukturaufklärung paramagnetischer Komplexe	123
A.4.1	Datenblätter	123
A.4.2	T ₁ Inversion Recovery Pulssequenz (t1irw5)	131
	Lebenslauf	135

Kapitel 1

Einleitung

Infektionskrankheiten sind auch im 21. Jahrhundert weiterhin die häufigste Todesursache auf der Erde. Nach Erhebungen der WHO sterben jedes Jahr über 2 Millionen Menschen an Malaria. Atemwegserkrankungen fordern 3,9 Millionen Opfer. Die Todesfälle aufgrund anderer Infektionen summieren sich auf über 10 Millionen jährlich. Änderungen im globalen Klima sorgen für das Auftreten tropischer Infektionskrankheiten auch in gemäßigten Gebieten. Weitere Probleme entstehen durch die zunehmende Resistenz vieler Erreger gegenüber den bekannten Therapiemöglichkeiten.

Für die nachhaltige Bekämpfung einer Infektionskrankheit ist ein Verständnis der Wirkungsweise neuer und bekannter Arzneistoffe auf molekularer Ebene erforderlich. Die Resonanzeigenschaften von Atomkernen und Elektronen bieten eine reichhaltige Informationsquelle für die Charakterisierung von Biomolekülen und werden in dieser Arbeit als Methode zur Molekülstrukturaufklärung genutzt. Die resultierenden Erkenntnisse geben wichtige Impulse für die Neuentwicklung und Optimierung dringend benötigter Medikamente.

Klassische Experimente zur Molekülstrukturaufklärung durch Magnetresonanz basieren auf dem sog. *Nuclear Overhauser Effect*. Dieser ist jedoch nur unter bestimmten Voraussetzungen nutzbar. In dieser Arbeit werden strukturelle Informationen über Biomoleküle aus der sog. *paramagnetischen Relaxation* abgeleitet. Schon geringe Konzentrationen paramagnetischer Elemente führen zu einer räumlich begrenzten Störung des MR-Signals und verhindern den Einsatz herkömmlicher Strategien zur Strukturaufklärung.

In Kapitel 3.1 wird ein potentieller Inhibitor der Legionärskrankheit durch ein paramagnetisches Spin-Label markiert und der Einfluss auf die MR-Signale seines Zielmoleküls untersucht. Mit dieser Strategie lässt sich die Interaktionsoberfläche beider Moleküle kartieren, auch wenn der Inhibitor nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden ist. Anschließend Simulationen geben Aufschluss über die Molekülstruktur des Inhibitors im Komplex mit seinem Zielmolekül. Die resultierenden Informationen werden als Grundlage für das Design neuer Wirkstoffe mit optimierten Bindungseigenschaften verwendet.

Die quantitative Auswertung der MR-Signalverminderung durch die Anwesenheit paramagnetischer Zentren wird in Kapitel 3.2 eingesetzt, um präzise Abstandsinformationen zwischen einzelnen Atomen in einem Wirkstoff-Zielmolekül-Komplex zu berechnen. Die Wirkstoffe zählen zu einer neuen Klasse von Substanzen mit hoher Aktivität gegen Malaria. Ihr Wirkmechanismus ist jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die Methode erlaubt erstmals die Bestimmung einer Molekülstruktur unter den gleichen chemischen Bedingungen, wie sie auch *in vivo* herrschen.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Von der Aminosäure zum Protein

Proteine sind die wesentlichen Bausteine des Lebens auf der Erde. Sie bestehen aus einer Abfolge (Sequenz) von Aminosäuren. Alle Aminosäuren besitzen dasselbe Rückgrat, bestehend aus einer Amino- und einer Carboxylgruppe, sowie einem veränderlichen Rest, der die Eigenschaften der Aminosäure festlegt (siehe Abb. 2.1). Die 20 proteinogenen Aminosäuren sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Die Namen der Aminosäuren werden durch einen Drei- oder Einbuchstabencode abgekürzt und mit einer Nummer versehen, welche die Position der Aminosäure in der Peptidsequenz eines Proteins wiedergibt. Z. B. steht PR0131 für die Aminosäure *Prolin* an Position 131.

Mit Ausnahme von Glycin sind alle Aminosäuren chirale Moleküle (um das α -Kohlenstoffatom). Von jeder Aminosäuren existieren zwei Enantiomere, wobei die proteinogenen Aminosäuren ausnahmslos l-Aminosäuren sind. Die zellulären Mechanismen zum Aufbau der Proteine (Ribosom, tRNA, Aminoacyl-tRNA Synthetase, etc.) sind selbst chiral und können nur die l-Variante erkennen. D-Aminosäuren kommen in Lebewesen nur ver-

Aminosäure	3-Code	1-Code	Aminosäure	3-Code	1-Code
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Tabelle 2.1: Die 20 proteinogene Aminosäuren.

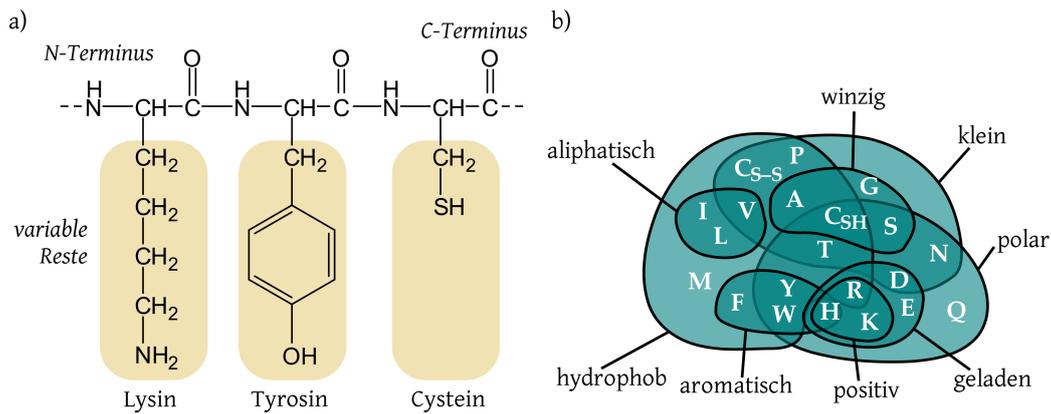


Abbildung 2.1: a) Struktur einer Aminosäurekette, b) Aminosäuren gruppiert nach ihren chemischen Eigenschaften [2].

einzelnt vor. Sie werden unabhängig vom proteinogenen Stoffwechsel synthetisiert und sind daher nichtproteinogen. Durch die Stereoselektivität der meisten Enzyme werden synthetische Peptide aus d-Aminosäuren im Organismus nur langsam abgebaut und bieten damit einen Ansatzpunkt für Wirkstoffe auf Peptidbasis. [1]

Die Struktur eines Proteins wird in vier Ebenen unterteilt:

1. **Primärstruktur:** Sequenz der Aminosäuren.
2. **Sekundärstruktur:** lokale Strukturelemente, welche durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Die häufigsten Vertreter sind α -Helices und β -Faltblätter.
3. **Tertiärstruktur:** Räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander. Diese wird meist durch hydrophobe Wechselwirkungen, Disulfidbrücken, etc. innerhalb des Proteins stabilisiert.
4. **Quartärstruktur:** Räumliche Anordnung mehrerer Proteine zu einem Komplex.

Die meisten Proteine falten sich selbständig zu einer dreidimensionalen Struktur, angetrieben durch die chemischen Eigenschaften ihrer Aminosäuren. Manche Proteine benötigen zur korrekten Faltung die Hilfe von sog. *Chaperonen*. Zusätzlich werden in vielen Organismen wichtige Schritte der Proteinfaltung durch Enzyme katalysiert, um die Geschwindigkeit zu erhöhen.

Ein für diese Arbeit wichtiges Beispiel sind die *Isomerasen*. Im Prozess der Proteinfaltung ist es nötig, chemische Bindungen bestimmter Aminosäuren um 180° zu rotieren. Es findet also ein Übergang von der *trans*- in die *cis*- Konfiguration dieser Aminosäuren statt. Bei Raumtemperatur ist die Wahrscheinlichkeit für eine solche Rotation sehr gering und die Reaktion läuft sehr langsam ab. Alle höheren Organismen besitzen deshalb Enzyme, welche die Reaktion stark beschleunigen. Eine Klasse sind die *peptidyl-prolyl-cis/trans*-Isomerasen (kurz *PPIase*), welche die Peptidbindung von Prolin isomerisieren (siehe Abb. 2.2).

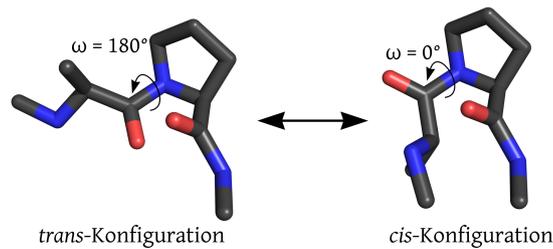


Abbildung 2.2: Übergang einer Peptidbindung von der *trans*- in die *cis*-Konfiguration.

2.2 Magnetische Resonanz

Das erste Experiment zum Nachweis der Magnetresonanz wurde 1937 von I. I. Rabi an der Columbia University (USA) durchgeführt. Zuvor hatte er die bis dahin aufgestellten Theorien aus den 1920er und 30er Jahren um den zuvor vernachlässigten Kernspin von Atomen erweitert. Das Experiment wird als *Molekularstrahl-Magnetresonanz-Methode* bezeichnet. Dabei passiert ein feiner Strahl aus Molekülen nacheinander zwei gegensätzlich gepolte Magnetfeldgradienten. Im ungestörten System hebt sich die Ablenkung der Moleküle durch die Magnetfelder auf und der Strahl kann eine nachgeschaltete Lochblende passieren. Zwischen beiden Gradienten werden die Moleküle nun mit schnell oszillierenden elektromagnetischen Wellen bestrahlt. Ist die Stärke der Magnetfelder und die elektromagnetische Strahlung richtig aufeinander abgestimmt, so findet ein Resonanzübergang in den Molekülen statt und der Strahl wird nicht mehr auf die Lochblende refokussiert. Die Intensitätsverteilung des Molekularstrahls bei veränderlichem Magnetfeld zeigt dann ein Magnetresonanzspektrum.

Die Magnetresonanz kann auch in anderen Spinsystemen mit vorhandenem magnetischen Moment beobachtet werden: Sowohl als *Elektronenspinresonanz* (*electron paramagnetic resonance, EPR*) in Atomen mit paramagnetischer Elektronenkonfiguration, als auch als *Kernspinresonanz* in bestimmten Atomkernen.

Die Elektronenspinresonanz konnte 1944 erstmals von dem sowjetischen Physiker E. Zavoisky an der Kazan State University (USA) demonstriert werden.

Der Grundstein der modernen Kernspinresonanz wurde 1945 durch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gelegt. E. M. Purcell, H. C. Torrey und R. V. Pound beobachteten an der Harvard University (USA) die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Kernspinresonanz, während zeitgleich F. Bloch, W. W. Hansen und M. Packard an der Stanford University (USA) ein vom Atomkern durch Induktion ausgesandtes Signal untersuchten. Die zahlreichen nachfolgenden Veröffentlichungen wurden ab diesem Zeitpunkt unter dem Begriff *nuclear magnetic resonance* (NMR) zusammengefasst [3].

Im Verlauf dieses Kapitels werden die theoretischen Grundlagen der Magnetresonanzspektroskopie vorgestellt. Neben der Signalentstehung wird ihre mathematische Beschreibung

durch das klassische Vektor-Modell und durch den quantenmechanischen Produktoperator-Formalismus erläutert. Eine ausführliche Darstellung ist in [4, 5, 6] gezeigt.

2.2.1 Die Entstehung des MR Signals

Die magnetische Resonanz tritt bei Teilchen mit ungeradzahligem Spin (z. B. $S = \frac{1}{2}$) in Erscheinung, während sie sich in einem äußeren Magnetfeld mit der magnetischen Flussdichte B_0 befinden. Dieser sog. *Zeeman-Effekt* sorgt dafür, dass Teilchen mit einer Spinorientierung parallel zum äußeren Magnetfeld (magnetische Komponente $m_s = +\frac{1}{2}$) eine niedrigere Energie besitzen, als Teilchen mit antiparallel ausgerichtetem Spin (magnetische Komponente $m_s = -\frac{1}{2}$).

Die Energiedifferenz der beiden Niveaus ist gegeben durch

$$\Delta E = -g\mu m_I B_0 \quad (2.1)$$

Darin ist g der Landé-Faktor des Teilchens I , $\mu = \gamma\hbar I$ sein magnetisches Moment und m_I seine magnetische Spinquantenzahl.

Mit der Auswahlregel $\Delta m = 1$ und dem Planckschen Gesetz $E = h\nu$ ergibt sich als Resonanzfrequenz ω_L für den Übergang zwischen beiden Energieniveaus¹:

$$\omega_L = -\gamma B_0 \quad (2.2)$$

Darin ist $\gamma = \frac{g\mu}{\hbar}$ das gyromagnetische Verhältnis des Teilchens. ω_L wird auch als *Larmorfrequenz* bezeichnet. Bei einem äußeren Magnetfeld von 1 Tesla ist $\omega_L \approx 30$ GHz für Elektronen bzw. $\omega_L \approx 42$ MHz für Wasserstoffkerne.

In dieser Arbeit werden nur Teilchen mit Spin $I = \frac{1}{2}$ betrachtet. Die wichtigsten Beispiele hierfür sind die Kernspins ^1H , ^{13}C und ^{15}N sowie der resultierende Elektronenspin paramagnetischer Elemente.

Im thermischen Gleichgewicht weisen die Energiezustände $|\alpha\rangle$ (parallel zum äußeren Feld) oder $|\beta\rangle$ (antiparallel zum äußeren Feld) einen Besetzungsunterschied aufgrund der Boltzmann-Verteilung auf:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} = e^{-\frac{\gamma\hbar B_0}{k_B T}} \quad (2.3)$$

Bei Raumtemperatur ist die Abweichung von der Gleichbesetzung sehr gering ($N_\beta/N_\alpha \approx 0,99994$ für ^1H mit $B_0 = 17,6$ T). Der geringe Besetzungsunterschied verursacht eine ge-

¹In der NMR-Literatur wird häufig das Minuszeichen vernachlässigt und als Konvention $\omega_L = \gamma B_0$ verwendet.

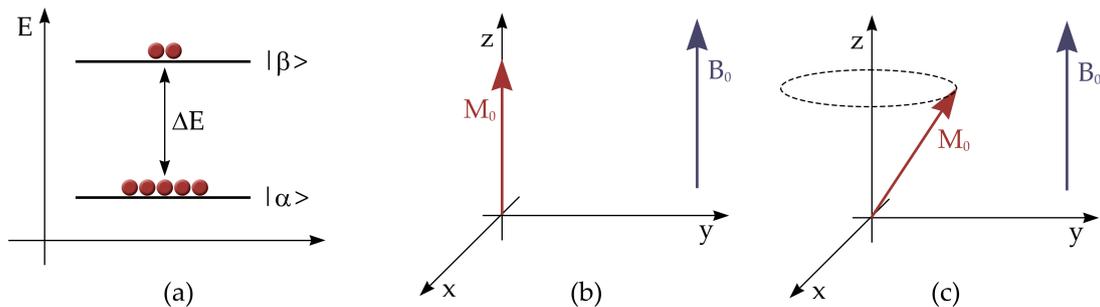


Abbildung 2.3: (a) Besetzung der Zeeman-Energieniveaus, (b) makroskopische Magnetisierung M_0 , (c) Präzession der makroskopischen Magnetisierung M_0 um das äußere Magnetfeld B_0

ringförmige makroskopische Nettomagnetisierung der Probe, die üblicherweise durch den Magnetisierungsvektor \vec{M} dargestellt wird. Seine z -Komponente M_z zeigt in Richtung von \vec{B}_0 .

Das klassische Vektor-Modell

Im thermischen Gleichgewicht stehen \vec{B}_0 und \vec{M} parallel, d. h. $\vec{M} = (0, 0, M_z)$. M_z ist allerdings zu klein, als dass es direkt nachgewiesen werden könnte [7]. Ein MR-Signal wird deshalb auf folgende Weise detektiert:

Durch einen Hochfrequenzresonator wird ein Radiofrequenzpuls ausgesendet, der am Ort der Probe ein zweites Magnetfeld \vec{B}_1 erzeugt. Dieses steht senkrecht auf \vec{B}_0 und addiert sich mit diesem zum Gesamtmagnetfeld $\vec{B} = \vec{B}_0 + \vec{B}_1$. Die Magnetisierung \vec{M} der Probe erfährt ein Drehmoment proportional zu $\vec{M} \times \vec{B}$, wird aus ihrer Ruhelage ausgelenkt und präzediert um \vec{B} . Über Dauer und Leistung des RF-Pulses kann der Auslenkwinkel bestimmt werden. Ein Puls, der \vec{M} in die xy -Ebene kippt, wird 90°-Puls genannt.

Wird \vec{B}_1 abgeschaltet, präzediert \vec{M} weiter um \vec{B}_0 , kehrt aber langsam wieder in die Ruhelage zurück. Solange die Transversalkomponente von \vec{M} dabei noch nicht Null ist, wird in der Hochfrequenzspule eine oszillierende Spannung induziert, die exponentiell abklingt – das sogenannte *free induction decay* (FID). Das FID kann durch Fourier-Transformation in ein MR-Spektrum überführt werden.

2.3 NMR-Spektroskopie

2.3.1 Chemische Verschiebung

Der augenscheinliche Informationsgehalt eines NMR-Spektrums ist die *chemische Verschiebung* δ . Bewegliche Elektronen, welche die Atomkerne umgeben, induzieren am Ort jedes Atomkerns ein lokales magnetisches Feld, welches sich mit dem äußeren Magnetfeld B_0

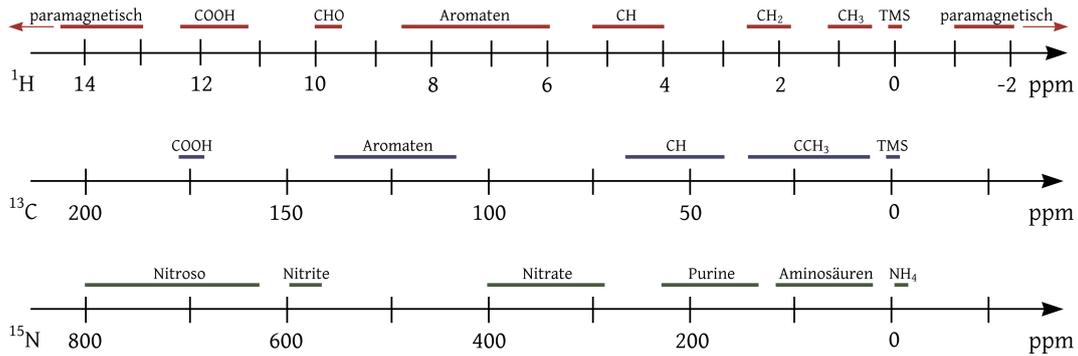


Abbildung 2.4: typische chemische Verschiebungen für ^1H , ^{13}C und ^{15}N

überlagert. Das effektive Magnetfeld am jeweiligen Kernort ist $B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma)$. Die Abschirmung des Kerns kann anisotropisch sein und wird durch den *chemical shift tensor* σ beschrieben.

Die Larmorfrequenz eines bestimmten Atomkerns abgeschirmt durch eine Elektronenwolke ist damit:

$$\omega = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma) \quad (2.4)$$

In der Praxis wird die chemische Verschiebung δ in *parts per million* (ppm) relativ zum Referenzsignal eines Standardmoleküls (z. B. *Tetramethylsilan, TMS*) gemessen:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_0}{\omega_0} \cdot 10^6 = (\sigma_{\text{ref}} - \sigma) \cdot 10^6 \quad (2.5)$$

Eine Übersicht typischer chemischer Verschiebungen für ^1H , ^{13}C und ^{15}N Kerne ist in Abb 2.4 gezeigt.

2.3.2 J-Kopplung

Die *J-Kopplung* (auch als *skalare Kopplung* bezeichnet) tritt bei Kernspins auf, die über eine oder mehrere chemische Bindungen miteinander verbunden sind. Sie entsteht durch die Wechselwirkung der beteiligten Kernspins mit den Elektronenspins, welche die chemische Bindung bilden. Sie wird im Folgenden durch ein einfaches Beispiel illustriert.

Zwei Kernspins sind über eine chemische Bindung, die durch zwei Elektronen gebildet wird, miteinander gekoppelt. Die Elektronenspins genügen dem Pauli-Prinzip und nehmen einen „up-down“- bzw. „down-up“-Zustand ein. Durch die magnetische Hyperfeinwechselwirkung kommt es nun zu einer Interaktion der Kernspins mit dem jeweils nächstgelegenen Elektron. Die Kernspins können relativ zueinander zwei verschiedene Zustände einnehmen - parallel zueinander oder entgegengerichtet (siehe Abb 2.5). Bei paralleler Ausrichtung der

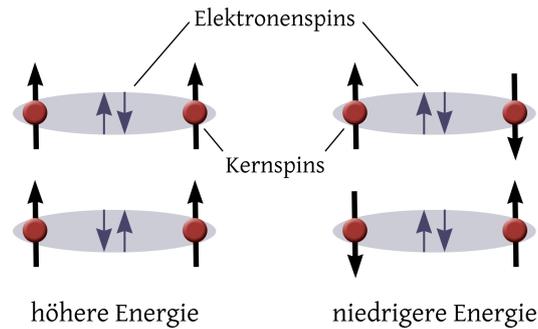


Abbildung 2.5: Mechanismus der J-Kopplung

Kernspins zueinander ist immer einer der Kernspins auch parallel zu einem Elektronenspin ausgerichtet, was zu einer geringen Energieerhöhung dieses Zustandes führt. Im Fall der antiparallel ausgerichteten Kernspins sind sie auch zu den Elektronenspins antiparallel ausgerichtet, was eine leichte energetische Absenkung dieser Konfiguration bewirkt.

Die geringe Energiedifferenz der beschriebenen Zustände wird im NMR-Spektrum als Multiplett-Aufspaltung der J-gekoppelten Kernspins sichtbar (Größenordnung 1-100 Hz). Die Multiplizität und Intensität der Signale lässt sich nach dem Pascal'schen Dreieck berechnen. Allgemein ist die Multiplizität gegeben durch $m = 2nI + 1$, worin I die Spinquanzenzahl des Kernspins und n die Anzahl der beteiligten Kernspins ist. Für ein J-gekoppeltes Spinsystem aus drei homonuklearen Kernspins ergibt sich beispielsweise ein Quatruplett mit der Intensitätsverteilung 1-3-3-1.

2.3.3 Produktoperator-Formalismus

Das oben vorgestellte klassische Vektor-Modell beschreibt die Vorgänge während eines NMR-Experiments auf makroskopischer Ebene. In der hochaufgelösten NMR-Spektroskopie werden jedoch Effekte sichtbar, die sich nur schwer mit dem Vektor-Modell beschreiben lassen, z. B. die *J-Kopplung* zweier Kernspins über ihre chemischen Bindungen. Hierfür wurde der Produktoperator-Formalismus entwickelt.

2.3.3.1 Dichteoperator und makroskopische Magnetisierung

Eine Probe im NMR-Experiment kann in guter Näherung als Ensemble von Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen dargestellt werden, die untereinander nicht wechselwirken. Der Zustand eines einzelnen Spins $|\psi\rangle = c_\alpha |\alpha\rangle + c_\beta |\beta\rangle$ wird üblicherweise durch den Zustandsvektor

$$|\psi\rangle = \begin{pmatrix} c_\alpha \\ c_\beta \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

abgekürzt. Darin sind c_α und c_β die sog. Superpositionskoeffizienten. Die beiden Zeeman-

Eigenzustände werden geschrieben als

$$|\alpha\rangle = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}; \quad |\beta\rangle = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} \quad (2.7)$$

Der Erwartungswert eines Operators \hat{Q} wird beschrieben durch

$$\langle \hat{Q} \rangle = \langle \psi | \hat{Q} | \psi \rangle \quad (2.8)$$

und kann umgeschrieben werden zu

$$\langle \hat{Q} \rangle = \text{Tr} \{ |\psi\rangle \langle \psi | \hat{Q} \} \quad (2.9)$$

Diese Darstellung bietet einige Vorteile, sobald man ein System mit vielen Spins betrachtet. Die Zustände dieser Spins sind $|\psi_1\rangle, |\psi_2\rangle, \dots$. Das Ergebnis einer einzelnen Messung des Erwartungswertes von \hat{Q} kann aufgrund der Unbestimmtheitsrelation der Quantenmechanik nicht vorhergesagt werden, wohl aber der Mittelwert vieler Messungen:

$$Q_{\text{obs(average)}} = \langle \psi_1 | \hat{Q} | \psi_1 \rangle + \langle \psi_2 | \hat{Q} | \psi_2 \rangle + \dots$$

umgeschrieben

$$Q_{\text{obs(average)}} = \text{Tr} \{ (|\psi_1\rangle \langle \psi_1 | + |\psi_2\rangle \langle \psi_2 | + \dots) \hat{Q} \} \quad (2.10)$$

Man definiert nun einen weiteren Operator $\hat{\rho}$, der aus historischen Gründen als *Dichteoperator* bezeichnet wird:

$$\hat{\rho} = \frac{1}{N} (|\psi_1\rangle \langle \psi_1 | + |\psi_2\rangle \langle \psi_2 | + \dots) = \overline{|\psi\rangle \langle \psi |} \quad (2.11)$$

Darin ist N die Anzahl der Spins im Ensemble. Damit ergibt die makroskopische Messung von Q für das gesamte Ensemble in guter Näherung

$$\frac{1}{N} Q_{\text{makro}} \cong \text{Tr} \{ \hat{\rho} \hat{Q} \}$$

Üblicherweise wird diese Gleichung geschrieben als

$$\langle Q \rangle = \text{Tr} \{ \hat{\rho} \hat{Q} \} \quad (2.12)$$

Diese Gleichung besagt, dass das Ergebnis jeder makroskopischer Messung am beschriebenen Spin-System aus zwei Operatoren ($\hat{\rho}$ und \hat{Q}) berechnet werden kann und zwar unab-

hängig von der tatsächlichen Anzahl der Spins. Damit vereinfacht sich die Fragestellung dramatisch: Anstatt der Summation über 10^{22} Spinzustände genügt die Angabe des Dichteoperators $\hat{\rho}$. Das Ergebnis der Messung entspricht dann dem Erwartungswert von \hat{Q} .

Für ein Ensemble von nicht-wechselwirkenden Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen nimmt die Matrixdarstellung des Dichteoperators folgende Form an:

$$\hat{\rho} = \begin{pmatrix} \rho_{\alpha\alpha} & \rho_{\alpha\beta} \\ \rho_{\beta\alpha} & \rho_{\beta\beta} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \overline{c_\alpha c_\alpha^*} & \overline{c_\alpha c_\beta^*} \\ \overline{c_\beta c_\alpha^*} & \overline{c_\beta c_\beta^*} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \rho_\alpha & \rho_+ \\ \rho_- & \rho_\beta \end{pmatrix} \quad (2.13)$$

Darin sind die Diagonalelemente ρ_α und ρ_β sog. *Populations* der Zustände $|\alpha\rangle$ und $|\beta\rangle$. Die Nebendiagonalelemente ρ_+ und ρ_- sind die sog. *Kohärenzen* zwischen den Zuständen $|\alpha\rangle$ und $|\beta\rangle$. Nur die Kohärenzen (genauer: nur die Ein-Quanten-Kohärenzen) führen zur Entstehung von detektierbarem NMR-Signal.

Wie bereits erwähnt, entsteht die makroskopische Magnetisierung der Probe durch Besetzungsunterschiede der Zustände $|\alpha\rangle$ und $|\beta\rangle$ aufgrund der Boltzmann-Verteilung. Der Magnetisierungsvektor $\vec{M} = (M_x, M_y, M_z)$ kann jetzt aus den Komponenten der Dichtematrix $\hat{\rho}$ bestimmt werden:

$$M_z = 2 \frac{1}{\mathfrak{B}} (\rho_\alpha - \rho_\beta) \quad (2.14)$$

$$M_x = 4 \frac{1}{\mathfrak{B}} \operatorname{Re} \{\rho_-\} \quad (2.15)$$

$$M_y = 4 \frac{1}{\mathfrak{B}} \operatorname{Im} \{\rho_-\} \quad (2.16)$$

mit dem Boltzmannfaktor $\mathfrak{B} = \frac{\hbar\gamma B_0}{k_B T}$.

Umgekehrt können auch die Populations und Kohärenzen (und somit $\hat{\rho}$) aus dem Magnetisierungsvektor \vec{M} berechnet werden:

$$\rho_\alpha = \frac{1}{2} + \frac{1}{4} \mathfrak{B} M_z \quad (2.17)$$

$$\rho_\beta = \frac{1}{2} - \frac{1}{4} \mathfrak{B} M_z \quad (2.18)$$

$$\rho_+ = \frac{1}{4} \mathfrak{B} (M_x - i M_y) \quad (2.19)$$

$$\rho_- = \frac{1}{4} \mathfrak{B} (M_x + i M_y) \quad (2.20)$$

Über den Dichteoperator kann also von der makroskopischen Magnetisierung auf den Ensemble-Zustand des Spin-Systems geschlossen werden und umgekehrt.

2.3.3.2 Rechenregeln für den Produktoperator-Formalismus

Mit Hilfe des Dichteoperators ist es möglich die Evolution eines Systems von Kernspins vollständig zu beschreiben. Die hierzu notwendigen Matrixberechnungen sind jedoch umfangreich und unübersichtlich. Für das praktische Design neuer NMR-Experimente und die Vorhersage ihrer Ergebnisse wurde deshalb der *Produktoperator-Formalismus* entwickelt. Er gilt für Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen. Eine ausführliche Darstellung findet sich in [5].

Im Produktoperator-Formalismus wird der Dichteoperator des Spinsystems als Linearkombination von Produkten der kartesischen Basisoperatoren ausgedrückt. Sie sind der Einheitsoperator \hat{E} und die drei Pauli-Spin-Matrizen $\hat{I}_x, \hat{I}_y, \hat{I}_z$:

$$\hat{\rho}(t) = a(t)\hat{E} + b_x(t)\hat{I}_x + b_y(t)\hat{I}_y + b_z(t)\hat{I}_z$$

mit

$$\hat{E} = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \hat{I}_x = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix}$$

$$\hat{I}_y = \frac{i}{2} \begin{bmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \quad \hat{I}_z = \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}$$

Die Zeitentwicklung des Dichteoperators (unter Vernachlässigung der Relaxation) wird beschrieben durch die *Liouville-von Neumann* Gleichung:

$$\frac{d\hat{\rho}(t)}{dt} - i [\mathcal{H}, \hat{\rho}(t)] \quad (2.21)$$

Darin ist \mathcal{H} der Hamilton-Operator, welcher die chemische Verschiebung, Kopplungsterme, etc. beinhaltet. Er wird als abschnittsweise zeitunabhängig angesehen. Damit kann die Gleichung umgeschrieben werden zu

$$\hat{\rho}(t) = e^{-i\mathcal{H}t} \hat{\rho}(0) e^{i\mathcal{H}t} \quad (2.22)$$

oder in der üblichen Notation:

$$\hat{\rho}^1 \xrightarrow{\mathcal{H}t} \hat{\rho}^2 \quad (2.23)$$

Dabei wird die Transformation eines initialen Dichteoperators $\hat{\rho}^1$ in einen neuen Operator $\hat{\rho}^2$ formal als Rotation unter dem Einfluss des jeweiligen Hamilton-Operators \mathcal{H} beschrieben.

In der NMR-Spektroskopie an Flüssigkeiten besteht der Hamilton-Operator aus drei relevanten Beiträgen: 1. RF-Puls, 2. chemische Verschiebung, 3. J-Kopplung. Relaxationsprozesse des Spinsystems zurück ins thermische Gleichgewicht werden zunächst nicht berücksichtigt. Wichtig ist, dass die Beiträge von chemischer Verschiebung und J-Kopplung zum Hamilton-Operator miteinander kommutieren.

Für jede der drei Beiträge zum Hamilton-Operator können nun einfache Rechenregeln aufgestellt werden, die die Lösung der *Liouville-von Neumann* Gleichung erlauben:

1. RF-Puls mit Winkel α

„On-resonante“ RF-Pulse entlang einer Polarisationsrichtung x oder y sorgen für eine Drehung des Spinsystems um die x - bzw. y -Achse. Die zugehörigen Hamilton-Operatoren können geschrieben werden als $\mathcal{H}t = \alpha I_x$ für einen Puls mit Polarisationsrichtung x und Drehwinkel α .

$$\begin{aligned} I_x &\xrightarrow{\alpha I_{\pm x}} I_x \\ I_y &\xrightarrow{\alpha I_{\pm x}} I_y \cos \alpha \pm I_z \sin \alpha \\ I_z &\xrightarrow{\alpha I_{\pm x}} I_z \cos \alpha \pm I_y \sin \alpha \\ I_x &\xrightarrow{\alpha I_{\pm y}} I_x \cos \alpha \pm I_z \sin \alpha \\ I_y &\xrightarrow{\alpha I_{\pm y}} I_y \\ I_z &\xrightarrow{\alpha I_{\pm y}} I_z \cos \alpha \pm I_x \sin \alpha \end{aligned}$$

2. Chemische Verschiebung

Im Zeitraum freier Präzession von Spin I nimmt der Hamilton-Operator der chemischen Verschiebung die Form $\mathcal{H} = \Omega_I I_z$ an, wobei Ω_I dem Offset von Spin I im Spektrum entspricht. Die Entwicklung der chemischen Verschiebung über die Wartezeit t wird beschrieben durch:

$$\begin{aligned} I_x &\xrightarrow{\Omega_I I_z t} I_x \cos(\Omega_I t) + I_y \sin(\Omega_I t) \\ I_y &\xrightarrow{\Omega_I I_z t} I_y \cos(\Omega_I t) - I_x \sin(\Omega_I t) \\ I_z &\xrightarrow{\Omega_I I_z t} I_z \end{aligned}$$

3. J-Kopplung

In einem schwach gekoppelten Zwei-Spin-System mit Spins I und S und der skalaren Kopplungskonstante J_{IS} nimmt der Hamilton-Operator die Form $\mathcal{H} = 2\pi J_{IS} I_z S_z$ an.

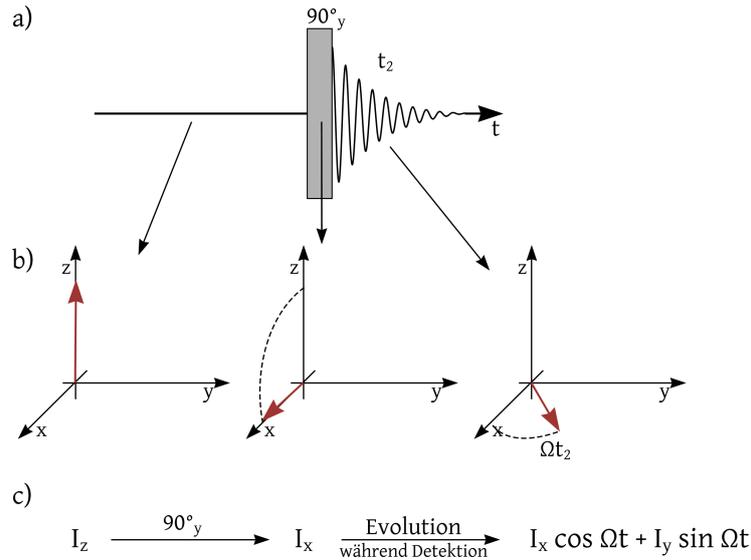


Abbildung 2.6: Beispiel für eine einfache Pulssequenz (a) mit Beschreibung über das Vektormodell (b) und den Produktoperatorformalismus (c). Abb. frei nach [4].

Die Entwicklung der J-Kopplung über die Wartezeit t wird beschrieben durch:

$$\begin{aligned}
 I_x &\xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} I_x \cos(2\pi J_{IS} t) + 2I_y S_z \sin(2\pi J_{IS} t) \\
 I_y &\xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} I_y \cos(2\pi J_{IS} t) - 2I_x S_z \sin(2\pi J_{IS} t) \\
 I_z &\xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} I_z \\
 2I_x S_z &\xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} 2I_x S_z \cos(2\pi J_{IS} t) + I_y \sin(2\pi J_{IS} t) \\
 2I_y S_z &\xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} 2I_y S_z \cos(2\pi J_{IS} t) - I_x \sin(2\pi J_{IS} t) \\
 2I_z S_z &\xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} 2I_z S_z
 \end{aligned}$$

Da die Hamilton-Operatoren der chemischen Verschiebung und der J-Kopplung miteinander kommutieren, können die Berechnungen von Experimenten in mehrere Abschnitte zerlegt werden. In den folgenden Abschnitten werden solche Berechnungen für einige Standardexperimente vorgeführt.

2.3.4 Spin-Echo

Spin-Echos zählen zu den Standardbausteinen für Pulssequenzen in der modernen NMR-Spektroskopie [7]. Von ihnen wird später der Polarisationstransfer in einem heteronuklearen Spinsystem sowie viele mehrdimensionale Experimente abgeleitet.

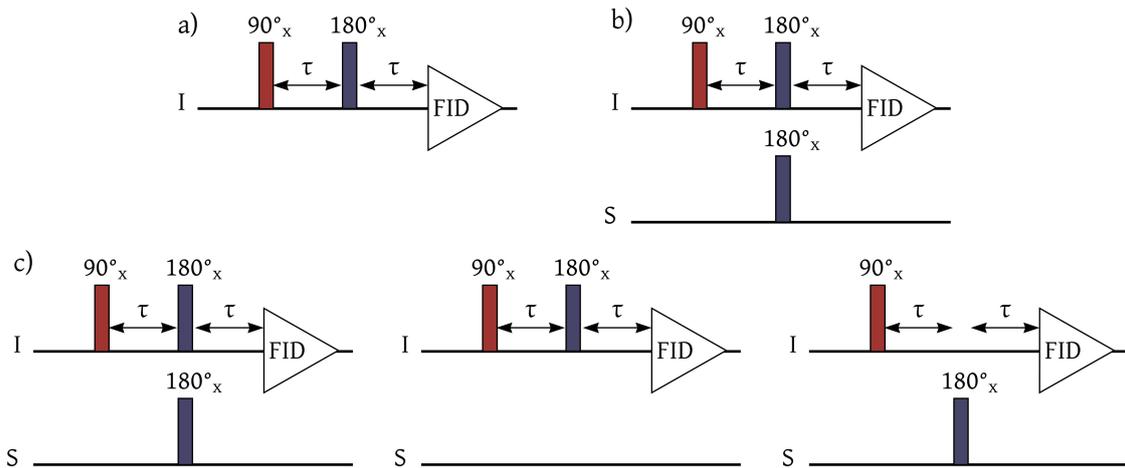


Abbildung 2.7: Pulssequenzen für Spin-Echos. a) ein-Spin-System b) homonukleares zwei-Spin-System c) heteronukleares zwei-Spin-System

2.3.4.1 Ein-Spin-System

Nach dem ersten 90°_x -Puls befindet sich der Dichteoperator im Zustand $-I_y$. Während der Zeit τ wirkt die chemische Verschiebung ΩI_z :

$$-I_y \xrightarrow{\Omega I_z \tau} -I_y \cos \Omega \tau + I_x \sin \Omega \tau \quad (2.24)$$

Es folgt ein 180°_x -Puls:

$$\begin{aligned} -I_y \cos \Omega \tau + I_x \sin \Omega \tau &\xrightarrow{\pi I_x} -I_y \cos(\Omega \tau) \cos \pi - I_z \cos(\Omega \tau) \sin \pi + I_x \sin \Omega \tau \\ &\xrightarrow{\pi I_x} I_y \cos(\Omega \tau) + I_x \sin(\Omega \tau) \end{aligned}$$

Während der zweiten Wartezeit τ wirkt erneut die chemische Verschiebung ΩI_z :

$$\begin{aligned} I_y \cos(\Omega \tau) + I_x \sin(\Omega \tau) &\xrightarrow{\Omega I_z \tau} I_y \cos(\Omega \tau) \cos(\Omega \tau) - I_x \sin(\Omega \tau) \cos(\Omega \tau) \\ &\quad + I_x \sin(\Omega \tau) \cos(\Omega \tau) + I_y \sin(\Omega \tau) \sin(\Omega \tau) \\ &\xrightarrow{\Omega I_z \tau} I_y \end{aligned}$$

mit $\cos^2 \Theta + \sin^2 \Theta = 1$. Für die gesamte Pulssequenz erhält man also:

$$I_z \xrightarrow{90^\circ_x - \tau - 180^\circ_x - \tau} I_y$$

Das Ergebnis ist unabhängig von der chemischen Verschiebung Ω und der Wartezeit τ . Die

chemische Verschiebung wird durch diese Pulssequenz *refokussiert*.

2.3.4.2 Homonukleares Zwei-Spin-System

Gegeben ist ein Zwei-Spin-System I, S . Es befindet sich zu Anfang im Zustand I_x (wie sich später zeigen wird ist der Ausgangspunkt unerheblich). Aus dem vorherigen Abschnitt ist bekannt, dass ein Spin-Echo im Ein-Spin-System die chemische Verschiebung refokussiert. Es genügt deshalb hier nur die J-Kopplung zu betrachten. Während der ersten Wartezeit τ entwickelt sie sich wie folgt:

$$I_x \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z \tau} I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau)$$

Der 180°_x -Puls wirkt auf beide Spins:

$$\begin{aligned} I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) &\xrightarrow{\pi I_x} I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) - 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \\ I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) - 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) &\xrightarrow{\pi S_x} I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \end{aligned}$$

Der 180°_x -Puls hat also keine Auswirkungen gezeigt und kann für die weitere Berechnung vernachlässigt werden. Relevant ist nur die Evolution der J-Kopplung über die Zeitdauer 2τ :

$$I_x \xrightarrow{\tau - 180^\circ_x - \tau} I_x \cos(2\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin(2\pi J_{IS} \tau)$$

Wählt man $\tau = \frac{1}{4J_{IS}}$ findet eine vollständige Konvertierung in Antiphasen-Magnetisierung statt.

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass die Pulssequenz $-\tau - 180^\circ_x(I, S) - \tau$ äquivalent zur Sequenz $-2\tau - 180^\circ_x(I, S)$ ist. Die chemische Verschiebung wird also refokussiert und die J-Kopplung wirkt während der Zeit 2τ .

2.3.4.3 Heteronukleares Zwei-Spin-System

Im heteronuklearen Zwei-Spin-System kann der 180° -Puls der Spin-Echo-Sequenz auf beide Spins gleichzeitig, oder nur auf einen Spin gegeben werden. Die Resultate unterscheiden sich wie folgt:

180°-Puls auf Spin	chemische Verschiebung Ω_I	J-Kopplung J_{IS}
I, S	refokussiert	aktiv über 2τ
I	refokussiert	refokussiert
S	aktiv über 2τ	refokussiert

2.3.4.4 Polarisationstransfer

Eine direkte Anwendung des Spin-Echos im heteronuklearen Zwei-Spin-System ist der Transfer von Magnetisierung von einem Spinsystem auf ein anderes. Das zugehörige Experiment wird *Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer (INEPT)* genannt und gehört zu den essentiellen Bausteinen moderner NMR Spektroskopie. Ziel der INEPT-Sequenz ist es, Magnetisierung von einem Kernspin mit hoher Sensitivität (hohem gyromagnetischem Verhältnis γ_I , meist Protonen) auf einen Kernspin mit niedrigerer Sensitivität (niedrigerem gyromagnetischem Verhältnis γ_S , z. B. ^{13}C oder ^{15}N) zu übertragen, indem die J-Kopplung zwischen den beiden Kernen ausgenutzt wird. Durch den Magnetisierungstransfer wird das detektierbare Signal von ^{13}C bzw. ^{15}N verstärkt.

Die INEPT Pulssequenz gleicht dem heteronuklearen Spin-Echo:

$$\begin{array}{l}
 I \text{ spin: } 90^\circ_x - \tau - 180^\circ_x - \tau - 90^\circ_y \\
 S \text{ spin: } \quad \quad 180^\circ_x \quad \quad 90^\circ_x \quad -FID
 \end{array}$$

Zusätzlich zu den vorherigen Berechnungen wird hier auch der Boltzmann-Faktor $K_I = \frac{\hbar\omega_I}{4k_B T}$ für die initiale Magnetisierung im thermischen Gleichgewicht $K_I I_z$ berücksichtigt. Analog zu oben berechnet sich der Zustand des Spin-Systems nach der zweiten Wartezeit τ wie folgt:

$$K_I I_z \xrightarrow{\frac{\pi}{2} I_x - \tau - \pi(I_x + S_x) - \tau} K_I \left(I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(2\pi J_{IS} \tau) \right)$$

Danach wird ein 90°_y -Puls auf Spin I und ein 90°_x -Puls auf Spin S angewandt:

$$K_I \left(I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_x S_z \sin(2\pi J_{IS} \tau) \right) \xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_y + S_x)} K_I \left(I_y \cos(2\pi J_{IS} \tau) - 2I_z S_y \sin(2\pi J_{IS} \tau) \right)$$

Wird zu Beginn die Wartezeit $\tau = \frac{1}{4J_{IS}}$ gewählt, so ergibt sich als Magnetisierung am Ende der INEPT Sequenz $-\frac{\hbar\omega_I}{4k_B T} 2I_z S_y$, die am Spin S detektiert werden kann.

Im Unterschied dazu hätte eine direkte Anregung von Spin S mit einem 90°_x -Puls die Magnetisierung $-\frac{\hbar\omega_S}{4k_B T} S_y$ erzeugt, die um den Faktor $\frac{\omega_I}{\omega_S}$ geringer ausfällt. Der Signalgewinn einer INEPT-Sequenz gegenüber einem konventionellen Experiment ist damit

$$\frac{\text{INEPT}}{\text{konventionell}} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \quad (2.25)$$

Der Signalgewinn ist umso höher, je kleiner das gyromagnetische Verhältnis γ_S von Spin S ist.

2.3.5 Relaxation

Nach einer Störung des thermischen Gleichgewichts kehrt eine Probe mit zwei charakteristischen Zeitkonstanten wieder in den Gleichgewichtszustand zurück. Dieser Prozess wird *Relaxation* genannt. Man unterscheidet zwischen

1. Spin-Gitter-Relaxation (*longitudinale* bzw. T_1 -Relaxation) und
2. Spin-Spin-Relaxation (*transversale* bzw. T_2 -Relaxation).

Der Ursprung der Relaxation sind fluktuierende Magnetfelder am Ort der Kernspins. Diese entstehen z. B. durch thermische Bewegungen der Moleküle.

2.3.5.1 Spin-Gitter-Relaxation (T_1 -Relaxation)

Die Spin-Gitter-Relaxation beschreibt das Verhalten der z-Komponente der Magnetisierung einer Probe im Magnetfeld. Nachdem die Magnetisierung \vec{M} aus ihrer Ruhelage ausgelenkt wurde, sorgen Wechselwirkungen des Spin-Systems mit der Umgebung (dem „Gitter“) dafür, dass Übergänge zwischen den Energieniveaus stattfinden können. Die hierfür notwendige Energie wird von der Umgebung aufgebracht bzw. absorbiert. Der Prozess kann durch die phänomenologische Gleichung

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (2.26)$$

beschrieben werden und hat die Lösung:

$$M_z(t) = (M_z(0) - M_0) \cdot e^{-t/T_1} + M_0 \quad (2.27)$$

Die T_1 -Zeit für Protonen liegt meist im Bereich von einigen Millisekunden (im Festkörper) bis zu 10 Sekunden (in Flüssigkeiten).

2.3.5.2 Spin-Spin-Relaxation (T_2 -Relaxation)

Die Spin-Spin-Relaxation beschreibt die Dephasierung von ausgelenkten Spins in der x-y-Ebene. Nach der Anregung präzediert \vec{M} um \vec{B}_0 . Wechselwirkungen der Spins untereinander führen jedoch mit der Zeit dazu, dass sie ihre feste Phasenbeziehung zueinander verlieren. Der Vorgang kann durch die phänomenologische Gleichung

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -\frac{M_{x,y}}{T_2} \quad (2.28)$$

beschrieben werden. Ihre Lösung lautet:

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0) \cdot e^{-t/T_2} \quad (2.29)$$

Die T_2 -Relaxationszeit ist normalerweise kleiner als T_1 und liegt im Bereich von wenigen Mikrosekunden bis einigen Sekunden.

Die Gl. 2.26 und 2.28 sind die so genannten *Bloch-Gleichungen* [8] in differentieller Form.

2.3.6 Paramagnetische Relaxation

Paramagnetische Relaxation entsteht durch die Wechselwirkung von ungepaarten Elektronen-Spins mit Kern-Spins. Sie wird durch die *Solomon-Bloembergen-Gleichung* [9] beschrieben. Für nicht allzu hohe Feldstärken lautet sie:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = & \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 S(S+1)}{r^6} \\ & \cdot \left(\frac{\tau_c}{1 + (\omega_S - \omega_I)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_S + \omega_I)^2 \tau_c^2} \right) \\ & + \frac{2}{3} S(S+1) \left(\frac{A_C}{\hbar} \right)^2 \tau_S \\ & + \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{4\omega_I^2 g_e^4 \mu_B^4 S^2(S+1)^2}{(3kT)^2 r^6} \tau_r \end{aligned} \quad (2.30)$$

Darin sind T_1 die longitudinale, T_2 die transversale Relaxationszeit, γ das gyromagnetische Verhältnis von Kern bzw. Elektron, S der Spinzustand des paramagnetischen Ions, r der Abstand zwischen Kern und Elektron, ω die Larmorfrequenz von Kern bzw. Elektron und τ_c die effektive Korrelationszeit des Moleküls.

Die paramagnetische Relaxation besteht im Wesentlichen aus drei unabhängigen Komponenten:

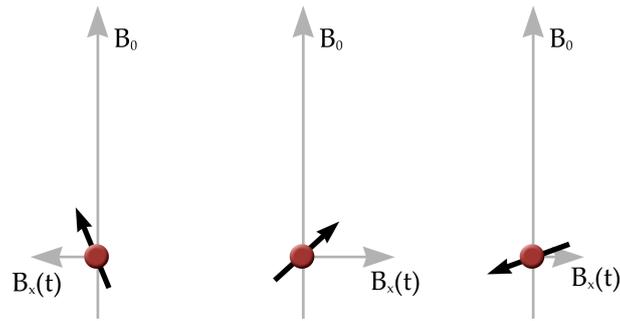


Abbildung 2.8: Überlagerung der Magnetfelder B_0 und $B_x(t)$ und ihre Auswirkungen auf das Spinsystem (Abb. frei nach [12])

1. Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Zeile 1-2 in Gl. 2.30)
2. Contact-Wechselwirkung (Zeile 3 in Gl. 2.30)
3. Curie-Spin-Relaxation (Zeile 4 in Gl. 2.30)

Für diese Arbeit ist nur die dipolare Wechselwirkung von Bedeutung. Contact-Relaxation tritt in Erscheinung, wenn eine kovalente Bindung zwischen den beteiligten Spins existiert. Wie später gezeigt wird, ist dies hier nicht der Fall und der entsprechende Term kann vernachlässigt werden [10]. Curie-Spin-Relaxation spielt hier ebenfalls keine Rolle, da bei den hier angewandten Magnetfeldstärken der Einfluss der dipolaren Relaxation immer deutlich überwiegt [10].

Im Folgenden wird die Herleitung der Solomon-Bloembergen-Gleichung skizziert. Eine ausführliche Darstellung findet sich in [10] und [11].

2.3.6.1 Modell: Random-Field-Relaxation

Gegeben ist ein System aus ungekoppelten Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen, die sich in einem statischen Magnetfeld B_0 entlang der z -Achse befinden. Außerdem wirkt ein zeitlich veränderliches Magnetfeld $B_x(t)$ entlang der x -Achse. B_0 ist dabei für alle Spins gleich, $B_x(t)$ für jeden Spin verschieden (Abb. 2.8).

Die Geschwindigkeit der Fluktuationen von $B_x(t)$ wird durch die *Autokorrelationsfunktion* $G(\tau)$ bestimmt. Diese beschreibt wie gut die Funktionswerte von $B_x(t)$ zu den Zeitpunkten t und $t + \tau$ zur Deckung gebracht werden können. Üblicherweise wird $G(\tau)$ durch eine Exponentialfunktion beschrieben:

$$G(\tau) = \langle B_x^2 \rangle e^{-|\tau|/\tau_c} \quad (2.31)$$

Der Parameter τ_c wird *Korrelationszeit* genannt. Sie wird bestimmt von den physikalischen Eigenschaften des Systems. Für schnell fluktuierende Magnetfelder nimmt τ_c sehr kleine Werte an, für langsam veränderliche Magnetfelder dagegen größere.

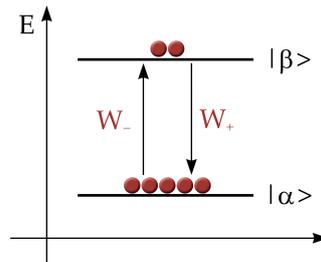


Abbildung 2.9: Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht (Abb. frei nach [12])

Über die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ kann nun die *spektrale Dichtefunktion* $J(\omega)$ definiert werden. Sie ist proportional zur Fouriertransformation von $G(\tau)$. Für den hier betrachteten Fall ist die *normierte spektrale Dichtefunktion* gleich

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (2.32)$$

Anschaulich beschreibt sie, bei welchen Frequenzen Relaxation stattfinden kann.

Übergangswahrscheinlichkeiten

Aus dem Modell der „Random-Field-Relaxation“ können nun die Wahrscheinlichkeiten für den Übergang der Spins zwischen den Energiezuständen $|\alpha\rangle$ und $|\beta\rangle$ berechnet werden (Abb. 2.9). Die vollständige Rechnung ist in [11] durchgeführt. Das Ergebnis ist

$$W_- = W_+ = W = \frac{1}{2} \gamma^2 \langle B_x^2 \rangle J(\omega_0) \quad (2.33)$$

Der Betrag der beiden Übergangswahrscheinlichkeiten ist gleich und proportional zur spektralen Dichtefunktion bei der Larmor-Frequenz ω_0 . Aus den Übergangswahrscheinlichkeiten wird im nächsten Abschnitt die T_1 -Relaxationszeit berechnet.

T_1 -Relaxation

Die Übergänge der Spins zwischen den beiden Zeeman-Eigenzuständen werden durch zwei Ratengleichungen beschrieben:

Änderung der Population von $|\alpha\rangle$:

$$\frac{d}{dt} \rho_\alpha = -W_- \rho_\alpha + W_+ \rho_\beta \quad (2.34)$$

Änderung der Population von $|\beta\rangle$:

$$\frac{d}{dt}\rho_\beta = +W_-\rho_\alpha - W_+\rho_\beta \quad (2.35)$$

Wie zuvor gezeigt, ist die z-Komponente des Magnetisierungsvektors proportional zum Besetzungsunterschied der Populationen $M_z = 2\frac{1}{\mathfrak{B}}(\rho_\alpha - \rho_\beta)$. Als Bewegungsgleichung ergibt sich daraus:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}M_z &= 2\frac{1}{\mathfrak{B}}\left(\frac{d}{dt}\rho_\alpha - \frac{d}{dt}\rho_\beta\right) \\ &= 4\frac{1}{\mathfrak{B}}(-W_-\rho_\alpha + W_+\rho_\beta) \\ &= -2W(M_z - 1) \end{aligned} \quad (2.36)$$

Die Lösung dieser Gleichung ist:

$$M_z(\tau) = (M_z(0) - 1)e^{-2W\tau} + 1 \quad (2.37)$$

aus Vergleich mit Gl. 2.27 erhält man schließlich:

$$\frac{1}{T_1} = 2W \quad (2.38)$$

Dieses Zwischenergebnis besagt, dass *die Spin-Gitter-Relaxationsrate proportional zur Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den Energiezuständen ist.*

Für das Modell der „Random-Field-Relaxation“ ergibt sich also durch Kombination von Gl. 2.38, 2.33 und 2.32 für die Spin-Gitter-Relaxationsrate:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \gamma^2 \langle B_x^2 \rangle \frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2}$$

Die „Random-Field-Relaxation“ ist das einfachste Modell zur Beschreibung von Relaxationsprozessen. Im folgenden Abschnitt wird die oben abgeleitete Proportionalität zwischen Spin-Gitter-Relaxationsrate und Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den Energiezuständen angewendet, um Relaxationsprozesse in dipolar gekoppelten Spinsystemen zu beschreiben.

2.3.6.2 Dipolare Relaxation

Der dipolare Anteil der paramagnetischen Relaxation beschreibt die Wechselwirkung von Kernspins mit Elektronen-Spins, welche beispielsweise an einem Metall-Atom lokalisiert sind.

Klassisch betrachtet kann die dipolare Relaxation als Kopplung zwischen zwei punktförmigen magnetischen Dipolen (Dipolmomente $\vec{\mu}_1$ und $\vec{\mu}_2$) im Abstand r dargestellt werden. Die Energie der Wechselwirkung ist:

$$E_{dipol} \propto \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3 (\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r}) (\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5}$$

Sie ist proportional zum Skalarprodukt der Dipolmomente und zu r^{-3} . Verändert sich nun die relative Orientierung der Dipole zueinander, z. B. durch Bewegungen von Dipol 1, so entsteht am Ort des zweiten Dipols ein fluktuierendes Magnetfeld. Dieses kann Spin-Übergänge von Dipol 2 induzieren und damit für Relaxation sorgen. Die Relaxationsrate ist proportional zu E_{dipol}^2 und damit auch zu r^{-6} :

$$\frac{1}{T_1} \propto E_{dipol}^2 \propto \frac{1}{r^6} \quad (2.39)$$

Für den hier behandelten Fall ist Dipol 1 ein ungepaarter Elektronen-Spin im Metall-Atom und Dipol 2 ein Protonen-Kernspin.

Fluktuierende Magnetfelder

Es gibt drei grundsätzliche Mechanismen, aus denen fluktuierende Magnetfelder entstehen können.

1. Elektronen-Spin-Relaxation
2. Bewegungen des Moleküls
3. chemischer Austausch

Wie in 2.3.6.1 erläutert, ist die Korrelationszeit τ_C ein Maß für die Geschwindigkeit der Magnetfeldänderung. Anschaulich ist τ_C derjenige Zeitraum, in dem das Magnetfeld am Ort des Kernspins als konstant genähert werden kann.

Übergangswahrscheinlichkeiten für dipolare Wechselwirkung

Die Berechnung der Relaxationszeiten erfolgt analog zu Abschnitt 2.3.6.1 aus den Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Energiezuständen des Spin-Systems. Man betrachtet ein System aus zwei gekoppelten Spins I und S . Die Kopplung erfolgt über Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Es existieren insgesamt vier Energieniveaus und zwölf Übergangswahrscheinlichkeiten. Die einzelnen Zustände sind $|\alpha\alpha\rangle$, $|\alpha\beta\rangle$, $|\beta\alpha\rangle$ und $|\beta\beta\rangle$. Sie werden *Zeeman-Produkt-Zustände* genannt. Die Notation $|\alpha\beta\rangle$ bedeutet, dass sich Spin I im

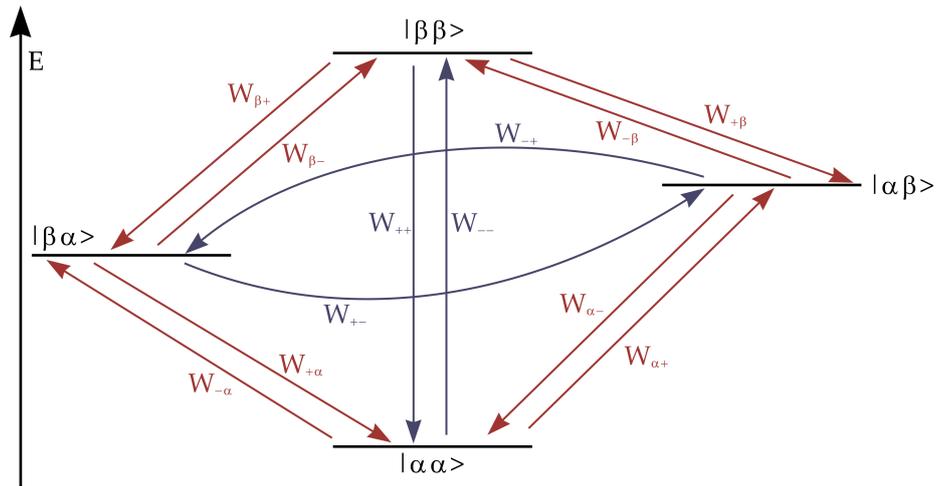


Abbildung 2.10: Energiediagramm für dipolare Wechselwirkung zwischen zwei Spins

Zustand α ($+\frac{1}{2}$) und Spin S im Zustand β ($-\frac{1}{2}$) befindet. I bezeichnet hier den Protonen-Kernspin und S das Elektron. In Abb. 2.10 ist das Energiediagramm mit den entsprechenden Übergängen gezeichnet.

Zwischen den Übergangswahrscheinlichkeiten existieren folgende Beziehungen:

$$W_{+\alpha} = W_{+\beta} = W_{\alpha+} = W_{\beta+} = W_1 \left(1 + \frac{1}{2} \mathfrak{B} \right) \quad (2.40)$$

$$W_{-\alpha} = W_{-\beta} = W_{\alpha-} = W_{\beta-} = W_1 \left(1 - \frac{1}{2} \mathfrak{B} \right) \quad (2.41)$$

$$W_{++} = W_2 \left(1 + \frac{1}{2} \mathfrak{B} \right) \quad (2.42)$$

$$W_{--} = W_2 \left(1 - \frac{1}{2} \mathfrak{B} \right) \quad (2.43)$$

$$W_{+-} = W_{-+} = W_0 \quad (2.44)$$

Darin ist W_1 die Wahrscheinlichkeit für den Single-Quanten-Übergang [11]

$$W_1 = \frac{3}{20} b^2 J(\omega_0) \quad (2.45)$$

mit $b = -\frac{\mu_0 \hbar \gamma^2}{4\pi r^3}$ und der spektralen Dichtefunktion $J(\omega_0)$ bei der Larmorfrequenz ω_0 .

W_2 ist die Wahrscheinlichkeit für den Doppel-Quanten-Übergang [11]

$$W_2 = \frac{3}{5} b^2 J(\omega_I + \omega_S) \quad (2.46)$$

W_0 ist die Wahrscheinlichkeit für den Null-Quanten-Übergang [11]

$$W_0 = \frac{1}{10} b^2 J (\omega_I - \omega_S) \quad (2.47)$$

Die T_1 -Relaxationszeit setzt sich bei dipolarer Kopplung aus allen drei Übergangswahrscheinlichkeiten zusammen:

$$\frac{1}{T_1} = W_0 + 2W_1 + W_2 \quad (2.48)$$

Sie kann nun explizit berechnet werden. Das Ergebnis ist die *Solomon-Bloembergen-Gleichung* für dipolare Relaxation (verallgemeinert für elektronische Spinzustände $\geq \frac{1}{2}$):

$$R_1 = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 S(S+1)}{r^6} \cdot \left(\frac{\tau_C}{1 + (\omega_S - \omega_I)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_S + \omega_I)^2 \tau_C^2} \right) \quad (2.49)$$

Wichtig ist auch hier der Zusammenhang $R \propto r^{-6}$. Der Verlauf der Solomon-Bloembergen-Gleichung für dipolare Relaxation wird vorrangig durch die Frequenzen ω_S und ω_I und durch die effektive Korrelationszeit τ_C charakterisiert. ω_S und ω_I werden durch den Messaufbau vorgegeben. Die Protonenresonanzfrequenz ω_I liegt hier zwischen 400 und 800 MHz, die Elektronenresonanzfrequenz bei $\omega_S = 658 \cdot \omega_I$.

Auf die Korrelationszeit soll nun etwas näher eingegangen werden.

Korrelationszeit

Die Korrelationszeit gibt an, wie schnell sich die fluktuierenden Magnetfelder am Ort des Kernspins ändern. Die veränderlichen Magnetfelder setzen sich dabei aus drei Komponenten zusammen: 1. Elektronen-Spin-Relaxation (elektronische Korrelationszeit τ_S), 2. Bewegungen des Moleküls (Rotationskorrelationszeit τ_r) und 3. chemischer Austausch (Korrelationszeit des chemischen Austausches τ_M). Sie addieren sich zur *effektiven Korrelationszeit* τ_C :

$$\frac{1}{\tau_C} = \frac{1}{\tau_S} + \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_M} \quad (2.50)$$

Die typischen Größenordnungen der einzelnen Korrelationszeiten sind in Abb. 2.11 dargestellt. Anhand der Gleichung 2.50 ist zu sehen, dass die effektive Korrelationszeit von der kürzesten Komponente dominiert wird, der elektronischen Korrelationszeit τ_S .

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der intermolekulare Abstand zweier Spins, die über Dipol-Dipol-Kopplung miteinander wechselwirken durch die Messung der T_1 -

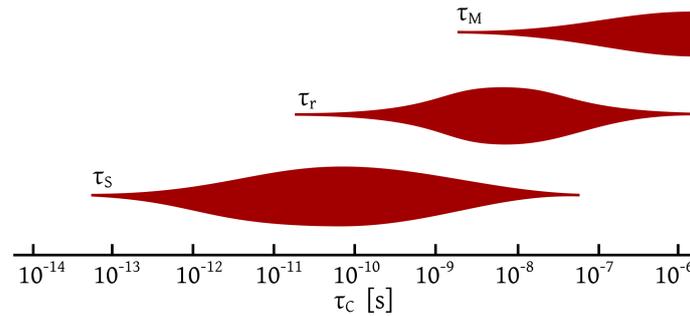


Abbildung 2.11: Einfluss von τ_s , τ_r und τ_M auf die effektive Korrelationszeit τ_c . (Abb. frei nach [6])

Relaxationszeit bestimmt werden kann. Der erste Spin ist in diesem Fall ein lokalisiertes Elektron am Eisenatom, der andere ist ein Proton im Wirkstoffmolekül.

2.3.6.3 Relaxation bei mehreren paramagnetischen Zentren

Bisher wurde nur die Wechselwirkung zwischen einem einzelnen Elektronen-Spin und einem Kern-Spin behandelt. Diese Näherung trifft wegen der starken r^{-6} -Abhängigkeit der Wechselwirkung in den meisten Fällen zu. Falls der Kernspin ungefähr gleich weit von zwei paramagnetischen Zentren entfernt ist, muss dies in der Berechnung berücksichtigt werden.

Für zwei Metall-Ionen A und B , die nicht miteinander, aber mit dem Kern N wechselwirken, verhält sich die Relaxationszeit wie:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1A}} + \frac{1}{T_{1B}} \quad (2.51)$$

Dabei sind T_{1A} und T_{1B} die Relaxationszeiten, welche jedes Metall-Ion verursachen würde, wenn das andere diamagnetisch wäre. Die Relaxationszeit des Kerns N wird im Einfluss von mehreren paramagnetischen Zentren noch stärker verkürzt.

2.3.7 Nuclear Overhauser Effect

Im Abschnitt 2.3.6.2 wurde die dipolare Relaxation zwischen Kern- und Elektronen-Spins vorgestellt. Ein analoger Effekt existiert auch für die Relaxation zwischen Kernspins, die nicht über kovalente Bindungen untereinander verfügen, sondern sich lediglich in räumlicher Nähe befinden.

Man betrachtet ein System, in dem die Kernspins I und S über dipolare Wechselwirkung miteinander gekoppelt sind. Nun werden die Übergänge von Spin S durch einen langen RF-Puls mit niedriger Leistung gesättigt (d. h. es liegt Gleichbesetzung der Populationen von Spin S vor). Der Puls ist so gewählt, dass Spin I nicht durch ihn beeinflusst wird. Trotzdem nimmt die Magnetisierung von Spin I einen neuen Wert an (*steady state*), der größer sein kann als im thermischen Gleichgewicht. Eine Sättigung von Spin S hat also

eine Änderung der Magnetisierung von Spin I hervorgerufen. Dieses Phänomen wird als *Nuclear Overhauser Effect* (NOE) bezeichnet.

Der NOE-Verstärkungsfaktor ϵ_{NOE} ist durch die *Solomon-Gleichung* gegeben [9]:

$$\epsilon_{NOE} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_{1S} + W_2} \quad (2.52)$$

Wie zuvor sind die Übergangswahrscheinlichkeiten W_0 , W_{1S} und W_2 durch die Gleichungen 2.45, 2.46 und 2.47 gegeben (siehe auch Abb. 2.10).

Im homonuklearen Fall ist $\gamma_I = \gamma_S$ und die NOE-Verstärkung beträgt bis zu 50%. Im heteronuklearen Fall wird die NOE-Verstärkung zusätzlich mit dem Quotienten der gyromagnetischen Verhältnisse multipliziert.

Die Übergangswahrscheinlichkeiten W_0 , W_{1S} und W_2 sind abhängig von der Korrelationszeit τ_c des Systems. Es werden zwei Grenzfälle unterschieden:

1. *Fast motion limit* wenn $\omega_0\tau_c \ll 1$. In diesem Fall wird ein positiver NOE beobachtet.
2. *Slow motion limit* wenn $\omega_0\tau_c \gg 1$. Hier ist der NOE-Verstärkungsfaktor negativ.

Die praktische Relevanz erhält der Nuclear Overhauser Effect durch die Tatsache, dass er nur bei räumlich benachbarten Kernspins auftritt (Entfernung unter 1 nm). Durch die Messung des NOE-Verstärkungsfaktors lassen sich räumliche Informationen über die dreidimensionale Struktur von Molekülen gewinnen. Das korrespondierende Experiment wird NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) genannt [13].

2.3.8 Mehrdimensionale Spektroskopie

In den vorhergehenden Abschnitten wurden die grundlegenden Beiträge zur Entstehung eines NMR-Spektrums vorgestellt. In diesem Abschnitt werden nun NMR-Spektroskopie-Experimente gezeigt, welche durch das geschickte Ausnutzen der zuvor dargestellten Effekte einen Informationsgewinn auf molekularer Ebene ermöglichen.

2.3.8.1 COSY

Das COSY (COrelated Spectroscopy) Experiment war das erste und zugleich einfachste 2D-NMR-Experiment [13]. Es zählt heute zum Standardrepertoire für die Signalzuordnung kleiner organischer Moleküle und Proteine.

Die Pulssequenz ist in Abb. 2.12 gezeigt. Im einfachsten Fall besteht ein COSY-Experiment aus zwei 90° -Pulsen, die durch eine variable Wartezeit (t_1) getrennt sind. Nach dem zweiten Puls folgt die Datenaquisition (t_2).

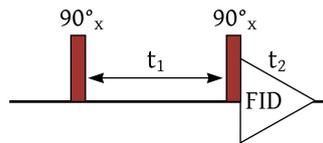


Abbildung 2.12: Pulssequenz für das COSY-Experiment.

Im 2D-COSY-Spektrum befindet sich auf der Diagonalen das gewohnte 1D-Spektrum der untersuchten Substanz. Die symmetrischen Kreuzsignale neben der Diagonalen entstehen durch Kohärenz-Transfers zwischen gekoppelten Kernspins. In der Praxis lassen sich Kopplungen zwischen Protonen beobachten, die nicht weiter als drei chemische Bindungen voneinander entfernt sind.

2.3.8.2 HSQC

HSQC steht für *Heteronuclear Single Quantum Correlation*. Im HSQC-Experiment wird die chemische Verschiebung Heteronuklearer Kerne, die über genau eine chemische Bindung miteinander wechselwirken, korreliert. Im zweidimensionalen HSQC zeigt eine Frequenzachse meist die Verschiebung von ^1H , die andere beispielsweise ^{13}C oder ^{15}N .

Im Abschnitt A der Pulssequenz findet ein Polarisationstransfer der Magnetisierung von Spin I auf Spin S statt. Er wurde bereits im Abschnitt 2.3.4.4 vorgestellt und berechnet. Wie zuvor wird die chemische Verschiebung von Spin I und S refokussiert und die J-Kopplung bleibt während der Wartezeit Δ aktiv. Außerdem wird $\Delta = \frac{1}{2J_{IS}}$ gewählt. Das Ergebnis ist:

$$I_z \xrightarrow{A} -2I_z S_y$$

Abschnitt B ist ein heteronukleares Spin-Echo mit einem 180° -Puls auf Spin I . Das bedeutet, dass die chemische Verschiebung von I und die J-Kopplung der Spins refokussiert wird. Nur die chemische Verschiebung von S wirkt während der Evolutionszeit t_1 .

$$-2I_z S_y \xrightarrow{\Omega_S t_1 S_z} -2I_z S_y \cos \Omega_S t_1 + 2I_z S_x \sin \Omega_S t_1$$

Es folgen je ein 90° -Puls auf Spin I und S :

$$-2I_z S_y \cos \Omega_S t_1 + 2I_z S_x \sin \Omega_S t_1 \xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_x + S_x)} -2I_y S_z \cos \Omega_S t_1 - \underbrace{2I_y S_x \sin \Omega_S t_1}_{\text{nicht observabel}}$$

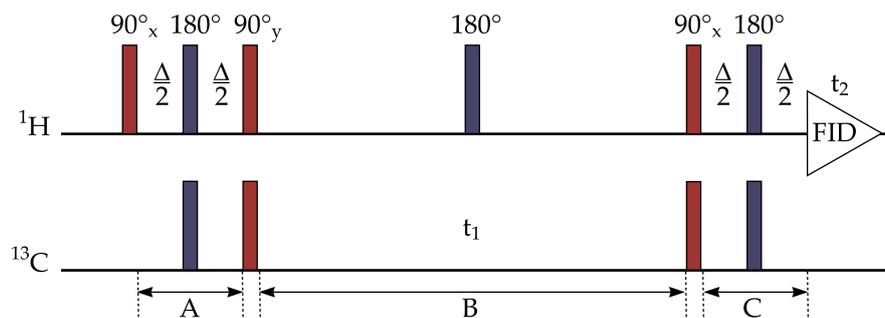


Abbildung 2.13: Pulssequenz für das HSQC-Experiment.

Der Term $-2I_y S_x \sin \Omega_S t_1$ beschreibt einen Mehrquantenzustand und ist nicht observabel. Die übrige Magnetisierung entwickelt sich im Abschnitt C wie folgt:

$$\begin{aligned}
 -2I_y S_z \cos \Omega_S t_1 &\xrightarrow{\pi J_{IS} I_z S_z \Delta} -2I_y S_z \cos(\pi J_{IS} \Delta) \cos(\Omega_S t_1) + I_x \sin(\pi J_{IS} \Delta) \cos \Omega_S t_1 \\
 &\xrightarrow{\pi J_{IS} I_z S_z \Delta} I_x \cos \Omega_S t_1
 \end{aligned}$$

Man detektiert ein Spektrum, welches in f_1 -Richtung die chemische Verschiebungsinformation von Spin S und in f_2 -Richtung diejenige von Spin I zeigt. In einem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum eines Proteins erscheint so für jede Aminosäure (außer Prolin) ein Signal. Es wird daher auch als Fingerabdruck eines Proteins verwendet.

2.4 Magnetische Suszeptibilität und Paramagnetismus

In einem äußeren magnetischen Feld entsteht in einer Probe die makroskopische Magnetisierung

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad (2.53)$$

mit der *magnetischen Suszeptibilität* $\chi = \mu_r - 1$ und der relativen Permeabilität $\mu_r = \mu/\mu_0$. Häufig wird die magnetische Suszeptibilität auch auf das molare Volumen V_m bezogen und dann als *molare magnetische Suszeptibilität* $\chi_m = \chi V_m$ bezeichnet.

χ kann sowohl positive als auch negative Werte annehmen. Für $\chi < 0$ ist die Magnetisierung entgegengesetzt dem äußeren magnetischen Feld. Die magnetische Induktion im Medium ist geringer als im Vakuum. Materialien mit dieser Eigenschaft werden als *diamagnetisch* bezeichnet. Für $\chi > 0$ bewirkt die Magnetisierung zusammen mit dem äußeren Magnetfeld eine erhöhte magnetische Induktion im Material. Solche Substanzen werden als *paramagnetisch* bezeichnet².

²Die Begriffe *diamagnetisch* und *paramagnetisch* gehen ursprünglich auf das Verhalten eines langen dünnen

Die Magnetisierung eines Mediums entspricht der Dichte seiner magnetischen Dipole

$$\vec{M} = \mathcal{N} \langle \vec{m} \rangle \quad (2.54)$$

In einer Probe der Temperatur T ist $\langle m_z \rangle = m_0 L(x)$ mit $x = \frac{m_0 |\vec{B}|}{k_B T}$ und der Langevinfunktion $L(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} - \frac{1}{x}$. Unter der Annahme dass $m_0 \vec{B} \ll kT$ ist die Magnetisierung einer solchen Probe

$$\vec{M} = \mu_0 \mathcal{N} L(x) \approx \frac{\mathcal{N} m_0^2 \vec{B}}{3k_B T} \quad (2.55)$$

Außerdem gilt für $\chi \ll 1$

$$\vec{M} = \frac{1}{\mu_0} \left(\frac{\chi}{1 + \chi} \right) \vec{B} \approx \frac{\chi}{\mu_0} \vec{B} \quad (2.56)$$

Aus den letzten beiden Gleichungen folgt, dass das permanente magnetische Dipolmoment der Moleküle folgenden Beitrag zur molaren Suszeptibilität liefert:

$$\chi_m = \chi V_m = \frac{\mu_0 m_0^2 N_A}{3k_B T} \quad (2.57)$$

Darin wurde $\mathcal{N} V_m = \frac{N V_m}{V} = \frac{n N_A V_m}{n V_m} = N_A$ mit der Avogadro-Konstante N_A und der Stoffmenge n verwendet. Dieser Ausdruck entspricht dem Curie-Gesetz für magnetische Suszeptibilität paramagnetischer Substanzen:

$$\chi_m = \frac{C}{T} \quad \text{mit } C = \frac{\mu_0 m_0^2 N_A}{3k_B} \quad (2.58)$$

Beitrag der Elektronen

Im Falle der *spin-only* Näherung wird das magnetische Moment ausschließlich vom Elektronenspin der Substanz verursacht. Es gilt

$$m_0^2 = S(S + 1) g_e^2 \mu_B^2 \quad (2.59)$$

bzw. allgemein [15]:

Zylinders aus den entsprechenden Materialien in einem Magnetfeld zurück. Ein diamagnetischer Stab liegt quer (griechisch *dia*) zum Magnetfeld, während ein paramagnetischer Stab sich parallel (griechisch *para* für *entlang*) ausrichtet [14].

$$\begin{aligned}\chi &= \frac{\mu_0 N_A g_e^2 \mu_B^2}{k_B T} \cdot \frac{(-S)^2 + (-S+1)^2 + \dots + (+S)^2}{2S+1} \\ &= \frac{\mu_0 N_A g_e^2 \mu_B^2}{3k_B T} \cdot S(S+1)\end{aligned}\quad (2.60)$$

mit der Spin-Quantenzahl S und dem Bohr'schen Magneton μ_B . Damit wird die paramagnetische Suszeptibilität zu

$$\chi_m = \frac{C}{T} \quad \text{mit } C = \frac{\mu_0 S(S+1) g_e^2 \mu_B^2 N_A}{3k_B} \quad (2.61)$$

2.5 Ligandenfeldtheorie

Die *Ligandenfeldtheorie* und ihr Vorgänger, die *Kristallfeldtheorie*, sind Modelle zur Beschreibung der elektronischen Struktur von Molekülkomplexen der Übergangsmetalle. Sie wurde maßgeblich von Hans Bethe und John H. van Vleck in den 1930er Jahren entwickelt [16].

Die Basis der Ligandenfeldtheorie ist die Wechselwirkung zwischen einem positiv geladenen Übergangsmetallion und negativen Punktladungen im Raum, welche durch nichtbindende Elektronenpaare der Liganden erzeugt werden. Übergangsmetalle zeichnen sich durch nicht vollständig besetzte d-Orbitale in der äußeren Elektronenhülle aus. Im freien Metallion sind die d-Orbitale energetisch entartet. Wird ein Übergangsmetallion jedoch in die Nähe des elektrischen Feldes eines Liganden gebracht, so sind einige der mit Elektronen besetzten d-Orbitale räumlich näher an den Elektronen des Liganden und verursachen eine Energieerhöhung durch die Abstoßung der gleichnamigen Ladungen. Die energetische Entartung der d-Orbitale des Übergangsmetallions wird bei Anwesenheit eines Liganden also aufgehoben und es kommt zu einer Energieaufspaltung Δ . Die Stärke der Aufspaltung hängt unter anderem von der Art des Metallions, dessen Oxidationszustands, der räumlichen Anordnung des Liganden und der Art des Liganden ab.

Für diese Arbeit sind vorrangig die Komplexe des Eisen(III)-Ions interessant. Fe(III) bildet, wie auch die meisten anderen Übergangsmetalle einen oktaedrischen Komplex, in dem das zentrale Eisenion von sechs Liganden umgeben ist.

In der oktaedralen Konfiguration entsteht eine Energieaufspaltung Δ_{oct} zwischen den energieärmeren Orbitalen d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} und den energiereicheren Orbitalen d_{z^2} , $d_{x^2-y^2}$. Wegen ihrer Symmetrieeigenschaften werden die Orbitale auch mit e_g (hier energieärmer) und t_{2g} (hier energiereicher) bezeichnet.

Low-Spin und *High-Spin* Komplexe

Im Falle der Anlagerung von sog. starken Liganden (z. B. CN^- oder CO) ist eine Besetzung der t_{2g} -Orbitale energetisch ungünstig. Gemäß der Hund'schen Regel werden deshalb zu-

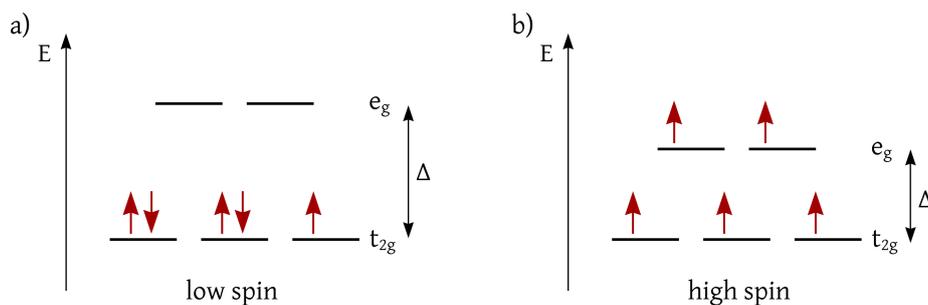


Abbildung 2.14: Kristallfelddiagramm für a) *low spin* und b) *high spin* Komplexe.

nächst die energieärmeren e_g -Orbitale voll besetzt. Da jedoch nur einfachbesetzte Orbitale zum effektiven Spinzustand beitragen, befindet sich der Komplex im *low spin* Zustand (siehe Abb. 2.14).

Ist das Übergangsmetallion von schwachen Liganden umgeben, fällt die Energieaufspaltung Δ der d-Orbitale geringer aus und die gegenseitige Abstoßung von zwei Elektronen im selben Orbital überwiegt. Es werden deshalb alle Orbitale zunächst mit einem Elektron besetzt. In dieser Konfiguration addieren sich die Spins der Elektronen zu einem *high spin* Zustand auf.

2.6 Moleküldynamiksimulation

Die meisten Methoden zur Aufklärung von Molekülstrukturen liefern kein fertiges Abbild des Moleküls, sondern vielmehr Hinweise in Form von Bindungswinkeln oder Abständen zwischen Atomen. Um aus diesen Informationen ein dreidimensionales Modell des Moleküls erstellen zu können, wird die Moleküldynamiksimulation verwendet. Sie basiert auf der *Anfinsen-Hypothese* [17]:

„Das globale Minimum der Energie eines Moleküls entspricht der nativen Struktur.“

Energiefunktionen In der Praxis wird deshalb die Gesamtenergie des Moleküls durch (klassische) Kraftfelder mit atomarer Auflösung beschrieben. Die Energiefunktionen bestehen aus zwei Anteilen:

$$E_{total} = E_{empirical} + E_{effective} \quad (2.62)$$

Der empirische Teil $E_{empirical} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihe} + E_{improper} + E_{vdW} + \dots$ beschreibt molekulare Parameter wie Atombindungen, Bindungswinkel, van-der-Waals-Wechselwirkungen, usw. Über den effektiven Teil $E_{effective} = E_{distance} + \dots$ der Energiefunktion werden die experimentellen Ergebnisse in die Simulation eingebracht, in dieser Arbeit z. B. berechnete intermolekulare Abstände.

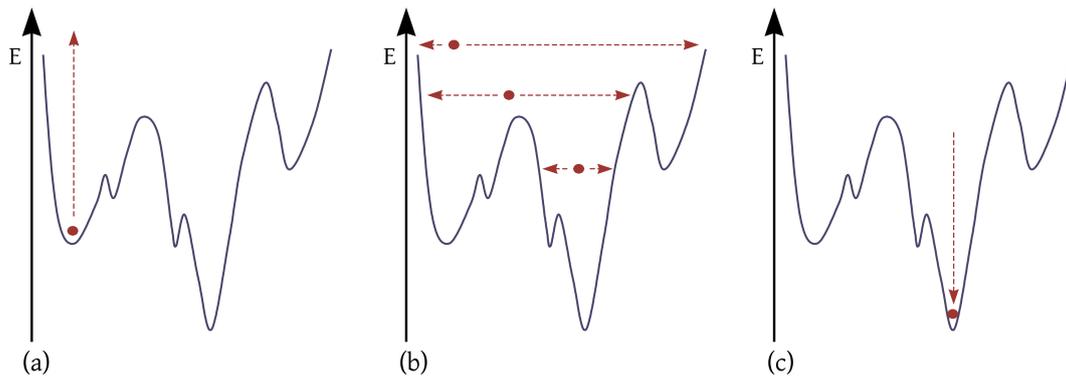


Abbildung 2.15: Simulated Annealing. (a) Aufheizen des Systems, (b) langsames Abkühlen, (c) System im globalen Minimum

Strategien zur Energieminimierung Ist die Energiefunktion aufgestellt, so muss ihr globales Energieminimum gefunden werden, welches laut der Anfinnen-Hypothese der nativen Struktur des Moleküls entspricht. In dieser Arbeit wird das sogenannte *Simulated Annealing* verwendet.

Simulated Annealing [18] ist eine Verallgemeinerung der Monte Carlo Methode zur Beschreibung des Zustandes eines Systems aus n Teilchen. *Annealing* hat seinen Ursprung in der Züchtung von Kristallen. Sehr große Einkristalle werden durch sehr langsames Abkühlen einer Schmelze hergestellt. Ein perfekter Einkristall repräsentiert das globale Energieminimum des festen Zustands. Schnelles Abkühlen würde ein Glas erzeugen (lokales Energieminimum).

In der Simulation wird die Probe zunächst auf sehr hohe Temperaturen (mehrere 1000 K) aufgeheizt. Ihr Zustand ist zu diesem Zeitpunkt völlig ungeordnet. Danach folgt eine sehr langsame Abkühlung, sodass näherungsweise immer das thermische Gleichgewicht herrscht. Bei jedem Temperaturschritt wird nun die Bewegung des Moleküls beobachtet und die zugehörige Energie berechnet. Falls die berechnete Energie kleiner ist als diejenige im vorhergehenden Schritt, wird die neue Konfiguration akzeptiert. Ist die berechnete Energie größer als die vorhergehende, so wird die Konfiguration mit einer Wahrscheinlichkeit proportional zum Boltzmannfaktor $e^{-dE/T}$ akzeptiert („Tunnelprozess durch Energiebarrieren“, dE ist der Energieunterschied der beiden Konfigurationen). Der gesamte Prozess wird genügend oft wiederholt, um den Konfigurationsraum gut abzudecken. Danach wird die Temperatur um einen Schritt erniedrigt und das Verfahren beginnt mit der im vorherigen Schritt energieärmsten Struktur als Startwert von neuem (Abb. 2.15).

Insgesamt sorgt dieses Vorgehen für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit das System im energetisch niedrigeren Zustand vorzufinden. Unendlich langsames Abkühlen würde im globalen Energieminimum enden. [19]

Dynamische Prozesse Die Moleküldynamiksimulation kann auch zur Darstellung dynamischer Prozesse verwendet werden. Dabei wird dem System eine gewisse Menge thermi-

sche Energie zugeführt und die Bewegungen jedes Atoms im zugehörigen Kraftfeld simuliert. Nach einer ausreichend langen Zeit (je nach Molekülgröße 1 - 100 ns oder mehr) können aus der gespeicherten Trajektorie bestimmte Eigenschaften des Moleküls, wie z. B. Flexibilität bestimmter Bereiche, Stabilität von gebundenen Liganden, usw. abgeleitet werden.

2.7 Docking

Das molekulare Docking ist eine Methode aus der Bioinformatik zur Vorhersage der Struktur eines Moleküls im Komplex mit einem zweiten. Die resultierenden Informationen über Stabilität, zugängliche Oberfläche und chemische Eigenschaften der Komplexe sind wichtige Ausgangspunkte für die Optimierung von Wirkstoffen.

Docking ist ein Optimierungsproblem um die beste Orientierung zweier Moleküle zueinander zu finden. Eine einfache Analogie ist das *Schlüssel-Schloss-Prinzip*, allerdings muss im Docking die Flexibilität der Moleküle berücksichtigt werden. Es wird deshalb versucht, den komplizierten Prozess der molekularen Erkennung im Computer zu simulieren.

Die Ausgangssituation bilden Protein und Ligand in einem bestimmten physikalischen Abstand zueinander. Der Ligand wird nun schrittweise in das aktive Zentrum des Proteins eingelagert. Diese Schritte können aus Rotationen und Translationen im Ortsraum, aber auch aus Bewegungen im Konformationsraum (z. B. Rotationen von chemischen Bindungen) des Liganden bestehen. Jeder Schritt geht mit einem gewissen Energieaufwand einher.

Der Docking-Prozess gliedert sich in zwei Schritte:

1. Ein *Suchalgorithmus* generiert eine vorgegebene Zahl möglicher Konformationen der Moleküle im Komplex, wobei möglichst der gesamte Konformationsraum abgedeckt werden sollte. Eine mögliche Implementierung ist die Moleküldynamiksimulation (siehe Kap. 2.6)
2. Eine *Scoring-Funktion* bewertet die in 1. vorgeschlagenen Strukturen (z. B. anhand ihrer Gesamtenergie, zugänglichen Oberfläche, chemischer Kompatibilität, etc.) und wählt die wahrscheinlichsten Konformationen aus. Eine einfache Scoring-Funktion ist die Berechnung der Gesamtenergie des Komplexes. Je niedriger dieser Wert, umso stabiler der Komplex.

Die Ergebnisse eines Moleküldockings können durch die Integration von Messdaten erheblich verbessert werden. Mögliche Daten sind z. B. konservierte Peptidsequenzen, Ergebnisse aus Punktmutationsversuchen oder Epitop-Mapping. In NMR-Experimenten können unter anderem Aminosäuren, welche an der Wechselwirkung der beiden Moleküle beteiligt sind, identifiziert werden. [20]

Kapitel 3

Projekte

3.1 Der MIP-Kollagen IV-Komplex

3.1.1 Legionellen

Die Legionärskrankheit wird bis heute als exotische Erscheinungsform einer schweren Lungenentzündung betrachtet. Tatsächlich ist sie in allen Industrieländern zu finden. Zwischen 1995 und 2005 wurden über 32.000 Fälle von Legionärskrankheit mit über 600 Ausbrüchen verzeichnet. Die Sterblichkeit zuvor gesunder Menschen beträgt ca. 15%, bei Patienten mit Immunschwäche oder Herz-Lungen-Erkrankungen über 70%.

Auslöser der Erkrankung sind gram-negative Bakterien der Gattung *Legionella*, wobei der mit Abstand häufigste Erreger *Legionella pneumophila* ist. *L. pneumophila* existiert normalerweise als Parasit innerhalb einer Vielzahl von Frischwasser-Protozoen und konnte in 80% aller Frischwasservorkommen nachgewiesen werden. In ihrer natürlichen Umgebung ist *L. pneumophila* für den Menschen ungefährlich. Durch technische Vektoren, die kontaminiertes Wasser in Aerosole verwandeln (z. B. Duschen, Klimaanlage, usw.) gelangen sie jedoch tief in die Lunge des menschlichen Wirts und können dort eine lebensbedrohliche Lungenentzündung verursachen.

Die ersten Stämme von *Legionella* konnten 1943 isoliert werden, 1954 gelang der Nachweis ihrer parasitären Existenz. Der Name *Legionärskrankheit* wurde 1978 etabliert: Während eines Treffens der US-Kriegsveteranenvereinigung „American Legion state convention“ im Juli 1976 erkrankten 181 Personen an der lebensbedrohlichen Lungenentzündung. 1978 wurde *Legionella pneumophila* als Erreger identifiziert. Nachträglich wurden einige andere Epidemien auf die Legionärskrankheit zurückgeführt. Das Pontiac-Fieber, eine milde Verlaufsform der Legionärskrankheit, wurde bereits im Jahre 1968 beschrieben. Die Erkrankung erhielt ihren Namen nach einem Ausbruch in der Stadt Pontiac in Michigan, USA.

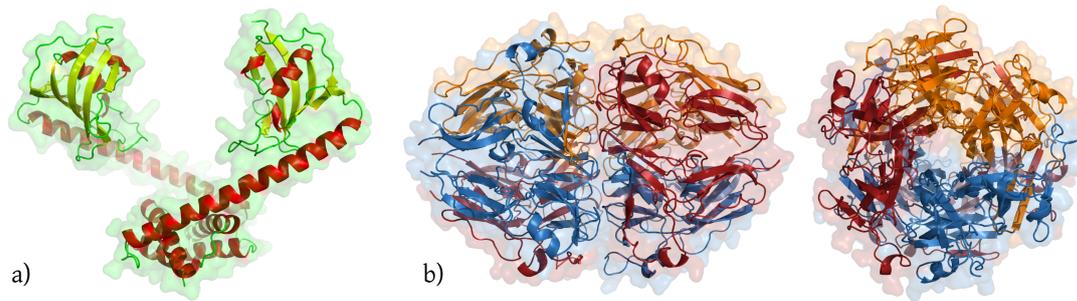


Abbildung 3.1: a) Kristallstruktur von MIP, b) Kristallstruktur der Kollagen IV NC1 Domäne (Ansicht von zwei Seiten).

L. pneumophila ist in der Lage innerhalb von Biofilmen für lange Zeit in technischen Anlagen zu überleben. Der Erreger wächst bei Temperaturen von 25 bis 42°C bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 35°C.

Bereits 1989 wurden die ersten Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* durch Punktmutationen im Genom identifiziert. Das Gen mit dem Namen *macrophage infectivity potentiator* (MIP) kodiert ein gleichnamiges Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa. MIP ist ein prokaryotisches Homolog¹ zum humanen *FK506-binding-protein*² und zeigt peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität (*PPIase*-Aktivität, siehe Kap. 2.1). Knock-out Mutanten³ von *L. pneumophila*, welche nicht über MIP verfügen, besitzen eine erheblich verringerte Infektionsrate *in-vitro* und *in-vivo*. Bis heute ist der Wirkmechanismus von MIP jedoch nicht bekannt. [21, 22]

Die Röntgenkristallstruktur von MIP konnte 2001 aufgeklärt werden [23]. Die Struktur ist in Abb. 3.1a gezeigt. MIP ist ein homo-Dimer. Jeder Monomer besteht aus einer C-terminalen FKBP-Domäne, welche für die *PPIase*-Aktivität verantwortlich ist und einer N-terminalen Dimerisierungsdomäne in Form einer langen (ca. 6,5 nm) α -Helix.

Am Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 der Universität Würzburg wurde die NMR-Struktur von MIP aufgeklärt und die außerordentliche Dynamik des Proteins gezeigt [24, 25]. Weiterhin wurde die Bindung des Inhibitors *Rapamycin* untersucht und die zugehörige Komplexstruktur aufgeklärt [26].

Im selben Zeitraum wurde auch die NMR-Struktur von FkpA, dem periplasmatischen⁴ Homolog zum MIP aus *Escherichia coli* veröffentlicht [27]. Ihm wird eine Funktion als Chaperon⁵ zugeschrieben. Die Struktur und Dynamik von FkpA weist große Ähnlichkeit zu MIP auf.

¹Enzym mit ähnlicher Peptidsequenz und gleicher Funktion, welches aus einem einzelligem Organismus ohne Zellkern stammt.

²Eine Klasse von Proteinen, welche an den immunsuppressiven Wirkstoff FK506 binden.

³Genetisch veränderte Organismen, in welchen ein bestimmtes Gen blockiert ist.

⁴Der periplasmatische Raum ist ein Zellkompartiment zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran Gram-negativer Bakterien.

⁵Chaperone (engl. *Anstandsdamen*) sind Proteine, die neu synthetisierten Proteinen „helfen“, sich korrekt zu falten. Die Bezeichnung wurde gewählt, „da sie unreife Proteine vor schädlichen Kontakten bewahren“.

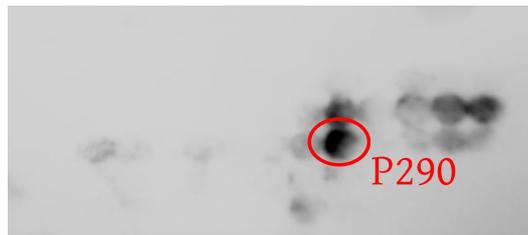


Abbildung 3.2: Ausschnitt der Spot Membran, mit welcher P290 identifiziert wurde. Abb. entnommen aus [29].

3.1.2 Zielsetzung

In Zusammenarbeit mit dem Teilprojekt B1 des SFB630 (Universität Würzburg) und der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle) konnte bereits gezeigt werden, dass MIP mit der extrazellulären Matrix von Lungenepithelzellen interagiert. Die größte Affinität wies dabei das Zellstrukturprotein *Kollagen IV* auf. Kollagen IV zählt zur Gruppe der *netzbildenden Kollagene*, die Röntgenkristallstruktur seiner Kopfgruppe ist in Abb. 3.1b dargestellt. Bei Anwesenheit von MIP ist *Legionella* in der Lage, die Epithelbarriere zu überwinden und Lungenzellen zu infizieren [28].

In einer anschließenden Studie wurde Kollagen IV in kleinere Sequenzabschnitte zerlegt und deren Affinität zu MIP überprüft. Insgesamt zeigten zwölf Peptide eine messbare Bindung an MIP. Nur eines befindet sich vollständig an der Oberfläche von Kollagen IV und ist somit *in vivo* für MIP zugänglich. Weiterhin übt das Peptid (genannt „P290“) in Zellkultur-Assays eine inhibitorische Wirkung auf MIP aus und wurde deshalb für eine genauere Untersuchung ausgewählt [29].

Kollagen ist ein bei Menschen und Tieren vorkommendes Strukturprotein der extrazellulären Matrix. Im menschlichen Körper ist es mit über 30% das häufigste Protein. Kollagenfasern besitzen eine enorme Zugfestigkeit und sind nicht dehnbar. Seinen Namen erhielt das Kollagen (griechisch: *Leim erzeugend*) aufgrund seiner früheren Nutzung als Knochenleim. Zur Zeit sind 28 verschiedene Kollagene bekannt (Typ I bis XXVIII). Ihnen gemeinsam ist eine lange Tripelhelix-Domäne („Kollagen-Helix“), welche die mechanischen Eigenschaften des Moleküls definiert. An den Enden der Tripelhelix befinden sich je nach Typ verschiedene Kopfgruppen, die Vernetzungen zu anderen Kollagenfasern oder Zellmembranen aufbauen können [30].

Ziel dieses Projektes ist die Aufklärung der molekularen Interaktion von MIP mit P290 bzw. Kollagen IV mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und anschließenden Docking- und Moleküldynamiksimulationen, um daraus Informationen für das Design wirksamer Inhibitoren gewinnen zu können.

3.1.3 Material und Methoden

3.1.3.1 Strategie

1. Identifizierung von Aminosäuren in MIP, welche an der Wechselwirkung mit P290 beteiligt sind (mittels NMR Spektroskopie).
2. Docking von MIP und P290 unter Berücksichtigung der NMR-Daten und Moleküldynamiksimulation zur Beurteilung von Komplexstabilität und Dynamik (P290 0. Generation).
3. Identifizierung von wichtigen Strukturelementen für die Bindung (P290 1. Generation) und Vorschläge für optimierte Inhibitoren (P290 2. Generation).
4. Überprüfung der Simulationsergebnisse durch Affinitätsassays auf einem Peptid Microarray (P290 3. Generation)
5. Test der Aktivität der neuen Inhibitoren in einem PPIase-Assay.
6. Erneute Variation der Peptide auf Basis aller bisherigen Daten und Simulation ihrer Bindungseigenschaften (P290 4. Generation).

Die Bindungsstärke von P290 an MIP kann durch zwei Parameter quantitativ charakterisiert werden:

- ▷ Größe der für Lösungsmittelmoleküle zugänglichen Oberfläche von P290, während es an MIP gebunden ist. Aminosäuren in P290, die eine hohe Affinität zu MIP entwickeln, sind für das Lösungsmittel schlechter zugänglich.
- ▷ Die B-Faktoren der Aminosäuren. Sie sind ein Maß für die Beweglichkeit des Moleküls. Hohe Beweglichkeit (hohe B-Faktoren) impliziert eine schwächere Bindung an MIP.

3.1.3.2 Proben

P290 wurde nach Vorgabe der Aminosäuresequenz durch die Firma GenScript (GenScript Corporation, Piscataway, USA) synthetisiert. Löslichkeitsversuche ergaben, dass P290 nur in Konzentrationen bis 19 μM wasserlöslich ist. Um auch bei dieser geringen Menge noch Einflüsse von P290 auf MIP detektieren zu können, wurde das Peptid mit einem paramagnetischen Spin Label markiert.

Die Peptidsequenz von P290 lautet: IPPCPSGWSSLWI. Eine Modelldarstellung des Peptids ist in Abb. 3.3a gezeigt.

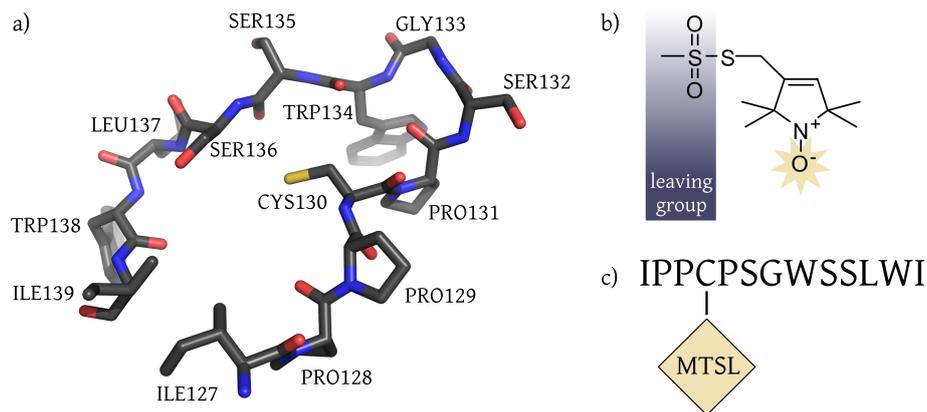


Abbildung 3.3: a) Stick-Modell von P290 mit Beschriftung der Aminosäuren, b) paramagnetisches Spin Label MTSL mit markierter *leaving group*, c) Peptidsequenz von P290 mit angehängtem Spin Label.

Im Hinblick auf eine potenzielle Anwendung als Wirkstoff wurde P290 außerdem als d-Peptid („P290-d“, siehe auch Kapitel 2.1) durch die Firma JPT (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Deutschland) synthetisiert.

Als Kontrolle wurde ein weiteres Peptid aus der Kollagen IV NC1 Domäne mit der Sequenz TRHSQTIDDPQCP („P291“) verwendet, welches in PPIase-Assays keine inhibitorische Wirkung gegenüber MIP gezeigt hat [29, 31]. Auch P291 wurde durch die Firma JPT hergestellt.

Paramagnetische Spin Label

MTSL (S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate, siehe Abb 3.3) wurde unter Abspaltung der CH_3SO_2 -Gruppe über eine Disulfidbrücke an Cystein in P290 gebunden. Das Molekulargewicht von P290 erhöht sich dadurch um 186,3 u. Das negativ geladene Sauerstoffatom in MTSL ist paramagnetisch und verkürzt die T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten benachbarter Kernspins (*PRE*, *paramagnetic relaxation enhancement*). Die Reichweite beträgt etwa 1 nm. Die Relaxation ist so effizient, dass auch geringe Mengen des Spin-Labels Veränderungen in den NMR-Spektren hervorrufen [32].

Protokoll zur Markierung von P290 mit MTSL

1. Stammlösungen herstellen:
 - ▷ 0,1 mM P290 in 50 mM TRIS-Puffer pH 8.0
 - ▷ 10 mM MTSL in Acetonitril
2. Stammlösungen mischen, so dass ein zehnfacher molarer Überschuss von MTSL in der Lösung vorliegt.

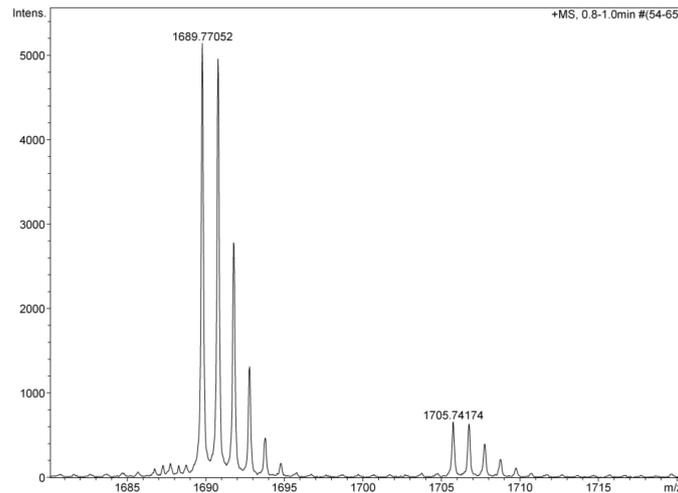


Abbildung 3.4: Massenspektrum von P290 mit MTSL. Die Aufspaltung der Signale wird durch die natürliche Isotopenverteilung der Moleküle verursacht.

3. Gemischte Lösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Überschüssiges Spin-Label durch Dialyse entfernen (Spectra/Por Biotech Cellulose Ester Membran MWCO: 500).

Massenspektrometrie (MS)

Um die erfolgreiche Bindung von MTSL an P290 zu überprüfen, wurden *Electrospray ionization time-of-flight* (ESI-TOF) Massenspektren an einem Bruker Daltonics micrOTOF focus Massenspektrometer (Insitut für Organische Chemie, Universität Würzburg) mit ESI ion source (Apollo) aufgenommen. Ionen wurden kontinuierlich durch Einbringen der Proben über eine Spritzenpumpe erzeugt.

Die Messparameter waren: Mass range m/z 200 - 2000; Ion Polarity: Positive; Capillary Exit: 150 V; Hexapole RF: 300 V; Skimmer 1: 50 V; Hexapole 1: 22 V; Set collector fill: 50 V; Set pulsar pull: 400 V; Set pulsar push: 400 V; Set reflector: 1300 V; Set flight tube: 9000 V; Set detector TOF: 2150 V; Nebulizer pressure 0.4 bar; Transfer time: 88 μ s; Pre Puls Storage: 5 μ s; Temperature of drying gas: 65°C; Dry gas flow 4 l/min;

Das Massenspektrum ist in Abb 3.4 dargestellt. Darin zeigt sich ein deutliches Signal bei m/z 1689,77. Diese Masse entspricht dem Natriumsalz von P290 mit Spinlabel [P290+MTSL + Na⁺].

MIP⁷⁷⁻²¹³

Eine monomerische Deletionsmutante von MIP (Aminosäuren 77-213) wurde am Max-Planck-Institut für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle) in isotopenmarkierter Form hergestellt. Der Sequenzabschnitt umfasst einen Teil der langen α -Helix und die FKBP-Domäne

von MIP. Ein Plasmid, welches MIP⁷⁷⁻²¹³ kodiert, wurde in *Escherichia coli* eingeschleust und die Bakterien in ¹³C-¹⁵N-markiertem Medium (Martek M9) inkubiert. Das überexprimierte ¹³C-¹⁵N-MIP⁷⁷⁻²¹³ wurde anschließend isoliert [24, 25].

Die Peptidsequenz von MIP⁷⁷⁻²¹³ lautet:

10	20	30	40	50	60
FNKKADENKV	KGEAFLTENK	NKPGVVVLPS	GLQYKVINSG	NGVKPGKSDT	VTVEYTGRLI
70	80	90	100	110	120
DGTVFDSTEK	TGKPATFQVS	QVIPGWTEAL	QLMPAGSTWE	IYVPSGLAYG	PRSVGGPIGP
130					
NETLIFKIHL	ISVKKSS				

Für die NMR-Experimente wurden jeweils zwei Proben hergestellt:

1. 400 µl MIP⁷⁷⁻²¹³ ca. 0,5 mM
in 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6.5 (90% H₂O, 10% D₂O)
2. 400 µl MIP⁷⁷⁻²¹³ ca. 0,5 mM + 19 µM P290-MTSL
in 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 6.5 (90% H₂O, 10% D₂O)

Proben von P290-d bzw. P291 wurden analog hergestellt.

3.1.3.3 NMR-Experimente

Die Interaktion der MIP-FKBP-Domäne mit P290 wurde durch ¹H-¹⁵N-HSQC Spektroskopie untersucht. Wie im Kapitel 2.3.8.2 beschrieben, zeigt ein ¹⁵N-HSQC-Spektrum den *Fingerabdruck* eines Proteins. Jede Aminosäure (außer Prolin, welches kein NH-Proton besitzt) erscheint in Form eines Peaks im 2D-Spektrum. Veränderungen in der chemischen Umgebung einer Aminosäure, z. B. durch Anlagerung eines Inhibitors sorgen für eine Verschiebung der Signale im Spektrum. Auf diese Weise kann die Bindungsregion von Inhibitoren bestimmt werden. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurde nicht nur die chemische Verschiebung der Signale betrachtet, sondern auch Änderungen der T₂-Relaxationszeiten (*paramagnetic relaxation enhancement, PRE*), welche sehr sensitiv auf die Anwesenheit des paramagnetischen Spin-Labels reagieren [33]. Beide Proben wurden unter identischen Bedingungen und mit den selben experimentellen Parametern untersucht, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Vorversuche wurden am Bruker Avance 750WB (Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5, Universität Würzburg) durchgeführt. Von jeder Probe wurde ein ¹H-¹⁵N-HSQC Spektrum aufgenommen. Bereits in diesen Spektren waren Änderungen der chemischen Verschiebung einzelner Aminosäuren in MIP⁷⁷⁻²¹³ erkennbar. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden

Pulsprogramm	fhsqcN15_T2.ks
Proben temperatur	T = 298 K
Scans	ns = 8
Delay 1	T _a = 0,1 ms
Delay 2	T _b = 5,1 ms
¹ H	sw = 14 ppm
	TD = 1024
¹⁵ N	sw = 24 ppm
	TD = 256

Tabelle 3.1: Experimentelle Parameter für die Bestimmung des *paramagnetic relaxation enhancement* Faktors.

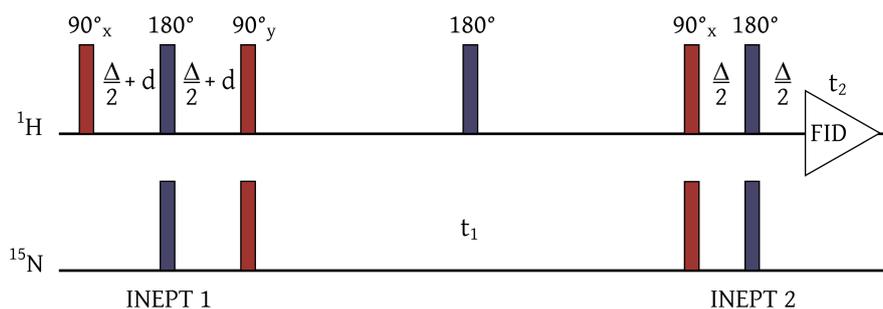


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Pulssequenz des ¹H-¹⁵N-HSQC zur Bestimmung des *paramagnetic relaxation enhancement* Faktors. Das Experiment wird zweimal mit unterschiedlichen Wartezeiten *d* im ersten INEPT Magnetisierungstransfer wiederholt.

die weiteren Messungen am Bruker Avance 700 mit Kryoprobekopf (Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth) durchgeführt.

Zur Bestimmung des PRE wurde ein ¹H-¹⁵N-HSQC-Pulsprogramm um eine zusätzliche Wartezeit im ersten INEPT-Magnetisierungstransfer [34] erweitert (siehe Abb. 3.5). Für jede Probe werden zwei ¹H-¹⁵N-HSQC Spektren mit unterschiedlicher Wartezeit (*T_a* bzw. *T_b*) aufgenommen. Aminosäuren in MIP, welche sich in räumlicher Nähe (bis ca. 1 nm Abstand) zum Spin-Label befinden, erfahren eine beschleunigte Relaxation und ihre Signalintensität nimmt schneller ab, als bei Aminosäuren, welche weit von MTSL entfernt sind. Aus dem Verhältnis der Intensitäten der Signale bei verschiedenen Wartezeiten lässt sich der PRE-Faktor Γ_2 ermitteln [33, 34]:

$$\Gamma_2 = R_{2,para} - R_{2,dia} = \frac{1}{T_b - T_a} \ln \frac{I_{dia}(T_b)I_{para}(T_a)}{I_{dia}(T_a)I_{para}(T_b)} \quad (3.1)$$

Er ist ein Maß dafür, wie nahe eine Aminosäure in Kontakt mit dem Spin-Label gekommen ist. Es werden zwei Schwellwerte für Γ_2 festgelegt und die Aminosäuren so in die Kategorien „starke Wechselwirkung“, „schwache Wechselwirkung“, „keine Wechselwirkung“ eingeteilt. Die experimentellen Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Daten der NMR-Experimente wurden mit NMRViewJ Version 8 (One Moon Scientific, Inc., Newark, NJ, USA) prozessiert und dargestellt. Die Zuordnung der Signale im HSQC-

Spektrum zu den einzelnen Aminosäuren in MIP⁷⁷⁻²¹³ wurde zuvor von unserer Arbeitsgruppe publiziert [24] und konnte übernommen werden.

3.1.3.4 Docking

Zur weiteren Charakterisierung des Molekül-Komplexes wurden die NMR-Daten als Grundlage für Dockingstudien verwendet. Es wurden die Software HADDOCK Version 2.0 auf dem HADDOCK Webserver (184 Intel XEON CPUs, 2.0 GHz) [35, 20] verwendet. Modelle der beteiligten Moleküle wurden der PDB-Datenbank entnommen: MIP⁷⁷⁻²¹³ PDB Code 2UZ5 [25], MIP-Dimer PDB Code 1FD9 [36, 23], NC1-Domäne von Human-Kollagen IV PDB Code 1LI1 [37].

Aminosäuren in MIP, die hohe PRE-Faktoren aufweisen wurden als „aktive“ Aminosäuren in der Simulation markiert (Liste in Anhang A.3.2), ebenso wie alle 13 Aminosäuren der P290 Sequenz.

In jedem Docking-Experiment werden zunächst 1000 Strukturen der Komplexe durch *rigid body docking* berechnet. In diesem Schritt sind nur Rotationen und Translationen der vollständigen Moleküle erlaubt. Konformationsänderungen werden nicht durchgeführt. Die 200 energieärmsten Strukturen werden danach im *semi-flexible simulated annealing* optimiert. Bewegungen der Protein-Seitenketten werden zugelassen und ihre Konformation energieminimiert. Abschließend werden die Moleküle mit einer Lösungsmittelschicht überzogen (0,8 nm Dicke) und ein erneuter *simulated annealing* Durchlauf gestartet (*Flexible explicit solvent refinement*). Dieses Vorgehen sorgt für die Berücksichtigung eventueller Lösungsmittelleffekte bei der Interaktion der Moleküle. Je nach Größe der Moleküle benötigt eine Simulation 3 bis 24 Stunden Rechenzeit auf dem HADDOCK Webserver.

Zur Auswertung werden die 200 water refinement Modelle nach ihrer Gesamtenergie und geometrischen Ähnlichkeit in Clustern gruppiert (*HADDOCK-Score*). Der energieärmste Cluster wurde für alle weiteren Analysen verwendet.

3.1.3.5 Moleküldynamik-Simulation

Zur Beurteilung von Stabilität und Dynamik der Komplexe wurden die im Docking ermittelten Modelle als Startstruktur in eine Moleküldynamiksimulation integriert.

MD-Simulationen wurden mit der Software GROMACS Version 3.3 [38] und Version 4.0 [39] auf einem Cluster aus vier Servern (je 2x Quad Core Intel Xeon E5405 2 GHz, 10 GB Ram, openSuSE Linux 11) durchgeführt.

Als Ausgangspunkt wurden die Docking-Strukturen mit der geringsten Gesamtenergie verwendet. Die Moleküle wurden in einer periodischen Box mit 22.080 Wassermolekülen [40] positioniert. Elektrostatische Wechselwirkungen wurden mit dem *fast particle mesh Ewald*

(PME) Algorithmus mit einem cut-off Wert von 0,9 nm berechnet. Die Temperatur des Systems wurde durch schwache Kopplung mit einem Berendsen Wärmebad kontrolliert. Chemische Bindungen und dihedrale Winkel wurden nach jedem Zeitschritt von 2 fs mit dem LINCS-Algorithmus auf natürliche Werte zurückgeführt. Alle Simulationen wurden mit dem GROMOS96 43a1 Kraftfeld [41] durchgeführt.

Im ersten Abschnitt der Simulation erfolgte eine unbeschränkte Energieminimierung des Systems. Danach wurden die Wassermoleküle eingefügt und ins thermische Gleichgewicht gebracht. Das Protein war während dieser 40 ps dauernden Phase fixiert. Im letzten Schritt folgte die Moleküldynamiksimulation mit einer Dauer von mehreren Nanosekunden und einer Zeitauflösung von 0,5 fs.

Zur Auswertung wurden die MD-Trajektorien mit dem Programm VMD Version 1.8.6 [42] visualisiert. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche über den Verlauf der Simulation wurde mit dem GROMACS Tool `do_dssp` berechnet. Der mittlere B-Faktor der Aminosäuren wurde mit dem GROMACS Tool `g_rmsf` berechnet. Der B-Faktor ist definiert als $B = 8\pi^2 \text{RMSF}^2/3$. Darin ist RMSF (*root mean square fluctuation*) die Standardabweichung der Atompositionen relativ zu einer Referenzstruktur gemessen in Å.

3.1.3.6 Humanes FKBP12 und P290

Das homologe Enzym zur MIP-FKBP-Domäne im Menschen ist FKBP12 [43]. Ebenso wie MIP ist es für die Katalyse der Prolin *trans-cis*-Isomerisierung verantwortlich. Ein Vergleich der Peptidsequenzen ist in Abb. 3.6 dargestellt. Für Docking- und MD-Simulationen wurden Aminosäuren in FKBP12 als aktiv markiert, welche homolog zu Aminosäuren in MIP sind und hohe PRE-Faktoren gezeigt haben.

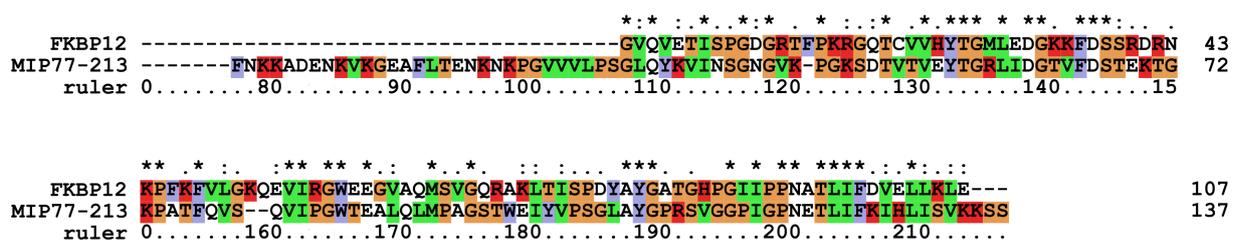


Abbildung 3.6: Sequenzalignment von MIP⁷⁷⁻²¹³ mit FKBP12

3.1.3.7 Peptid Microarray

In Kooperation mit der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle) wurde die Bindung einer großen Zahl verschiedener Peptide an MIP mit Hilfe eines PepStar™ Peptid Microarrays (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Deutschland) charakterisiert .

Auf einem Glassubstrat wird über einen Linker das gewünschte Peptid aufgebracht. In einem Microarray sind mehr als 200 verschiedene Spots pro cm^2 möglich. Der fertige Chip wird mit MIP inkubiert, gewaschen und das an bestimmte Peptide gebundene MIP über einen Antikörper mit Fluoreszenzmarker nachgewiesen. Eine ausführliche Beschreibung des Vorgehens findet sich in [44, 45].

3.1.3.8 PPIase-Assay

In Zusammenarbeit mit der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle) wurde eine Auswahl von P290-Varianten in einem PPIase-Assay untersucht [31, 29]. In diesem Test wird der inhibitorische Effekt der Peptide auf die enzymatische Aktivität von MIP dargestellt. 75 nM MIP wurden mit P290-Varianten in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die Geschwindigkeit der peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerisierung eines Substrats gemessen. Dabei wurde ein proteasefreier PPIase Assay mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA in LiCl/TFE verwendet. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in [46, 28].

3.1.4 Ergebnisse

3.1.4.1 NMR-Spektroskopie

In Abb. 3.7 ist eine Überlagerung der gemessenen ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von MIP bzw. MIP mit P290+MTSL dargestellt. Für jedes Signal wurde der PRE-Faktor Γ_2 berechnet. In Abb. 3.9 ist Γ_2 für jede Aminosäure in MIP⁷⁷⁻²¹³ aufgetragen und die beiden Schwellwerte zur Klassifizierung in „starke“ und „schwache“ Interaktion markiert. Es ist eine gute Übereinstimmung der Rapamycin-Bindungstasche (charakterisiert in [26]) und der Bindungsregion von P290 zu erkennen (siehe Abb. 3.8). Die in den NMR-Vorversuchen aufgezeichneten Änderungen der chemischen Verschiebung einzelner Aminosäuren (siehe Anhang A.3.3) stimmen ebenfalls gut mit Regionen mit hohem PRE-Faktor überein, auch wenn diese Methode nicht die gleiche Sensitivität erreicht.

P290-d und P291 wurden analog charakterisiert. Γ_2 für jede Aminosäure in MIP⁷⁷⁻²¹³ bei Anlagerung von P290-d bzw. P291 ist in Abb. 3.9 aufgetragen. P291, welches als Kontrollsubstanz verwendet wurde, beeinflusst die Relaxationsraten von nur acht Aminosäuren in MIP im Bereich der hydrophoben Bindungstasche.

P290-d zeigt eine sehr ähnliche Interaktion mit MIP wie P291. Dies spricht für eine schwache Bindung von P290-d an das Enzym, wahrscheinlich auch ohne inhibitorische Wirkung. Eine unabhängige Bestätigung für die geringe Bindungsstärke von P290-d konnte durch den Einsatz eines Peptid Microarrays erzielt werden (siehe Kap. 3.1.4.5).

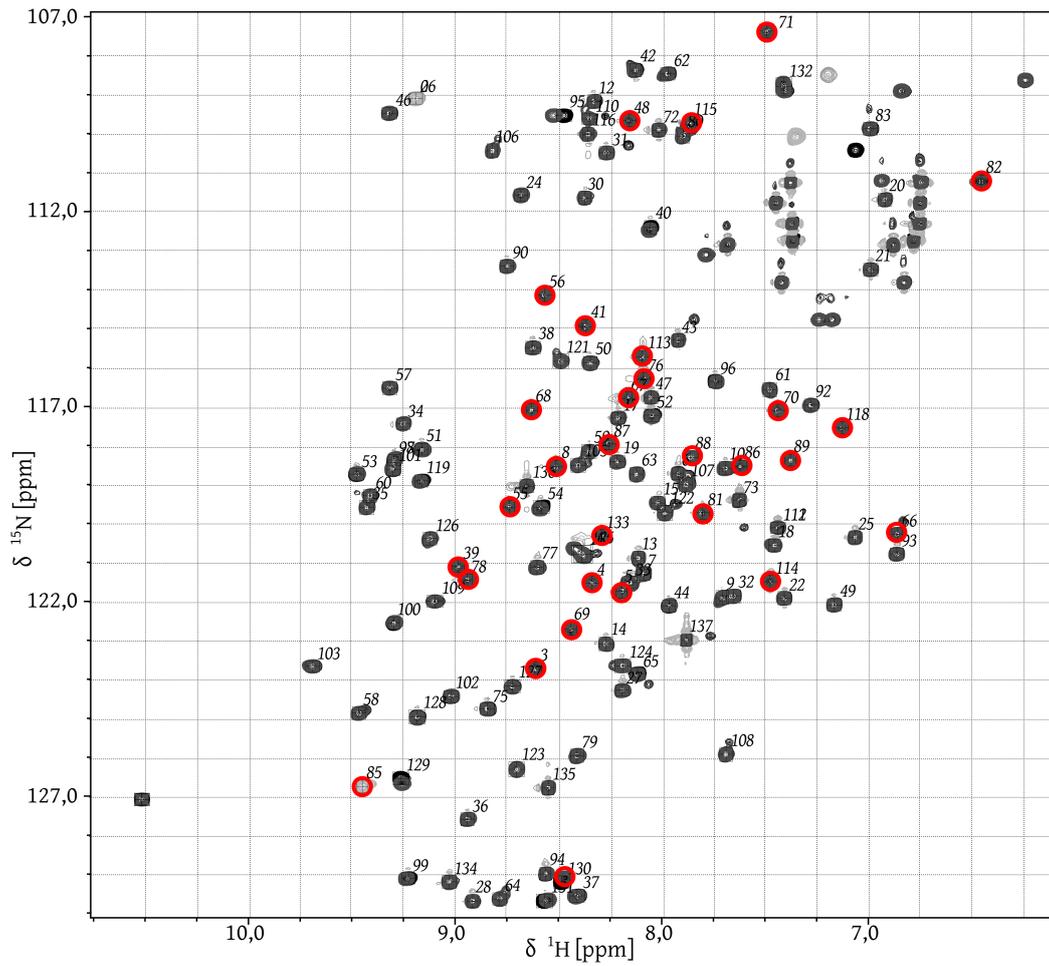


Abbildung 3.7: ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrum von MIP⁷⁷⁻²¹³. Signale, welche eine beschleunigte Relaxation nach der Anlagerung von P290+MTSL zeigen sind farbig markiert.

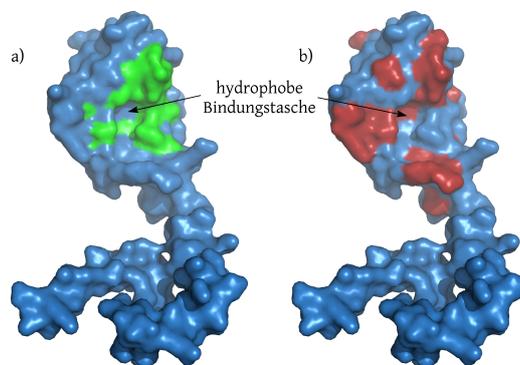


Abbildung 3.8: Bindungsregionen von a) Rapamycin und b) P290 in MIP. Zur besseren Übersicht ist ein Monomer von MIP ausgeblendet.

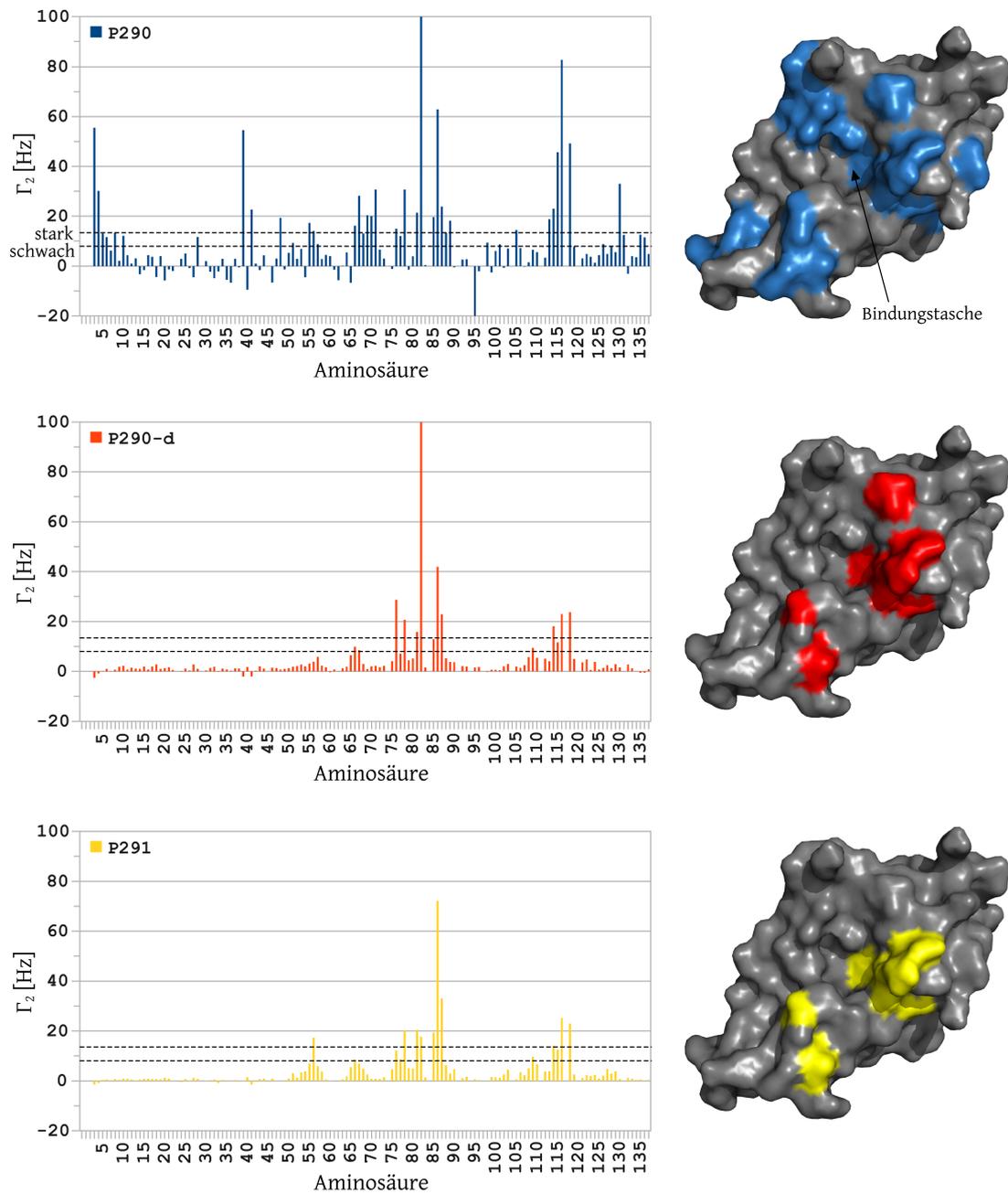


Abbildung 3.9: Stärke des PRE pro Aminosäure in MIP⁷⁷⁻²¹³ bei Anlagerung von P290, P290-d und P291. Die Schwellenwerte zur Klassifizierung der Aminosäuren in „starke“ und „schwache“ Wechselwirkung sind als gestrichelte Linien eingetragen. Aminosäuren mit starker Wechselwirkung sind farbig in der Struktur der MIP-FKBP-Domäne hervorgehoben.

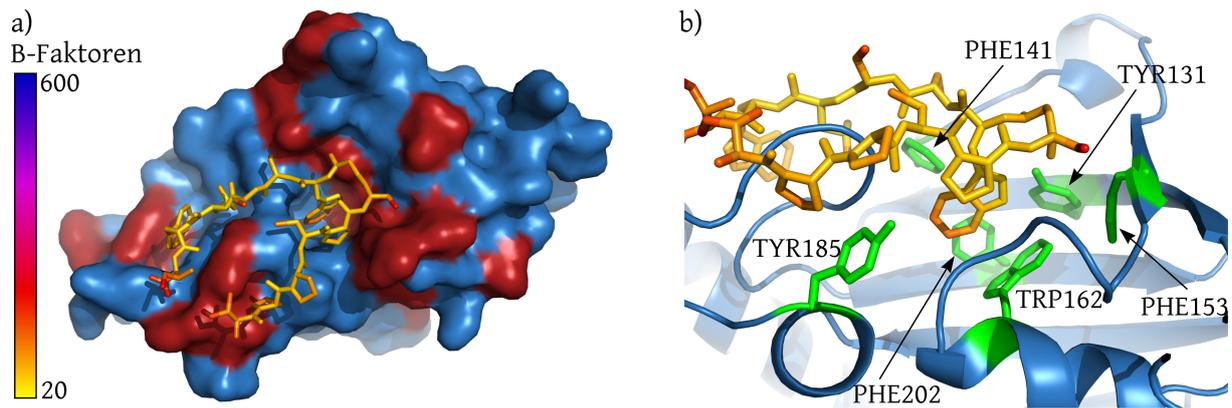


Abbildung 3.10: a) Average-Struktur der MIP-FKBP-Domäne (blau) im Komplex mit P290 (gelb mit Farbcodierung der B-Faktoren). Aminosäuren in MIP mit starkem PRE sind in rot dargestellt. b) Vergrößerte Darstellung des MIP-FKBP-P290-Komplexes. Aminosäuren, welche die MIP-Bindungstasche bilden sind als grünes Stick-Modell gezeigt.

3.1.4.2 P290 als potenzieller Inhibitor von MIP

Wie eingangs dargestellt, konnte in Zellkultur-Assays eine inhibitorische Wirkung des kurzen Peptids P290 auf die Aktivität von MIP nachgewiesen werden [29]. Nach der experimentellen Bestimmung der Interaktionsoberfläche von MIP und P290 mittels NMR-Spektroskopie werden hier, mit Hilfe von Docking, Modelle des Molekülkomplexes berechnet. Die Stabilität und Dynamik wird durch MD-Simulationen beurteilt.

MIP⁷⁷⁻²¹³ und P290

In Abb. 3.10 ist die MIP-FKBP-Domäne im Komplex mit P290 dargestellt. Die Struktur stellt den Mittelwert über eine MD-Simulation mit 18 ns Länge dar. Der Komplex bleibt während der gesamten Simulation stabil. Als Startwert wurde die Docking-Struktur mit der niedrigsten Gesamtenergie verwendet (siehe Anhang A.3.2). Aus der MD-Trajektorie wurden außerdem die B-Faktoren für jede Aminosäure im Komplex berechnet. Sie sind ein Maß für die Beweglichkeit des Moleküls. Die Farbcodierung der B-Faktoren ist in allen hier gezeigten Grafiken gleich skaliert, um einen Vergleich zu ermöglichen. Die numerischen Werte sind in Abb. 3.12 aufgetragen.

Die hydrophobe Bindungstasche von MIP wird von den Aminosäuren W-162, F-202, Y-131, F-141, D-142, F-153, Q-157, V-158, I-159, P-193 und I-194 [26] gebildet. P290 lagert sich sehr stabil an MIP an (mittlerer B-Faktor 59). Wie in Abb. 3.10 gut zu erkennen ist, wird die MIP-Bindungstasche durch PRO131 und TRP134 aus P290 besetzt. Beide Aminosäuren verbleiben über die gesamte Simulationsdauer in der Kavität. Dies wird auch über die niedrigen B-Faktoren (< 50) in diesem Bereich bestätigt. Erst die terminalen Aminosäuren ILE127 und ILE139 zeigen höhere Flexibilität.

Die scharfe 180°-Windung („Turn“) von P290 bei SER132/GLY133 wird über eine Wasser-

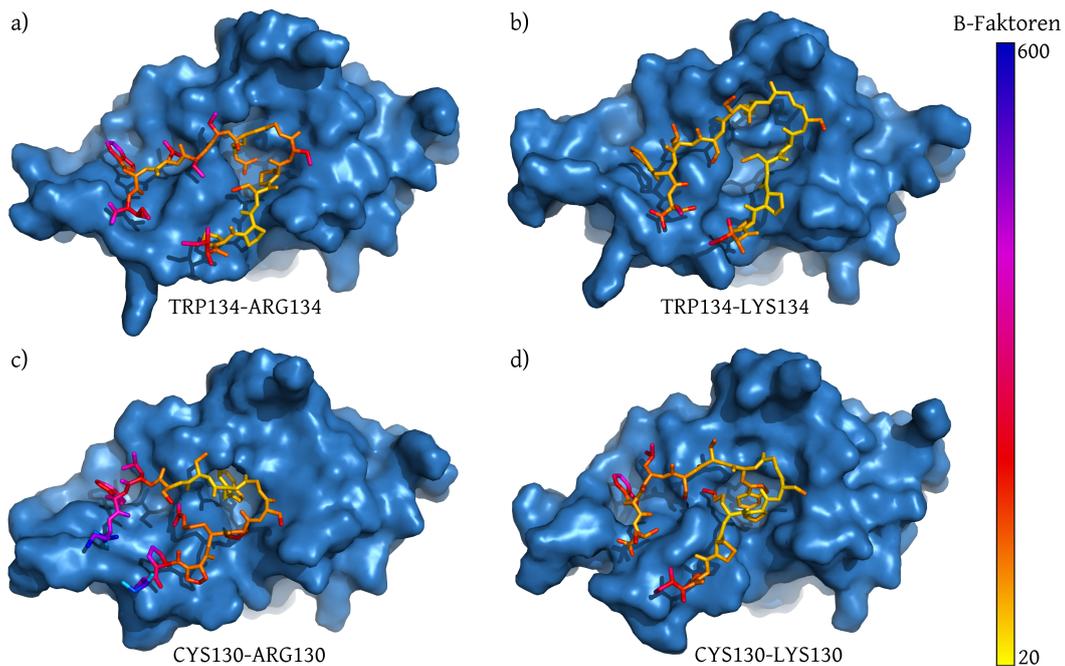


Abbildung 3.11: Average-Strukturen von vier Variationen von P290 (gelb) im Komplex mit der MIP-FKBP-Domäne. Flexible Bereiche sind über die Farbcodierung der B-Faktoren dargestellt.

stoffbrücke (TRP134 - PRO131) stabilisiert. Intermolekulare Wechselwirkungen finden über die Wasserstoffbrücken ASP142(MIP) - SER135(P290) und TYR185(MIP) - PRO129(P290) statt.

3.1.4.3 Simulation von MIP⁷⁷⁻²¹³ im Komplex mit Varianten von P290 (1. Generation)

Um weitere Anhaltspunkte über den Bindungsmechanismus von P290 an MIP-FKBP zu gewinnen, wurden mehrere Varianten der Peptidsequenz erstellt und in Docking und MD-Simulationen charakterisiert:

Sequenz	Mutation	Generation
IPPCPSGWSSLWI	(P290 unverändert)	0
IPPCPSGKSSLWI	TRP134-LYS134	1
IPPCPSGRSSLWI	TRP134-ARG134	1
IPPKPSGWSSLWI	CYS130-LYS130	1
IPPRPSGWSSLWI	CYS130-ARG130	1

In Abb. 3.11 sind die Strukturen der MIP-FKBP-Domäne im Komplex mit den modifizierten P290-Peptiden dargestellt. Für jedes Peptid wurden die B-Faktoren der Aminosäuren berechnet (Abb. 3.12), ebenso wie die lösungsmittelzugängliche Oberfläche (Abb. 3.13).

Die zugängliche Oberfläche für das gesamte Peptid ist mit 600 \AA^2 für die Mutation TRP134-ARG134 am geringsten (Abb. 3.13 *links*), dicht gefolgt von P290 (unverändert) und

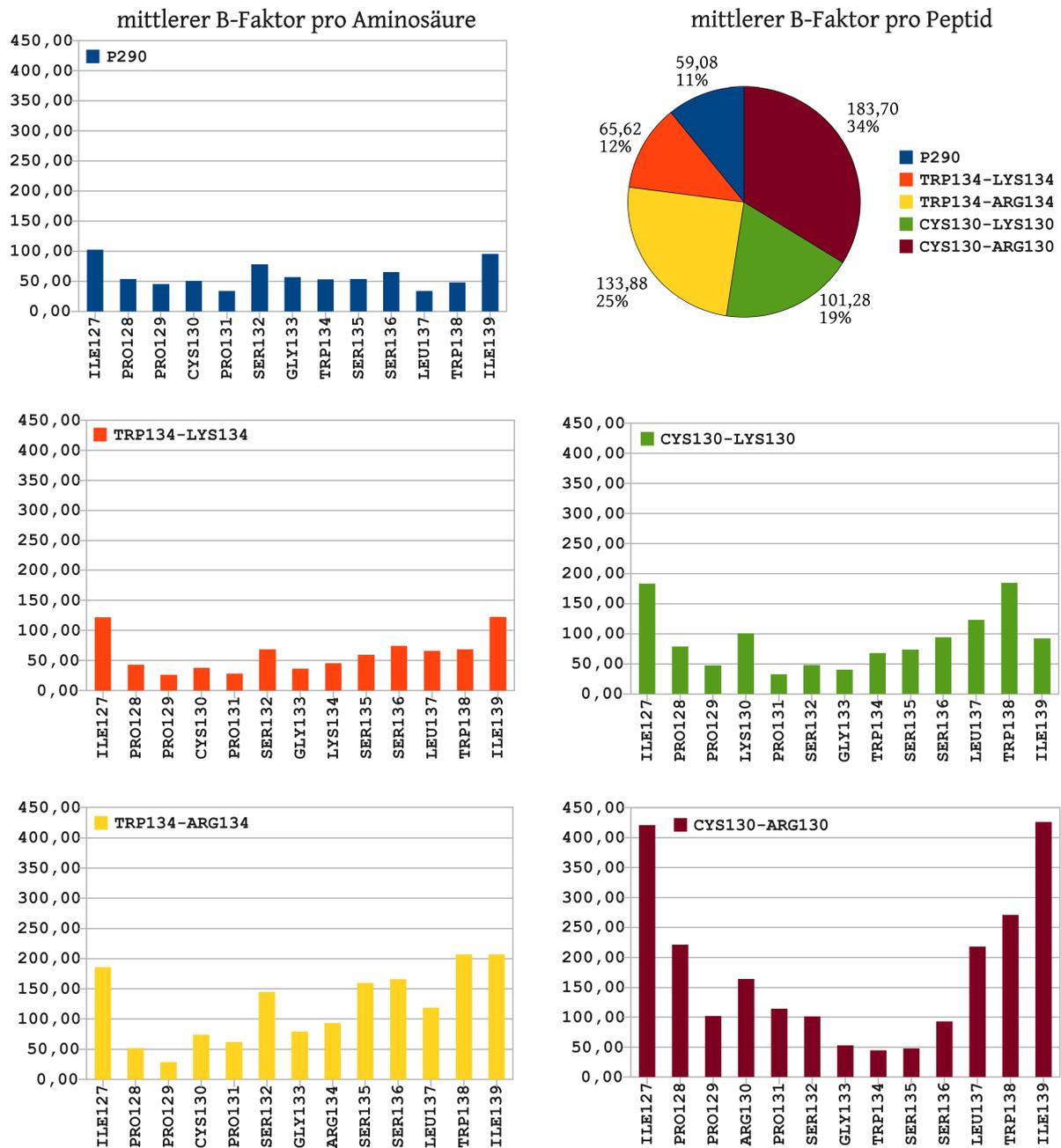


Abbildung 3.12: Mittlere B-Faktoren für P290 und seiner Varianten im Komplex mit der MIP-FKBP-Domäne.

TRP134-LYS134. Die Analyse der mittleren B-Faktoren der Peptide gibt ein weiteres Charakterisierungsmerkmal: Hierbei ist P290 (unverändert) ähnlich stabil wie TRP134-LYS134 (B-Faktoren 59 bzw. 66, siehe Abb. 3.12 *rechts oben*). TRP134-ARG134 zeigt einen doppelt so hohen B-Faktor von 134 und ist damit, wie auch CYS130-LYS130 und CYS130-ARG130, weniger stark an MIP gebunden. Die Veränderungen von CYS130 (zu LYS130 oder ARG130) erhöhen die zugängliche Oberfläche auf 785 \AA^2 bzw. 789 \AA^2 und liefert damit ein weiteres Indiz für eine reduzierte Bindungsstärke.

Eine detailliertere Analyse kann aus dem Vergleich der zugänglichen Oberfläche pro Aminosäure gewonnen werden (siehe Abb. 3.13 *rechts*). Zwei auffällige Werte sind rot markiert.

- ▷ Die Mutation TRP134-ARG134 (gelb in Abb. 3.13) zeigt eine große Lösungsmittelzugänglichkeit von ARG134. Arginin als polare Aminosäure ist demnach nicht gut geeignet, die hydrophobe MIP-Bindungstasche zu besetzen. Der B-Faktor von ARG134 ist mit 94 um den Faktor 1,8 im Vergleich zum unveränderten P290 erhöht (B-Faktor 53).
- ▷ Die Mutation CYS130-ARG130 erhöht die Lösungsmittelzugänglichkeit von PRO131 um den Faktor 7 (von $4,1 \text{ \AA}^2$ auf $28,0 \text{ \AA}^2$, braun in Abb. 3.13), der dazugehörige B-Faktor steigt von 33 auf 115. Im Verlauf der MD ist zu beobachten, dass PRO131 aus der hydrophoben Bindungstasche von MIP „rutscht“. Die Mutation von CYS130 wirkt sich destabilisierend auf das gesamte Peptid aus. Lediglich GLY133, TRP134 und SER135 besitzen B-Faktoren unter 50. Die übrigen Aminosäuren zeigen Werte im Bereich 100 - 430.

Aus den ungünstigen Änderungen der Bindungseigenschaften der Varianten von P290 kann geschlossen werden, dass in einem wirksamen Inhibitor das Sequenzelement -CYS130-PRO131---TRP134- konserviert sein sollte. Die hydrophobe Bindungstasche von MIP wird dann von PRO131 und TRP134 besetzt. CYS130 ist notwendig zur Stabilisierung.

Die Modifikation TRP134-LYS134 von P290 zeigt im Bereich PRO131-LYS134 sogar geringfügig kleinere B-Faktoren als unverändertes P290. Die polare LYS134-Seitenkette besetzt dabei nicht direkt die hydrophobe Bindungstasche von MIP, sondern wird durch Wasserstoffbrücken zu THR132, ASP124 und GLU145 „hinter“ TYR131 stabilisiert (siehe Abb. 3.10b). Im Vergleich mit den anderen vier Peptiden ist die Variante TRP134-LYS134 um ca. 0,4 nm verschoben an MIP angelagert (Richtung oben-rechts in Abb. 3.11). Als Konsequenz steigen die B-Faktoren der terminalen Aminosäuren jedoch so weit an, dass die Gesamtstabilität des Komplexes geringfügig schlechter ausfällt als mit unverändertem P290 (B-Faktor 59 zu 66 und zugängliche Oberfläche 614 \AA^2 zu 657 \AA^2).

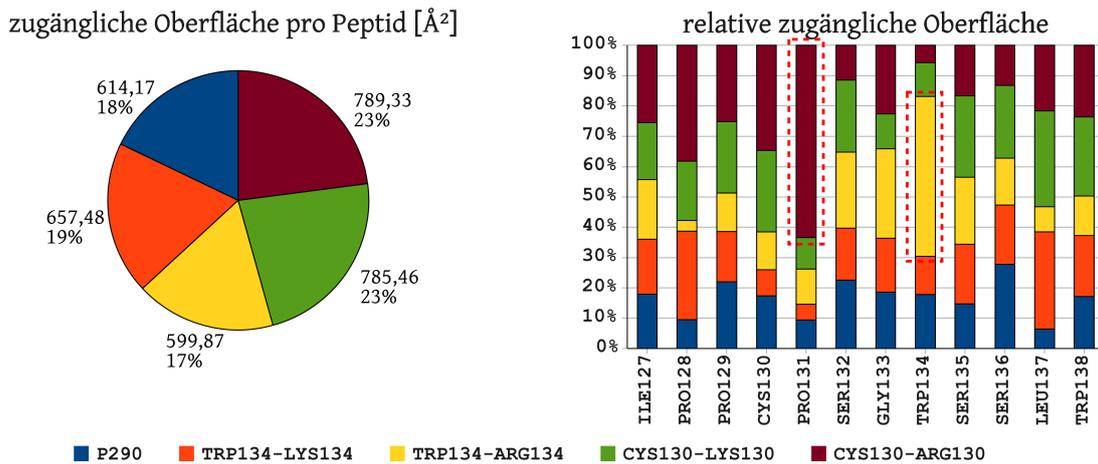


Abbildung 3.13: links: Lösungsmittelzugängliche Oberfläche der Varianten von P290, rechts: Lösungsmittelzugängliche Oberfläche aufgeschlüsselt für jede Aminosäure in den Peptiden bei Bindung an die MIP-FKBP-Domäne

3.1.4.4 Verbesserte Varianten von P290 (2. Generation)

Auf Basis der Ergebnisse aus 3.1.4.3 wurden zwei optimierte Varianten von P290 konstruiert (2. Generation). Beide Peptide sind zu einem Ring geschlossen (über eine Disulfidbrücke der terminalen Cystein-Aminosäuren). Diese soll die Flexibilität der terminalen Aminosäuren in P290 reduzieren. Weiterhin weisen zyklische Peptide eine höhere chemische Stabilität auf, was für einen späteren Einsatz als Wirkstoff relevant ist.

- ▷ CPSGWC-cyc besteht aus nur sechs Aminosäuren und ist die kürzest mögliche Umsetzung des wichtigen Sequenzelements -CYS130-PRO131---TRP134-.
- ▷ CPPCPSGWSSLWC-cyc entspricht weitgehend der Sequenz von P290 und wurde über eine Disulfidbrücke der terminalen Cystein-Aminosäuren zu einem Ring geschlossen.

CPSGWC-cyc

In Docking und MD-Simulation zeigt das kurze Peptid CPSGWC-cyc zwar eine Bindung in die hydrophobe Tasche von MIP, allerdings ist seine Ausrichtung nicht gut definiert. Das Peptid lagert sich mit vielen unterschiedlichen Orientierungen an. Anfänglich befinden sich PRO131 und TRP134 in der Bindungstasche von MIP. Nach kurzer Zeit „springt“ PRO131 aus der Kavität heraus. Das Peptid bleibt nur durch TRP134 mit MIP in Kontakt und führt Drehbewegungen um diese Aminosäure aus.

Für das gesamte Peptid errechnet sich ein mittlerer B-Faktor von 340 und eine zugängliche Oberfläche von 360\AA^2 . Die B-Faktoren für CYS130, PRO131 und SER132 steigen auf 430 - 590 an (siehe Abb. 3.14 rechts). Die „stabilste“ Aminosäure ist TRP134 mit einem B-Faktor von 110. Selbst dieser Wert ist doppelt so hoch wie der im unveränderten P290 berechnete B-Faktor von 53 für TRP134. Mit der großen Beweglichkeit von CPSGWC-cyc steigt auch

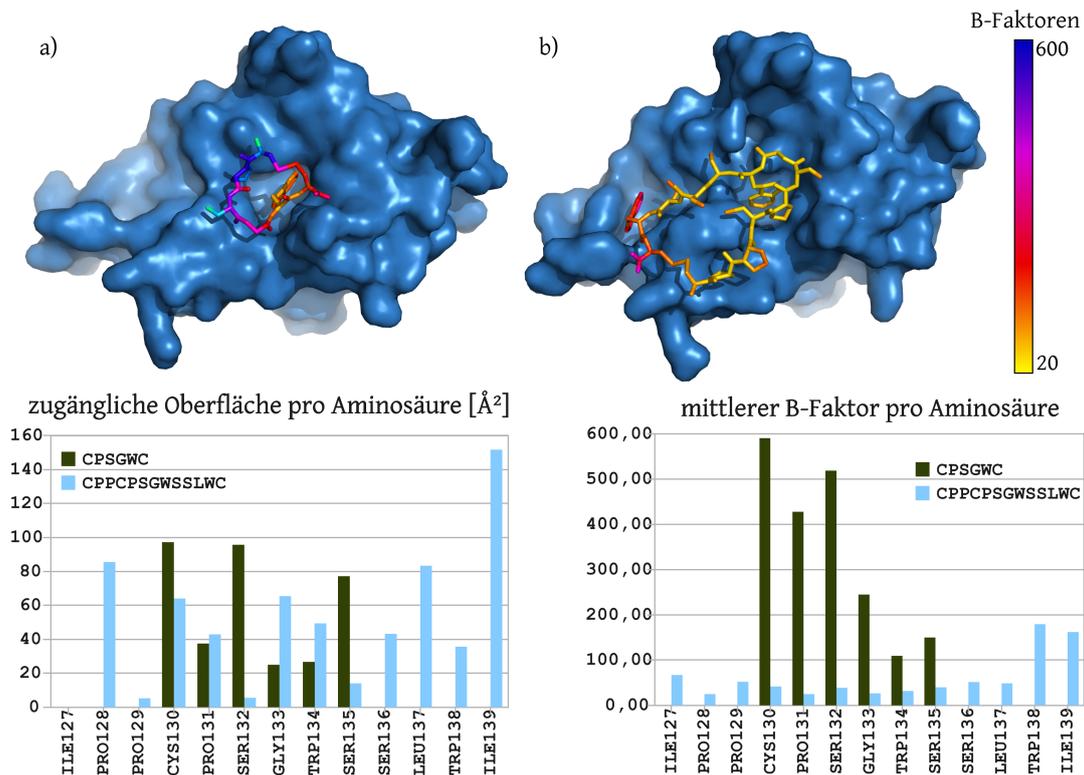


Abbildung 3.14: Darstellung der optimierten Peptide a) CPSGWC-cyc und b) CPPCPSGWSSLWC-cyc im Komplex mit der MIP-FKBP-Domäne (blau). Darunter: Lösungsmittelzugängliche Oberfläche und mittlere B-Faktoren pro Aminosäure.

die zugängliche Oberfläche insbesondere für CYS130, SER132 und CYS135 um mehr als den Faktor zwei (siehe Abb. 3.14 links).

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass das Sequenzelement -CYS130-PRO131---TRP134- zwar in der Lage ist, die MIP-Bindungstasche zu besetzen, jedoch fehlen zusätzliche Stabilisierungselemente. In P290 verhindern beispielsweise die terminalen Aminosäuren eine Rotation des Peptids in der Bindungstasche.

CPPCPSGWSSLWC-cyc

Im Komplex des originalen P290 mit der MIP-FKBP-Domäne zeigen die terminalen Aminosäuren ILE127 und ILE139 die größte Beweglichkeit. Um diese zu reduzieren und folglich dem Komplex eine höhere Stabilität zu verleihen, wurden ILE127 und ILE139 durch Cysteine ersetzt und das Peptid über eine Disulfidbrücke zu einem Ring geschlossen. Die Stabilität des Komplexes wurde wie zuvor mit Docking und MD-Simulation über 18 ns überprüft. Die Komplexstruktur ist in Abb. 3.14b dargestellt.

Im Vergleich zum unveränderten P290 zeigt sich eine stabilisierende Wirkung durch den Ringschluss (siehe Abb. 3.14). Der Terminus CYS127 wird durch die Disulfid-Brücke zu CYS139 in seiner Flexibilität reduziert (B-Faktor 67 zu 102). Geringere Beweglichkeit zeigen auch die Aminosäuren PRO128 und CYS130-SER136, deren B-Faktoren um

20-50% sinken. Zu diesen Aminosäuren zählt auch das für die Besetzung der MIP-Bindungstasche verantwortliche Sequenzelement -CYS130-PRO131---TRP134-. Die geringeren B-Faktoren in diesem Abschnitt lassen eine festere Bindung an MIP vermuten.

Die Beweglichkeit von PRO128 ist leicht erhöht (B-Faktor 52 zu 45). CYS139 und v. a. TRP138 werden durch den Ringschluss deutlich in ihrer Position destabilisiert. Die zugehörigen B-Faktoren steigen von 95 auf 162 (CYS139) bzw. von 47 auf 179 (TRP138). In der MD ist ein Umklappen der TRP138-Seitenkette um 180° zu sehen. Diese Bewegung überträgt sich auf das benachbarte CYS139. Trotz der hohen Beweglichkeit von TRP138 beträgt der mittlere B-Faktor über CPPCPSGWSSLWC-cyc nur 61 und ist damit nur 2% höher als im unveränderten P290. Auch die zugängliche Oberfläche von 645 \AA^2 ist vergleichbar mit P290.

Es kann festgehalten werden, dass ein ringförmiges Peptid einen deutlich stabilisierenden Einfluss auf den Komplex ausübt. Die Art und Position des Ringschlusses bietet Potential für zukünftige Optimierungen z. B. im Hinblick auf die Selektivität gegenüber MIP

3.1.4.5 Bindungseigenschaften der P290-Varianten (0. - 2. Generation) auf einem Peptid Microarray

In Kooperation mit der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle) wurden alle bisher gezeigten Peptidsequenzen auf einen Peptid Microarray aufgebracht und ihre Affinität gegenüber MIP gemessen (siehe Abb. 3.15).

Die vier P290-Varianten der 1. Generation (TRP134-LYS134, TRP134-ARG134, CYS130-LYS130, CYS130-ARG130) zeigen deutlich verringerte Bindungsstärken von nur 10% bis 50% bezogen auf das unveränderte P290. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Simulationen, welche für alle vier Peptide erhöhte B-Faktoren (siehe Abb. 3.12) und größere lösungsmittelzugängliche Oberflächen (siehe Abb. 3.13) ausgewiesen haben. Die entsprechenden d-Peptide haben eine noch geringere Affinität.

Die Affinitäten der zyklischen P290-Varianten (2. Generation) zu MIP bestätigen ebenfalls die Simulationsergebnisse. In der Simulation zeigte CPSGWC-cyc eine sehr hohe Beweglichkeit und keine definierte Orientierung gegenüber MIP. Die entsprechende Bindungsstärke auf dem Peptid-Chip beträgt nur 5% in Vergleich zu P290.

Das zyklische CPPCPSGWSSLWC-cyc zeigte in der Simulation ähnliche Werte wie P290 und außerdem eine Stabilisierung der terminalen Aminosäuren. Der Peptid-Chip weist hier eine verdoppelte Bindungsstärke gegenüber MIP aus. Auch das entsprechende zyklische d-Peptid zeigt immer noch 80% der Bindungsstärke von P290 (als l-Peptid). Ein d-Peptid mit hoher Affinität zu MIP ist ein vielversprechender Ausgangspunkt für einen potentiellen Einsatz *in-vivo*, da d-Peptide im Organismus deutlich langsamer abgebaut werden.

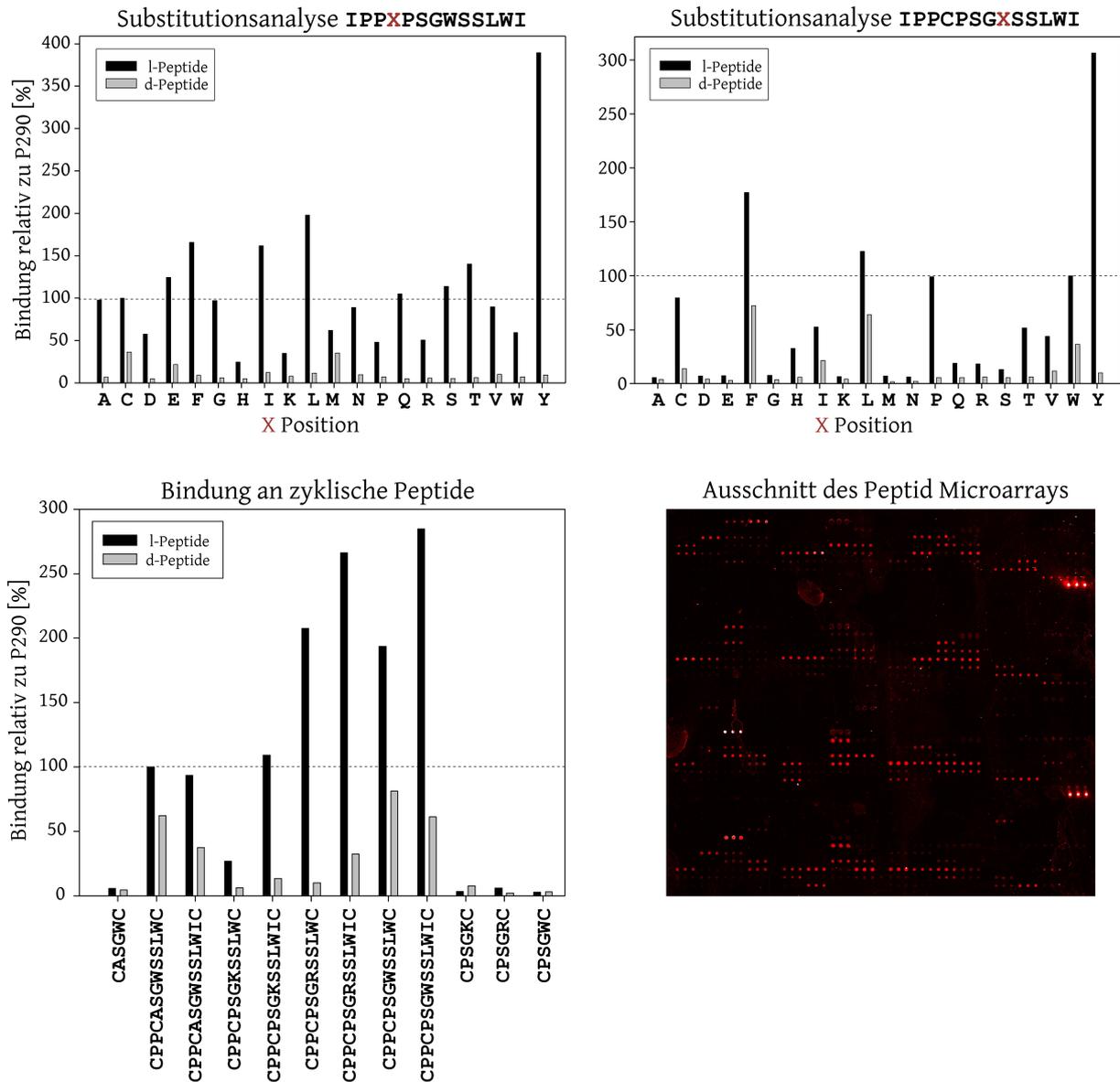


Abbildung 3.15: Bindungsstärke verschiedener Peptide an MIP (relativ zu P290) gemessen auf einem Peptid Microarray. *Unten rechts:* Ausschnitt aus dem Peptid Microarray. Die Intensität der roten Spots gibt die Bindungsstärke wieder. Die sehr hohen Werte von Tyrosin (Y) an beiden Austauschpositionen sind wahrscheinlich Artefakte aufgrund der starken Hydrophobie dieser Aminosäure. (Abbildungen aus [31]).

Die sehr hohen Werte von Tyrosin (Y) an beiden Austauschpositionen sind wahrscheinlich Artefakte aufgrund der starken Hydrophobie dieser Aminosäure.

3.1.4.6 Simulation weiterer P290-Varianten (3. Generation)

Mit Hilfe des Peptid Microarrays wurden zusätzliche Varianten von P290 auf ihre Affinität gegenüber MIP untersucht. Die besten Eigenschaften zeigten die Varianten CYS130-LEU130 (200% Bindungsstärke im Vergleich zu P290, siehe Abb. 3.15) bzw. TRP134-PHE134 (180% Bindungsstärke). Für zyklische Peptide erhöht das Einfügen einer weiteren Aminosäure am C-Terminus zusätzlich die Affinität. Auf der Basis dieser Informationen wurden zwei weitere Varianten von P290 konstruiert (3. Generation) und ihre Eigenschaften in Docking und MD-Simulationen charakterisiert.

Das erste Peptid entspricht P290 wobei CYS130 gegen LEU und TRP134 gegen PHE ausgetauscht wurden. Das zweite Peptid wurde zusätzlich über eine Disulfidbrücke zu einem Ring geschlossen, indem die erste Aminosäure in P290 durch CYS ersetzt wurde und ein weiteres CYS am Ende der Sequenz angehängt wurde. Das gesamte Peptid besteht deshalb aus 14 Aminosäuren im Unterschied zu den 13 Aminosäuren in P290. Die Sequenzen sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Sequenz		Generation
IPPCPSGWSSLWI	(P290 unverändert)	0
IPPLPSGFSSLWI	linear	3
CPPLPSGFSSLWIC-cyc	zyklisch	3

Zu Beginn der MD-Simulation wird in beiden Komplexen die hydrophobe Bindungstasche von MIP durch -PR0131---PHE134- in der gleichen Art besetzt wie zuvor durch -PR0131---TRP134- (siehe Abb. 3.16). Nach einigen Nanosekunden Simulationszeit bewegt sich jedoch LEU130 in die Bindungstasche und verdrängt PRO131. Als Konsequenz verschiebt sich das gesamte Peptid relativ zu MIP, ähnlich wie bereits für die Variation TRP134-LYS134 beschrieben (siehe Kap. 3.1.4.3). Die Verschiebung wirkt sich destabilisierend auf alle weiteren Aminosäuren der beiden Peptide aus. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche von IPPLPSGFSSLWI beträgt 640 \AA^2 (4% Zuwachs in Vergleich zu P290), die des zyklischen CPPLPSGFSSLWIC-cyc 728 \AA^2 (18% Zuwachs). Die mittleren B-Faktoren steigen von 59,08 (P290) auf 77,49 (IPPLPSGFSSLWI) bzw. 96,88 (CPPLPSGFSSLWIC-cyc).

Die B-Faktoren des linearen IPPLPSGFSSLWI sind im Bereich von PRO128, LEU130, PHE134, SER135, LEU137 und ILE139 fast identisch mit P290 (siehe Abb. 3.16 *unten links*). Eine zusätzliche Stabilisierung zeigt sich nur für SER136 mit einem B-Faktor von 46,06 (70% des Wertes in P290). Die übrigen Aminosäuren, insbesondere TRP138, sind beweglicher als in P290. Dies weist auf eine geringere Affinität hin.

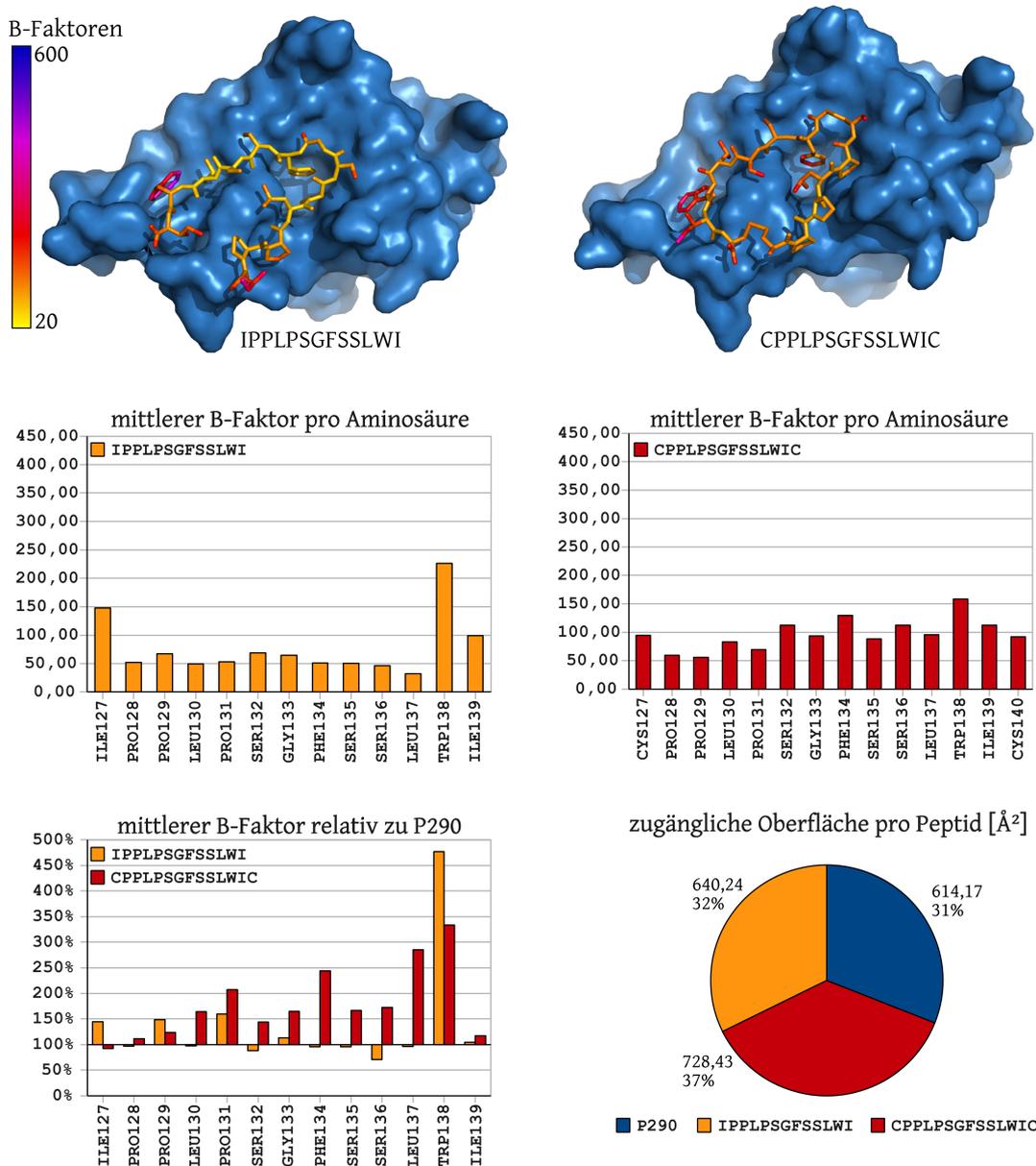


Abbildung 3.16: Oben: Average-Strukturen der P290-Varianten IPPLPSGFSSLWI (links) und CPPLPSGFSSLWIC-cyc (rechts) im Komplex mit der MIP-FKBP-Domäne. Mitte: mittleren B-Faktoren pro Aminosäure. Unten: Relative Änderung der B-Faktoren im Vergleich zu P290 und lösungsmittelzugängliche Oberfläche der Gesamtpeptide.

Sequenz	Mutation	PPIase-Aktivität	Konzentration [μM]	Peptid Microarray
IPPCPSGFSSLWI	TRP134-PHE134	51%	10,0	180%
IPPLPSGWSSLWI	CYS130-LEU130	58%	5,7	200%
CPPLPSGFSSLWIC-cyc	CYS130-LEU, TRP134-PHE	55%	5,8	
IPPLPSGFSSLWI	CYS130-LEU, TRP134-PHE	98%	2,2	
IPPYPSGWSSLWI	CYS130-TYR130	110%	7,3	400%
IPPCPSGYSSLWI	TRP134-TYR134	53%	14,6	300%
d-CPPMPSGFSSLWC-cyc	CYS130-MET, TRP134-PHE, d-Peptid	107%	4,7	

Tabelle 3.2: Übersicht der in PPIase-Assays getesteten Peptide und ihrer inhibitorischen Wirkung auf MIP. Zum Vergleich ist die Bindungsstärke auf dem Peptid Microarray angegeben.

Im Fall des zyklischen CPPLPSGFSSLWIC-cyc sind praktisch alle Aminosäuren flexibler (Erhöhung der B-Faktoren um 120% bis 300%) im Vergleich zu P290. Allerdings zeigt sich wie zuvor eine relative Stabilisierung der terminalen Aminosäuren, v. a. von TRP138, durch den Ringschluss.

Insgesamt konnte die doppelte Mutation von P290 in der Simulation keine maßgeblichen Verbesserungen gegenüber dem zyklischen CPPCPSGWSSLWC-cyc der 2. Generation erbringen. Sie bestätigen jedoch erneut die relative Erhöhung der Komplexstabilität durch ein ringförmiges Peptid. Weiterhin zeigt die aliphatische Aminosäure LEU130 eine so starke Affinität zur MIP-Bindungstasche, dass sie eine Verschiebung des gesamten Peptids verursachen kann. Dies erklärt die einerseits hohe Bindungsstärke der Leucin-Varianten von P290 auf dem Peptid Microarray und die gleichzeitig erhöhte Flexibilität der Komplexe in den Simulationen. Für einen zukünftigen Inhibitor könnte die Position von Leucin innerhalb von P290 so angepasst werden, dass eine Verschiebung des Peptids nicht mehr auftritt. Eine mögliche Realisierung wird im nächsten Abschnitt gezeigt.

3.1.4.7 PPIase Assays der P290-Varianten

In Zusammenarbeit mit der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle) wurde eine Auswahl von P290-Varianten in einem PPIase-Assay untersucht [31, 29]. In diesem Test wird der inhibitorische Effekt der Peptide auf die enzymatische Aktivität von MIP dargestellt (siehe Kap. 3.1.3.8). Die Ergebnisse der Assays sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

Im PPIase-Assay konnten die Ergebnisse der Moleküldynamiksimulationen bestätigt werden. Die Peptide CYS130-LEU130 und TRP134-PHE134 zeigen beide eine inhibitorische Wirkung auf die enzymatische Aktivität von MIP, welche auf 58% bzw. 51% abfällt. Die

Kombination beider Veränderungen (CYS130-LEU130 + TRP134-PHE134) beeinflusst MIP jedoch kaum (98% Restaktivität). Aus den MD-Simulationen ist ersichtlich, dass die Position von LEU130 nicht optimal ist und der Komplex deshalb destabilisiert wird (siehe Kap. 3.1.4.6).

Die Variante TRP134-TYR134 verhält sich mit einer Restaktivität von 53% analog zu TRP134-PHE134. Tryptophan und Phenylalanin besitzen sehr ähnliche chemische Eigenschaften, sodass diese Verhalten naheliegend ist. Die hohe Bindungsstärke von CYS130-TYR130 auf dem Peptid Microarray (siehe Kap. 3.1.4.5) ist dagegen ein Artefakt, da CYS130-TYR130 die PPIase-Aktivität von MIP nicht herabsetzt.

Weiterhin bestätigt der PPIase-Assay, dass der inhibitorische Effekt der Peptide durch einen Ringschluss verbessert werden kann. Das lineare Peptid IPPLPSGFSSLWI hat praktisch keinen Einfluss auf die Aktivität von MIP, die zyklisierte Variante CPPLPSGFSSLWIC-cyc hingegen reduziert die Aktivität von MIP um 45%. Dieser positive Einfluss eines ringförmigen Peptids wurde durch MD-Simulationen vorhergesagt (siehe Kap. 3.1.4.4) und ebenfalls auf dem Peptid Microarray (siehe Kap. 3.1.4.5) beobachtet.

3.1.4.8 P290-Variante (4. Generation)

In diesem abschließenden Optimierungsschritt wurde ein Peptid mit der Sequenz CPPCLSGFSSLWC-cyc simuliert. Darin wurden die zuvor gesammelten Erkenntnisse für eine möglichst starke Bindung kombiniert:

- ▷ Das Peptid ist über eine Disulfidbrücke zu einem Ring geschlossen (verbesserte Stabilität der Termini, siehe Kap. 3.1.4.4 und 3.1.4.6).
- ▷ TRP134 wurde gegen PHE134 ausgetauscht (erhöhte Bindung auf dem Peptid Microarray, siehe Kap. 3.1.4.5 und Inhibition der PPIase-Aktivität von MIP, siehe Kap. 3.1.4.7).
- ▷ Leucin wurde in die Sequenz integriert (erhöhte Bindung auf dem Peptid Microarray, siehe Kap. 3.1.4.5), hier aber an Stelle von PRO131, welches sich direkt über der MIP-Bindungstasche befindet, sodass die hohe Affinität von LEU131 nicht mehr zu einer Verschiebung des Peptids führt.

Wie zuvor wurde das Peptid in Docking und anschließender MD-Simulation über 18 ns charakterisiert. Die berechnete Komplexstruktur ist in Abb. 3.17 dargestellt. Für CPPCLSGFSSLWC-cyc beträgt die lösungsmittelzugängliche Oberfläche noch 572 \AA^2 und damit 7% weniger im Vergleich zu P290. Der mittlere B-Faktor sinkt auf 56,07 (5% Verinergerung zu P290).

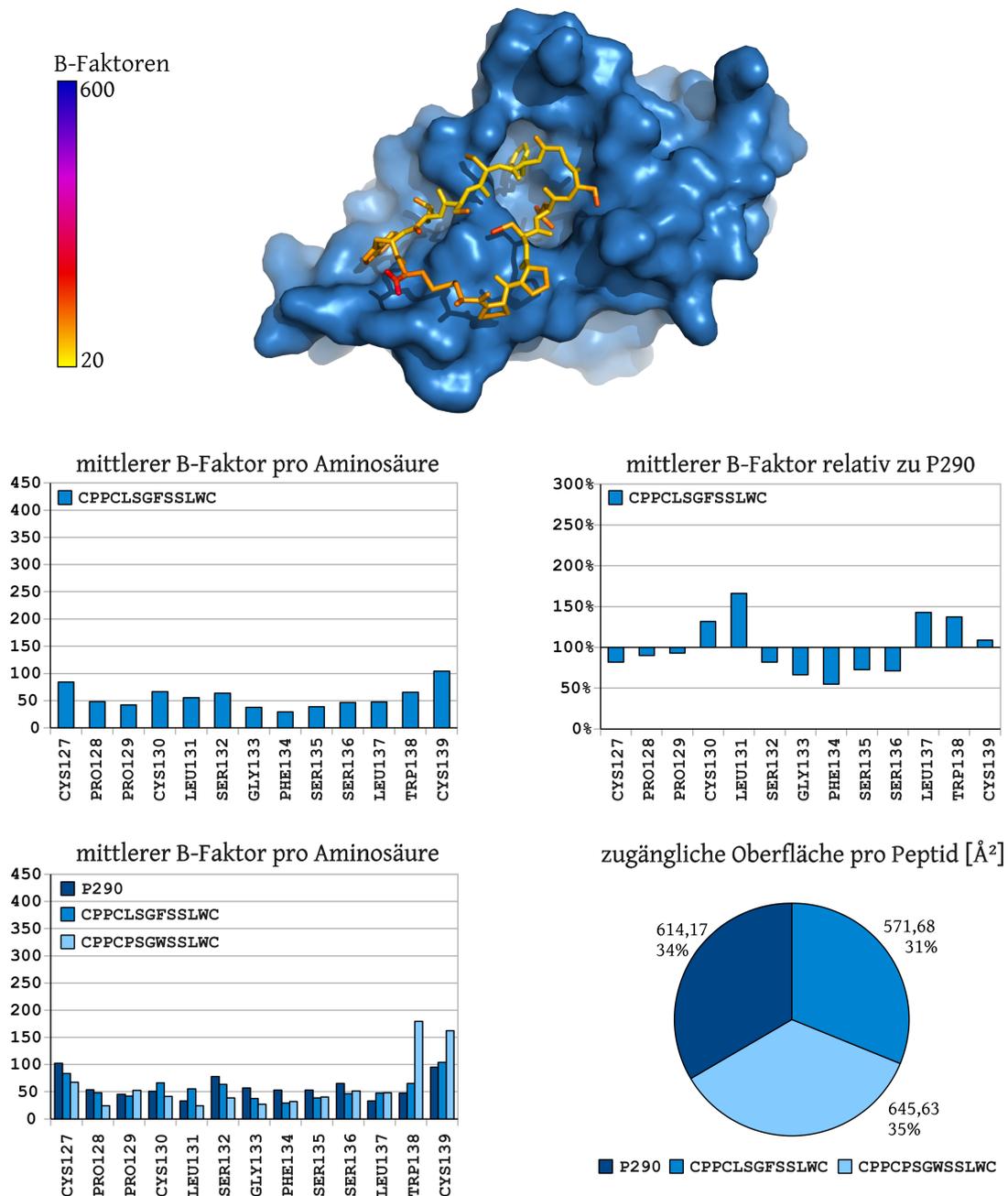


Abbildung 3.17: Average Struktur der P290 Variation CPPCLSGFSSLWC-cyc im Komplex mit der MIP-FKBP-Domäne. *Mitte:* mittleren B-Faktoren pro Aminosäure und relative Änderung der B-Faktoren im Vergleich zu P290. *Unten:* Gegenüberstellung der mittleren B-Faktoren pro Aminosäure von P290 (0. Generation), CPPCPSGWSSLWC-cyc (2. Generation) und CPPCLSGFSSLWC-cyc (4. Generation) und lösungsmittelzugängliche Oberfläche der Gesamtpeptide.

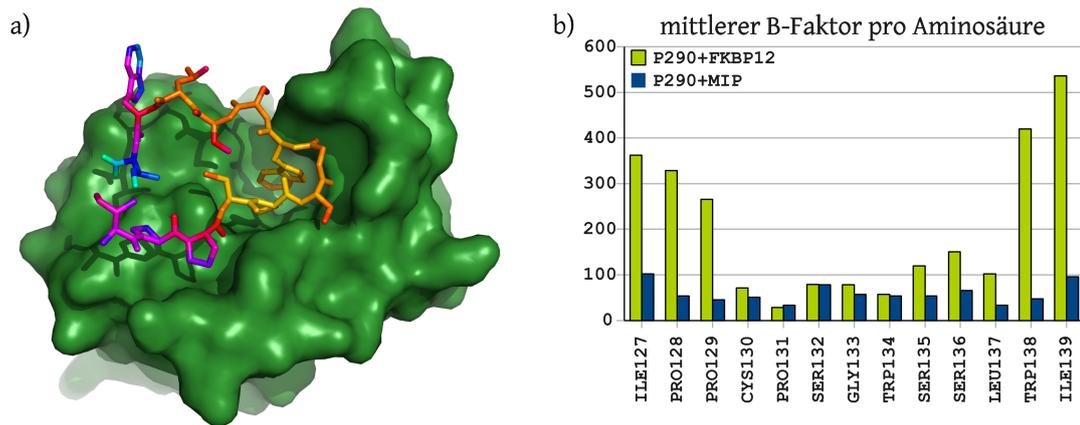


Abbildung 3.18: a) Struktur des berechneten FKBP12-P290-Komplexes, b) Mittlere B-Faktoren für den FKBP12-P290-Komplex (grün). Zum Vergleich sind die B-Faktoren für P290 im Komplex mit der MIP-FKBP-Domäne (grün) dargestellt.

In Abb. 3.17 *unten links* sind die B-Faktoren der Aminosäuren in P290, CPPCPSGWSSLWC-cyc (zyklisches Peptid der 2. Generation) und CPPCLSGFSSLWC-cyc (4. Generation) im Vergleich dargestellt. Insbesondere im Bereich von TRP138 konnte die Beweglichkeit des Peptids deutlich reduziert werden. Zusammen mit der ebenfalls verringerten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche stellt das zyklische Peptid CPPCLSGFSSLWC-cyc der 4. Generation eine vielversprechende Basis für die Entwicklung eines effektiven Wirkstoffs dar.

Humanes FKBP12 und P290

In PPIase-Assays im Teilprojekt B1 des SFB630 (Universität Würzburg) konnte gezeigt werden, dass P290 die Aktivität von FKBP12 nur sehr geringfügig inhibiert [29], trotz der großen Ähnlichkeit zur MIP-FKBP-Domäne. Diese Eigenschaft wäre für den potenziellen Einsatz von P290 als Inhibitor zur Bekämpfung der Legionärskrankheit sehr von Vorteil. Die spezifischen Bindungseigenschaften von P290 an FKBP12 wurden ebenfalls durch ein Dockingexperiment mit anschließender Moleküldynamiksimulation über 18 ns untersucht. Für das Docking wurden Sequenzabschnitte in FKBP12 als aktiv markiert, welche homolog zu Aminosäuren in MIP sind die hohe PRE-Faktoren gezeigt haben.

Die Struktur des berechneten FKBP12-P290-Komplexes ist in Abb. 3.22a dargestellt. Auch hier sind die Aminosäuren PRO131 und TRP134 in der hydrophoben Bindungstasche eingelagert. Der mittlere B-Faktor über das gesamte Peptid beträgt 200 (59 für den MIP-FKBP-P290-Komplex). Die B-Faktoren von CYS130 - TRP134 sind vergleichbar mit den Werten des MIP-FKBP-P290-Komplexes und sprechen für eine stabile Bindung in diesem Abschnitt des Peptids (siehe Abb. 3.18). In Richtung der Termini steigen die B-Faktoren sehr stark an. Die Ähnlichkeit von MIP und FKBP12 ist hier geringer, sodass die terminalen Aminosäuren von P290 sich nicht in gleichem Maße an die Proteinoberfläche anlagern können. Dies führt

zu einer Destabilisierung des gesamten Komplexes und liefert eine mögliche Erklärung für die schwache Wechselwirkung von P290 mit FKBP12 in den Aktivitätsassays.

3.1.4.9 MIP-Dimer im Komplex mit der Kollagen IV NC1-Domäne

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der NMR-Messungen an $\text{MIP}^{77-213} + \text{P290}$ zur Berechnung eines Modells des vollständigen MIP-Kollagen IV-Komplexes genutzt.

Eine direkte NMR-Studie des MIP-Dimers im Komplex mit der Kollagen IV-NC1-Domäne ist wegen des hohen Molekulargewichts von 46 + 152 kDa und der starken Viskosität von Kollagen nicht möglich. In Kooperation mit dem Teilprojekt B1 des SFB630 (Universität Würzburg) konnte jedoch gezeigt werden, dass MIP überwiegend mit einem Peptid interagiert, dessen Sequenz (P290) einem Abschnitt in Kollagen IV gleicht [29, 28]. Die NMR-Messungen an MIP^{77-213} im Komplex mit P290 können deshalb zur grundlegenden Modellierung des MIP-Dimer-Kollagen IV-NC1-Komplexes genutzt werden.

Im Docking des MIP-Dimers mit Kollagen IV wurden alle 13 Aminosäuren der P290-Sequenz und diejenigen Aminosäuren in MIP, welche in den NMR-Messungen starke PRE-Faktoren gezeigt haben, als aktiv markiert (Liste im Anhang A.3.2). Mit diesen Startwerten wurden sieben Cluster gefunden. Cluster Nummer 2 besteht aus 74 Strukturen und weist mit einem HADDOCK score von $88,2 \pm 9,6$ die niedrigste Gesamtenergie auf. Die weiteren Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Cluster 2	
HADDOCK score	$88,2 \pm 9,6$
Cluster size	74
RMSD from the overall lowest-energy structure	$0,8 \pm 0,8 \text{ \AA}$
Van der Waals energy	$-77,3 \pm 2,7 \text{ kcal/Mol}$
Electrostatic energy	$-317,6 \pm 74,6 \text{ kcal/Mol}$
Desolvation energy	$100,8 \pm 5,4 \text{ kcal/Mol}$
Restraints violation energy	$1281,8 \pm 117,1 \text{ kcal/Mol}$
Buried Surface Area	$2694,1 \pm 143,2 \text{ \AA}^2$

Die Dockingstruktur mit geringster Gesamtenergie ist in Abb. 3.19 dargestellt. MIP „greift“ mit beiden FKBP-Domänen nach der NC1-Domäne von Kollagen IV. Die hydrophobe Bindungstasche von MIP (siehe Abb. 3.8), welche die PPIase-Aktivität trägt, ist nicht Teil der Kontaktoberfläche beider Moleküle.

Der Komplex wird durch intermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren SER156(MIP) - CYS130(P290) und GLU164(MIP) - ILE127(P290) stabilisiert. Auffällig ist weiterhin, dass die meisten Seitenketten der P290-Sequenz in Richtung von Kollagen IV orientiert sind. Sie sind damit für ein angreifendes Enzym von außen nicht zugänglich. Die

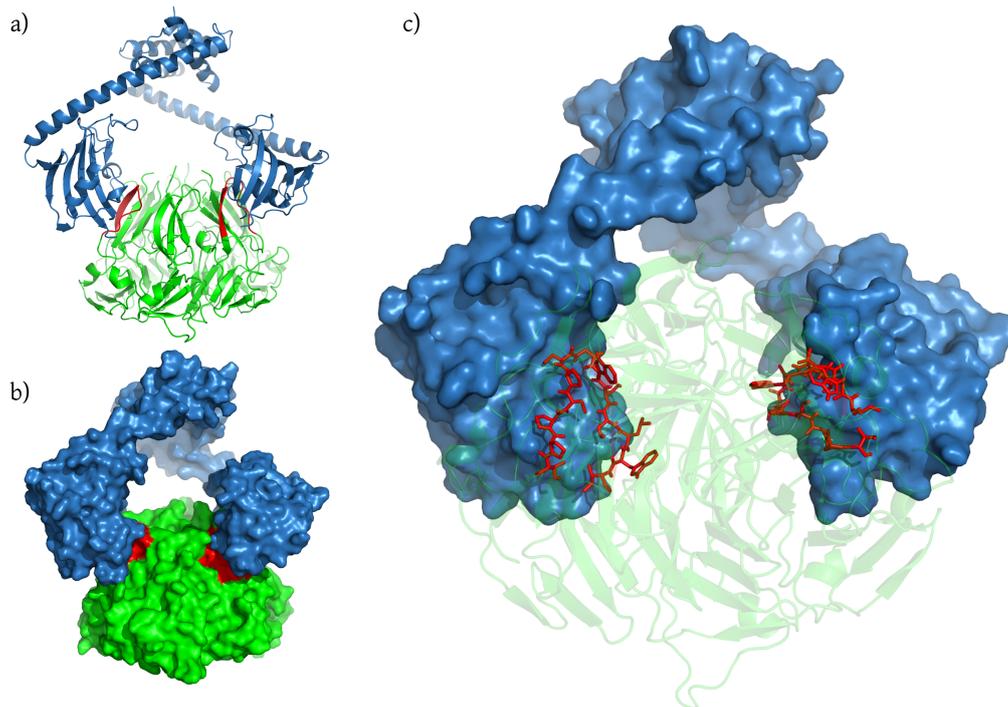


Abbildung 3.19: MIP-Dimer (blau) im Komplex mit der Kollagen IV-NC1-Domäne (grün). MIP „greift“ nach der NC1-Domäne. Die Sequenz von P290 in Kollagen IV ist rot markiert. a) Darstellung als Sekundärstrukturelemente der Proteine. b) Darstellung der Proteinoberfläche. c) Blick von unten mit transparenter NC1-Domäne (P290 ist als rotes Stickmodell dargestellt).

einzigste Ausnahme bildet PRO129, welches der MIP-FKBP-Domäne zugewandt ist und alle Serin-Seitenketten.

Moleküldynamiksimulation des MIP-Dimer-Kollagen IV NC1-Komplexes

Zur Beurteilung der molekularen Erkennung von Kollagen IV durch MIP und einer möglichen Destabilisierung der NC1-Domäne wurde eine MD-Simulation des vollständigen Komplexes mit einer Laufzeit von 40 ns durchgeführt. Als Startstruktur diente das Ergebnis der im vorherigen Abschnitt gezeigten Dockingstudie. Die erforderliche Rechenzeit betrug 12 Wochen. Abbildungen aus dem Verlauf der Simulation sind im Anhang A.3.5 gezeigt.

Der Komplex aus Kollagen IV und dem MIP-Dimer bleibt während der gesamten Simulationszeit stabil. MIP, welches *in-vivo* an der Oberfläche von *Legionella* sitzt, „greift“ mit beiden FKBP-Domänen nach der NC1-Domäne von Kollagen. Eine „Scharnierbewegung“ in den α -Helices von MIP führt zu einer Annäherung der Dimerisierungsregion von MIP an Kollagen (siehe Abb. 3.20a).

Die Dynamik der Bewegung kann über die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) der Molekülstrukturen zur Startstruktur charakterisiert werden. Für das sehr flexible MIP liegt der Wert nach 40 ns MD-Simulation bei 1,08 nm. In den ersten 18 ns steigt er stark an (in dieser Zeit nähert sich die MIP-Dimerisierungsdomäne an Kollagen IV an) und selbst

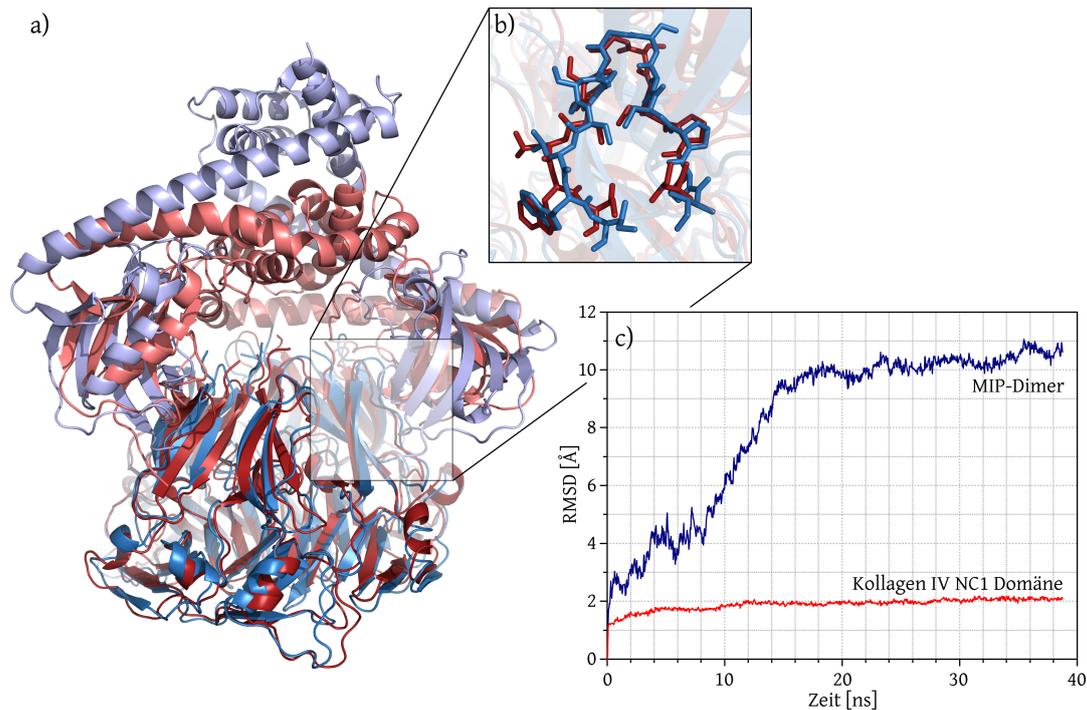


Abbildung 3.20: a) Überlagerung der Molekülstruktur des MIP-Kollagen IV-Komplexes vor (blau) und nach (rot) 40 ns Moleküldynamiksimulation. b) Ausschnittsvergrößerung der P290-Sequenz in Kollagen IV. c) Verlauf der RMSD-Werte für MIP und Kollagen IV während der Simulation.

nach 32 ns finden noch Fluktuationen der Molekülstruktur statt (siehe Abb. 3.20c). Der RMSD-Wert der Kollagen IV NC1-Domäne nimmt bereits nach 5 ns einen Sättigungswert von 0,19 nm an.

Veränderungen in der Konformation von Kollagen IV bei Anwesenheit von MIP konnten im Rahmen der hier durchgeführten Simulation nicht festgestellt werden. In Abb. 3.20b ist eine Überlagerung der P290-Sequenz in Kollagen IV (vor und nach 40 ns MD-Simulation) als Ausschnittsvergrößerung dargestellt. Vorstellbar wäre z. B. eine lokale Strukturveränderung in der P290-Sequenz gewesen, durch die ein Teil der Proteinseitenketten von außen angreifbar würde. Eine alternative Funktion von MIP wird in der Diskussion vorgestellt.

3.1.5 Diskussion

Der MIP-Dimer als Adhäsion

Auch im Komplex mit Kollagen IV führen die langen α -Helices in MIP eine „Scharnierbewegung“ aus. Ein analoges Bewegungsmuster wurde aufgrund von NMR-Messungen in unserer Arbeitsgruppe bereits für freies MIP [25] bzw. für das homologe Enzym FkpA [27] in der Literatur vorgestellt.

Das „Mother’s Arms“-Modell von Hu *et al.* [27] konzentriert sich auf die vermutete Rolle von FkpA als Chaperon: FkpA besitzt zwei lange „Arme“ (die beiden α -Helices), welche

	* *	**	
<i>H. sapiens</i>	IPPCPSGWSSSLWI		(Mensch)
<i>O. cuniculus</i>	IPPCP N GWSSSLWI		(Kaninchen)
<i>G. gallus</i>	IPPCP E GWSSSLWI		(Huhn)
<i>C. familiaris</i>	IP Q CP E SGWSSSLWI		(Hund)
<i>M. musculus</i>	IP Q CP N GWSSSLWI		(Maus)
<i>B. taurus</i>	IP Q CP T GWSSSLWI		(Rind)
<i>R. norvegicus</i>	IP Q CP N GWSSSLWI		(Ratte)
<i>C. elegans</i>	IP N CP A GWSSSLWI		(Fadenwurm)
<i>M. mulatta</i>	IPPCP E GW I SLW		(Rhesusaffe)
<i>O. aries</i>	IPPCP A GW I SLW		(Schaf)
<i>S. scrofa</i>	IPPCP Q GW I SLW		(Schwein)
<i>D. rerio</i>	IP N CP D GW A SLWI		(Zebrafisch)
<i>D. pseudoobscura</i>	IP E CP S GW E GLWI		(Fruchtfliege)
<i>N. vectensis</i>	V P S C PSGWS P LW		(Seeanemone)
<i>A. stephensi</i>	IP E CP N GW D GLWI		(Anophelesmücke)
<i>P. jarrei</i>	IP Q CP N DY T RLWV		(Porifera/Schwämme)

Abbildung 3.21: Alignment der P290-Sequenz für verschiedene Organismen (erstellt mit BLASTp [49]).

sich um ein „Ellenbogengelenk“ bewegen können. Die „Hände“ (die beiden C-terminalen Domänen) am Ende jeden Armes sind sich zugewandt und tragen die Bindungsregionen für das Substrat. Durch die flexiblen Ellenbogengelenke ist die „Mutter“ (der FkpA-Dimer) in der Lage, ihr „Kind“ (das Substrat) mit den Händen zu halten. Für ein Chaperon, das die Faltung verschiedener Proteine unterstützen soll, ist eine Anpassungsfähigkeit an das jeweilige Substrat sehr wichtig.

Die Scharnierbewegung von MIP könnte aber auch der molekularen Erkennung bzw. Adhäsion an Kollagen dienen. Die Ergebnisse der NMR-Experimente in Kombination mit der Moleküldynamiksimulation der Kollagen IV NC1-Domäne im Komplex mit MIP konnten in der hier durchgeführten Form keine Hinweise auf eine mögliche Destabilisierung von Kollagen IV durch die Anwesenheit von MIP liefern. Auch die nicht zugänglichen Seitenketten machen die P290-Sequenz in Kollagen IV als direkten Angriffspunkt unwahrscheinlich. Die primäre Funktion von MIP könnte in der primären Erkennung der NC1-Domäne liegen. MIP wird an der Oberfläche der Legionellen exprimiert [47, 48] und könnte dort für die Adhäsion der Bakterien an die extrazelluläre Matrix ihrer Wirtszellen sorgen. Die Scharnierbewegungen würden dabei, ähnlich wie im „Mother’s Arms“-Modell eine Bindung an verschiedene Zielmoleküle erlauben. MIP zeigt die größte Affinität gegenüber Kollagen IV, bindet aber auch an andere Kollagentypen [28].

Weiterhin gibt es erste Hinweise darauf, dass die Bildung des MIP-Kollagen IV-Komplexes einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) hat, die *in-vivo* für die Degradation der Kollagene verantwortlich sind. Diese Aktivierung könnte über eine bisher nicht näher charakterisierte Serinprotease ausgelöst werden [29, 28].

Unterstützung findet dieses Modell darin, dass die Sequenz von P290 innerhalb der Kolla-

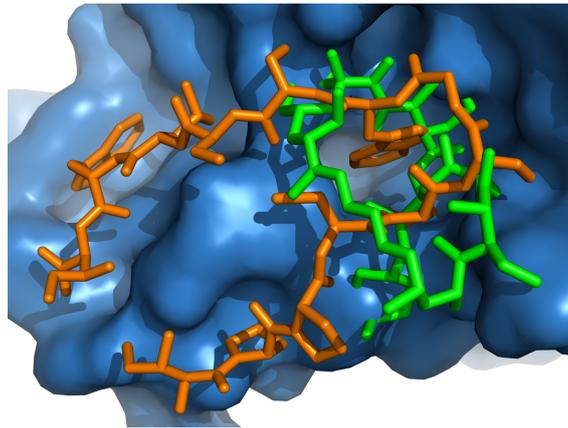


Abbildung 3.22: Überlagerung der Dockingstruktur der MIP-FKBP-Domäne im Komplex mit P290 (orange) und der NMR-Struktur der MIP-FKBP-Domäne mit Rapamycin (grün) aus [26].

gene bis hinunter zu Porifera⁶ konserviert ist (siehe Abb. 3.21). Damit würde MIP über ein evolutionär stabiles Ziel für die molekulare Erkennung verfügen.

Vergleich der Komplexe MIP-Rapamycin und MIP-P290

Die NMR-Struktur der MIP-FKBP-Domäne im Komplex mit dem Inhibitor Rapamycin wurde 2007 in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt [26]. Rapamycin inhibiert sowohl MIP als auch das humane Homolog FKBP12 und zeigt außerdem immunsuppressive Wirkung. In Abb. 3.22b ist eine Überlagerung der MIP-Rapamycin-NMR-Struktur mit dem hier berechneten MIP-P290-Komplex dargestellt. Beide Substanzen besetzen die Bindungstasche von MIP durch hydrophobe Abschnitte der Moleküle. Bei Rapamycin befindet sich der Pipecolinring in der Kavität, bei P290 die Seitenketten der Aminosäuren PRO131 und TRP134.

Rapamycin ist deutlich kleiner als P290 und reicht nicht weit über die Bindungstasche von MIP hinaus. P290 hingegen kann über die längeren Termini zwischen FKBP12 und der MIP-FKBP-Domäne unterscheiden. Hier ergibt sich möglicherweise ein Ansatzpunkt, um die Selektivität von Rapamycin dahingehend zu optimieren, dass es bevorzugt an MIP bindet und das humane Enzym nicht blockiert.

P290 als Inhibitor für die PPIase-Aktivität von MIP

P290 lagert sich mit den Aminosäuren PRO131 und TRP134 in die hydrophobe Bindungstasche von MIP ein und blockiert dort die molekulare Erkennung des Enzyms. Neben diesem mittleren Sequenzelement sind jedoch auch die terminalen Aminosäuren von Bedeutung. Sie sind wahrscheinlich in der Lage, den Gesamtkomplex zu stabilisieren, indem sie Rotationen des Peptids in der MIP-Bindungstasche verhindern. Weiterhin könnten sie für die

⁶Die Schwämme (Porifera, Spongiaria) bilden einen Tierstamm innerhalb der Abteilung der Gewebelosen (Parazoa). Sie leben im Wasser und kommen in allen Meeren der Erde vor.

beschriebene Selektivität von P290 gegenüber MIP verantwortlich sein (P290 zeigt nur eine schwache Affinität zu humanem FKBP12).

Die PPIase-Aktivität von MIP reagiert weiterhin sehr empfindlich auf bestimmte Änderungen in der Peptidsequenz des Proteins [36, 50]. Der Austausch von ASP142 oder TYR185 reduziert die Aktivität von MIP auf unter 5%. Die Aminosäuren wurden aufgrund der konservierten Gensequenz des Enzyms identifiziert. In den hier durchgeführten NMR-Experimenten zeigen beide Aminosäuren eine Relaxationszeitverkürzung, d. h. es besteht eine Wechselwirkung mit P290. Zusätzlich sind in der Dockingstruktur von P290 mit der MIP-FKBP-Domäne Wasserstoffbrücken mit eben diesen Aminosäuren zu erkennen (ASP142(MIP) - SER135(P290) und TYR185(MIP) - PRO129(P290)).

3.1.6 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde die Wechselwirkung des PPIase-Enzyms MIP mit Kollagen IV untersucht. MIP ist maßgeblich für die Infektiösität von *Legionella pneumophila* verantwortlich, einem Bakterium, welches im Menschen schwere Lungenentzündungen auslösen kann. Das Enzym zeigt eine hohe Affinität gegenüber einem kurzen Peptidsequenzabschnitt in Kollagen IV (genannt „P290“), welches unter anderem im Epithel der Lunge zu finden ist.

Die Interaktionsoberfläche der Moleküle wurde durch den Einsatz eines paramagnetischen Spin-Labels in NMR-Experimenten charakterisiert. Mit Hilfe von Docking und Moleküldynamiksimulationen konnte aus diesen Daten ein Modell des MIP-Kollagen-Komplexes berechnet werden.

Es wurde gezeigt, dass MIP als Dimer in der Lage ist, nach Kollagen IV zu „greifen“ und sich dann an das Molekül heranzuziehen. Wahrscheinlich dient dieser Mechanismus der Adhäsion von *L. pneumophila* an die Wirtszelle. Neben der zuvor postulierten Destabilisierung von Kollagen IV durch MIP, welche hier nicht beobachtet wurde, könnte die Adhäsion ein wichtiger Faktor für die Virulenz von *L. pneumophila* sein.

Weiterhin wurde die inhibitorische Wirkung des isolierten Peptids P290 auf die biologische PPIase-Aktivität von MIP untersucht. Durch NMR-Messungen und anschließenden Moleküldynamiksimulationen konnte gezeigt werden, dass P290 sich stabil in die Bindungstasche von MIP einlagert und durch den Sequenzabschnitt -CYS130-PRO131---TRP134- das Enzym blockiert. Die übrigen Aminosäuren in P290 dienen der Stabilisierung des Komplexes und sorgen für die Selektivität von P290, welches, im Unterschied zu bekannten Wirkstoffen, das humane Homolog zu MIP nicht inhibiert. Die Vorhersagen der Simulationen konnten durch ein Peptid Microarray und Messungen der enzymatischen Aktivität von MIP in PPIase-Assays bestätigt werden. Die Ergebnisse wurden zur Optimierung von P290 eingesetzt, indem die Peptidsequenz durch den Austausch zweier Aminosäuren verändert und das Molekül zu einem Ring geschlossen wurde. Die entstandene Struktur besitzt deutlich verbesserte Bindungseigenschaften und könnte künftig als Basis für eine neue Klasse von Wirkstoffen gegen *L. pneumophila* dienen.

3.2 Strukturaufklärung paramagnetischer Komplexe

3.2.1 Malaria und die Naphthylisoquinolin-Alkaloide

Malaria (ital. *mala aria* - „schlechte Luft“) ist eine Infektionskrankheit, die von einzelligen Parasiten, den *Plasmodien*, hervorgerufen wird. Die Krankheit wird hauptsächlich durch den Stich der Anopheles-Mücke übertragen. Nach aktuellen Erhebungen werden jedes Jahr 515 Mio. Menschen mit Malaria infiziert, wovon 2 Mio. die Krankheit nicht überleben [51]. Die großen Infektionsgebiete liegen vor allem in Afrika südlich der Sahara (70% aller Infektionen) und in den übrigen tropischen Regionen der Erde.

Der Zusammenhang zwischen dem Malariaerreger und dem Stich der Anopheles-Mücke wurde von Ronald Ross (brit. Chirurg und General) während des Baus des Suezkanals entdeckt. Ross erhielt 1902 den Nobelpreis für Medizin.

Es sind vier humanpathogene Erreger bekannt, von denen *Plasmodium falciparum* (Auslöser von „Malaria tropica“) den bedeutendsten und auch gefährlichsten Typ darstellt. Die Symptome der Malaria sind hohes wiederkehrendes Fieber, Schüttelfrost, gastrointestinale Beschwerden und Krämpfe. Unbehandelt oder zu spät behandelt hat Malaria tropica eine Letalität von etwa 30%, eine rechtzeitige Behandlung kann die Infektion dagegen vollständig beseitigen. Insbesondere bei Kindern kann die Krankheit rasch zu Koma und Tod führen.

Der Mensch dient den Plasmodien lediglich als Zwischenwirt, die eigentliche Vermehrung findet im Endwirt (der Anopheles-Mücke) statt.

Das meistverwendete Medikament zur Bekämpfung einer Malariainfektion ist heute *Chloroquin* (CQ, siehe Abb. 3.23). Es wird sowohl zur Behandlung einer akuten Infektion, als auch zur Prophylaxe eingesetzt. Chloroquin zeigt nur geringe Nebenwirkungen und kann günstig produziert werden. Die häufige Verwendung von Chloroquin in der Vergangenheit führte allerdings auch dazu, dass die Anzahl der resistenten Erreger stark anstieg. Inzwischen sind Chloroquinresistenzen in praktisch jedem Malariagebiet vorhanden, sodass neue Wirkstoffe dringend benötigt werden.

Die Familie der Naphthylisoquinolin-Alkaloide

Im Laufe der Evolution haben höhere Pflanzen ein chemisches Abwehrsystem gegen Bedrohungen aus der Umwelt entwickelt. Eine dieser Pflanzen, die tropische Liane *Triphyophyllum peltatum* aus der Familie der *Dioncophyllaceae* (*Hakenblattgewächse*), verfügt über eine ungewöhnlich große Zahl bioaktiver Substanzen. Mit Hilfe dieser *Naphthylisoquinolin-Alkaloide* (NIQs) verteidigt sich die Liane gegen Pilzbefall und Insekten. Es sind drei Spezies dieser Familie bekannt: *T. peltatum* (Elfenbeinküste, Afrika), *Habropetalum dawei* (Sierra

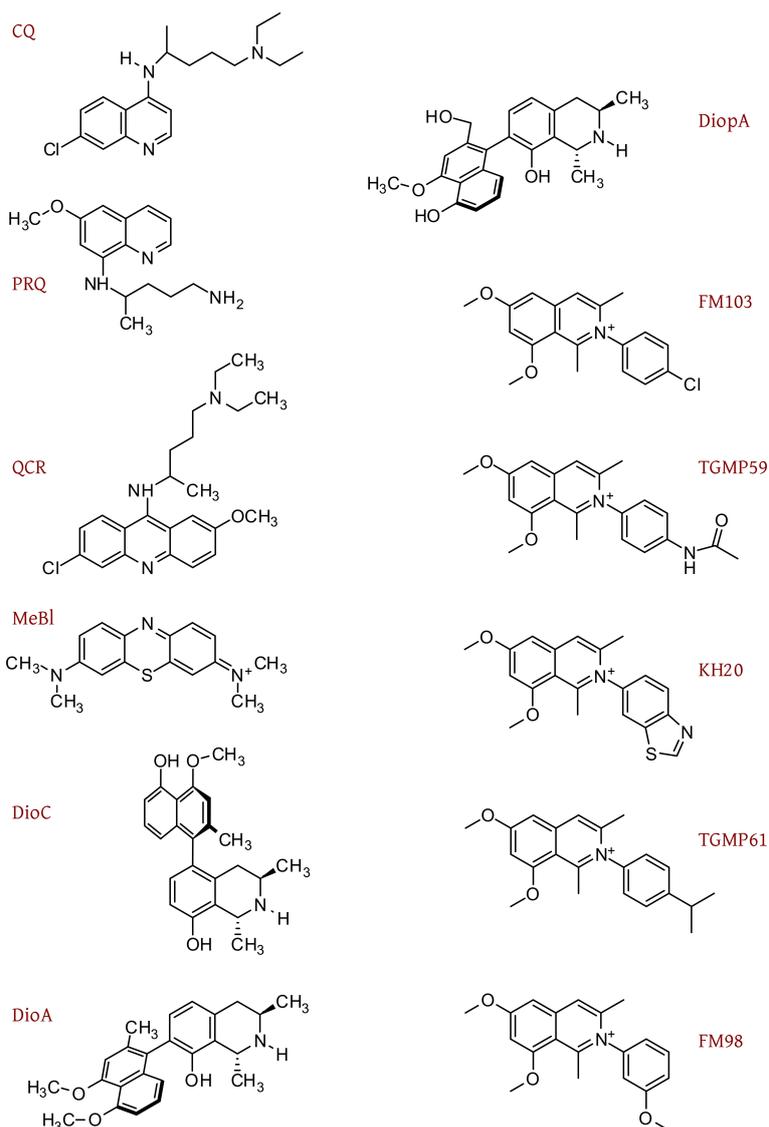


Abbildung 3.23: Übersicht einiger Substanzen mit Aktivität gegen Malaria: Chloroquin (CQ), Primaquin (PRQ), Quinacrin (QCR), Metylenblau (MeBl), Dioncophyllin C (DioC), Dioncophyllin A (DioA), Dioncopeltin A (DiopA), FM103, TGMP59, KH20, TGMP61, FM98.

Leone) und *Dioncophyllum thollonii* (Gabon). Eine nahe Verwandte ist *Ancistrocladus* (Regenwälder in Afrika und Asien).

Alle diese Pflanzen finden häufige Verwendung in der traditionellen Medizin der ortsansässigen Bevölkerung zur Behandlung einer Vielzahl tropischer Erkrankungen. Extrakte zeigen Wirkung gegen Bilharziose (Schistosomiasis), Chagas-Krankheit (Südamerikanische Trypanosomiasis), Schlafkrankheit (Afrikanische Trypanosomiasis), Leishmaniose, Flussblindheit (Onchozerkose), Elephantiasis und insbesondere Malaria.

In der Arbeitsgruppe von Prof. G. Bringmann (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) konnten bis heute 120 verschiedene *Naphthylisoquinolin-Alkaloide* aus *Dioncophyllaceae* isoliert werden. Weiterhin wurden Syntheserouten für die Naturstoffe und vereinfachte Analoga der identifizierten Moleküle entwickelt. [52]

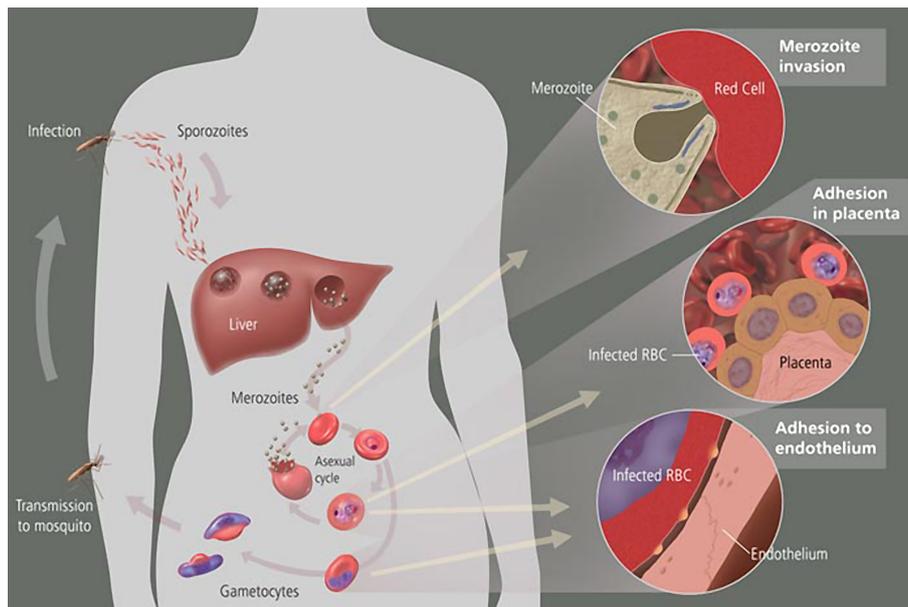


Abbildung 3.24: Lebenszyklus von *Plasmodium*. Nachdem der Mensch von einer infizierten Anopheles-Mücke gestochen wurde, sondert sie mit ihrem Speichel *Sporozoiten* ab. Diese gelangen durch die Blutbahn in die Leber, wo sie in die Zellen des Lebergewebes eindringen, sich vermehren und dort zu *Leberschizonten* heranreifen. Der Schizont platzt und die *Merozoiten* gelangen in die Blutbahn. Die Merozoiten befallen im Blutkreislauf Erythrozyten und verwandeln sich dort in sog. *Ringformen*. Aus einem kleinen Teil dieser Ringformen entstehen männliche und weibliche *Gametozyten*, welche für die Fortpflanzung der Parasiten in der Anopheles-Mücke verantwortlich sind. Der übrige Teil der Ringformen entwickelt sich zu *Trophozoiten*, welche wiederum zu Merozoiten werden. Hier beginnt der Kreislauf von Neuem und weitere Erythrozyten werden infiziert. Die Inkubationszeit beträgt im Mittel 12 Tage. [30]

NIQs bestehen aus einem Naphthalin- und einem Isoquinolin-Teil, die über eine meist nicht-rotierbare Biarylachse verbunden sind.

Funktion der Wirkstoffe

Fast alle Wirkstoffe zielen in ihrer Wirkung auf das Blutstadium der Malaria-Infektion. Während der Infektion der Erythrozyten (siehe Abb. 3.24) baut der Parasit das Protein Hämoglobin ab, um daraus essentielle Aminosäuren zu erhalten. Die dabei entstehenden Abbauprodukte sind für Plasmodien toxisch und werden durch den Erreger mit Hilfe der Häm-Polymerase zu Hämozoin polymerisiert. Das kristalline Hämozoin ist für Plasmodien unschädlich. Im Jahr 2000 konnte erstmals die Röntgenkristallstruktur von Hämozoin aufgeklärt werden, die identisch mit dem synthetisch hergestellten β -Hämatin ist [53].

Hier liegt der Ansatzpunkt der meisten Antimalaria-Wirkstoffe. Sie verhindern die Kristallisation von Hämin zu Hämozoin, indem sie einen chemischen Komplex mit Hämin bilden. Die resultierende Zunahme von toxischen Abbauprodukten führt zum Absterben der Parasiten. Trotz weltweiter Bemühungen ist der genaue Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig verstanden. Auch ein anderes molekulares Ziel kann nicht völlig ausgeschlossen werden [54, 55].

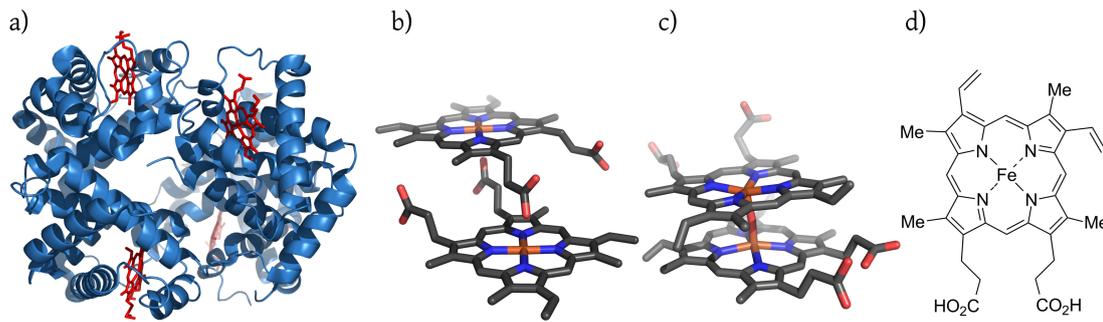


Abbildung 3.25: a) Hämoglobin mit Ferriprotoporphyrin IX (rot markiert), b) FPIX Chelat-Dimer c) FPIX μ -oxo-Dimer, d) Strukturformel von FPIX.

Ferriprotoporphyrin IX

Das molekulare Ziel der beschriebenen Wirkstoffe ist Ferriprotoporphyrin IX (*FPIX* oder *Hämin*, Abb 3.25) [54]. Hämin ist Bestandteil von Hämoglobin und für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlich. In wässriger Lösung kann es Multimere wie z. B. *chelate*- oder μ -*oxo-Dimer* bilden.

3.2.2 Problemstellung und Zielsetzung

Bis heute ist der Wirkmechanismus der meisten Antimalaria-Wirkstoffe nicht vollständig aufgeklärt. Kenntnis über die Vorgänge auf molekularer Ebene sind aber essentiell für das Verständnis der Entstehung von Resistenzen und die Entwicklung und Optimierung neuer Wirkstoffe. In diesem Projekt wurde die Wechselwirkung von FPIX mit verschiedenen bekannten und neuen Wirkstoffen charakterisiert. Im Zentrum des FPIX-Moleküls befindet sich ein paramagnetisches Eisenion, welches die Relaxation der umliegenden Kernspins so weit beschleunigt, dass konventionelle NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Molekülen nicht angewandt werden können. Aus diesem Grund wurde eine alternative Methode zur Strukturaufklärung paramagnetischer Molekülkomplexe durch NMR-Spektroskopie etabliert und weiterentwickelt, basierend auf Erkenntnissen, welche bereits in der Diplomarbeit [56] abgeleitet werden konnten.

3.2.3 Material und Methoden

Die Beschleunigung von Relaxationszeiten durch die Anwesenheit paramagnetischer Substanzen weist eine bestimmte Abstandsabhängigkeit auf (siehe Abschnitt 2.3.6). Beschrieben wird der Effekt durch die Solomon-Bloembergen-Gleichung (hier aufgelöst nach dem Abstand r):

$$r = \left(\frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2 S(S+1)}{R} \left(\frac{\tau_C}{1 + (\omega_S - \omega_I)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_S + \omega_I)^2 \tau_C^2} \right) \right)^{\frac{1}{6}} \quad (3.2)$$

Der Abstand r erstreckt sich zwischen dem paramagnetischen Zentrum (hier das Eisenion in FPIX) und einem Wasserstoffkern im komplexierten Wirkstoffmolekül. Aus der Gleichung erkennt man, dass zur Berechnung von r drei Parameter experimentell ermittelt werden müssen:

1. die T_1 -Relaxationszeit der Kernspins im Wirkstoffmolekül
2. die effektive Korrelationszeit des FPIX-Wirkstoff-Komplexes
3. der Spin-Zustand des Eisenions in FPIX

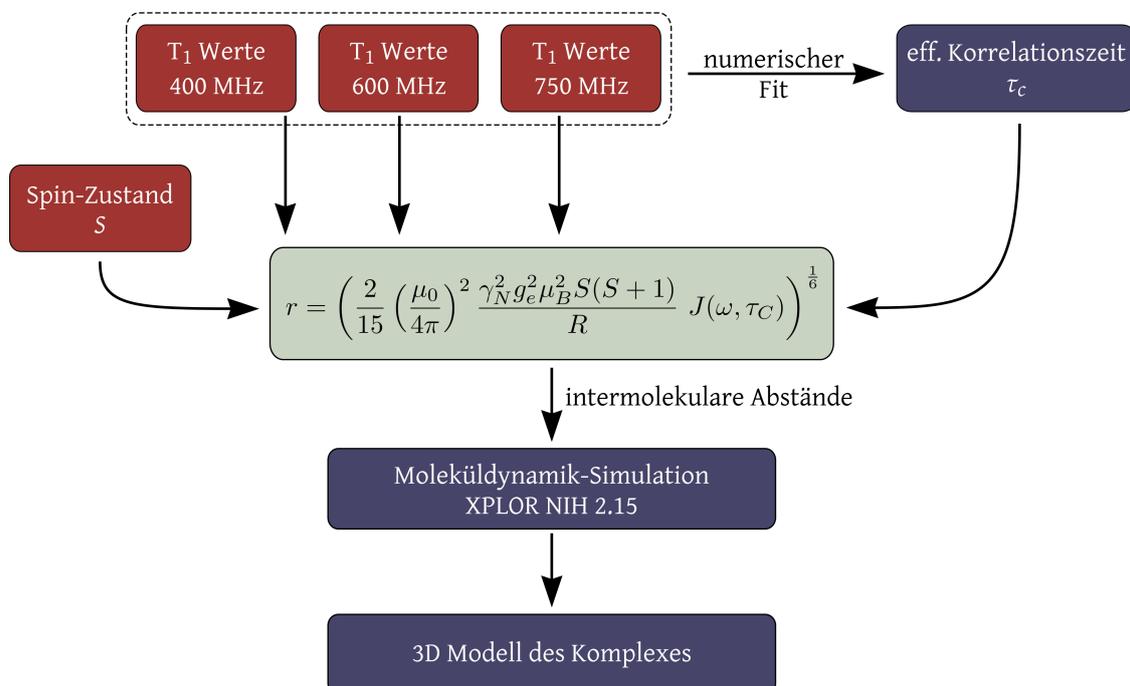


Abbildung 3.26: Flussdiagramm zur Bestimmung der Struktur paramagnetischer Molekülkomplexe

Methoden zur Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit und der effektiven Korrelationszeit wurden bereits in [56] erfolgreich etabliert. Zum besseren Verständnis werden sie auf den

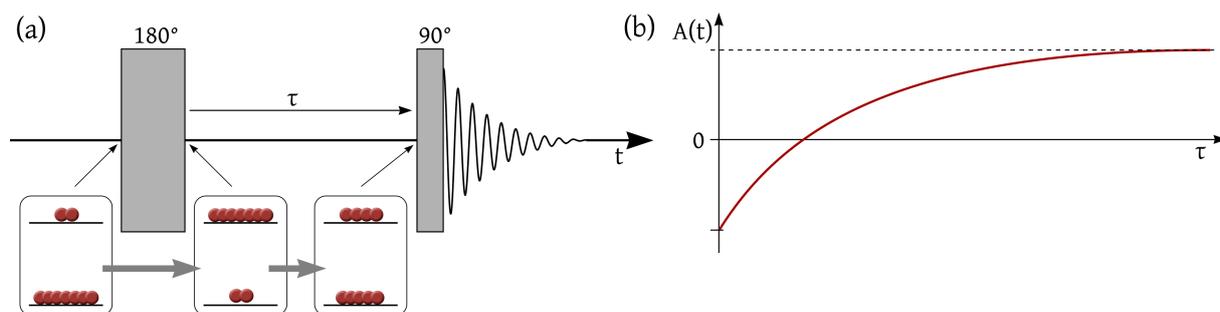


Abbildung 3.27: (a) T_1 Inversion-Recovery-Pulssequenz und jeweilige Population der Spin-Zustände, (b) Verlauf der Signalamplitude mit verschiedenen Wartezeiten τ (Abb. frei nach [12])

folgenden Seiten kurz zusammengefasst. In dieser Arbeit konnte die erforderliche Messzeit zur Bestimmung der effektiven Korrelationszeit erheblich gesenkt werden und zusätzlich der Spin-Zustand des Eisenions in FPIX experimentell ermittelt werden. Mit der nun vollständigen Methode wurde ein breites Spektrum bekannter und neuer Wirkstoffe gegen Malaria vermessen.

Sobald die intermolekularen Abstände bekannt sind, kann mit Hilfe der Moleküldynamiksimulation ein dreidimensionales Modell der FPIX-Wirkstoff-Komplexe berechnet werden.

3.2.3.1 Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit

Die experimentelle Bestimmung der longitudinalen Relaxationsraten erfolgt durch das so genannte *Inversion-Recovery-Experiment* (Abb. 3.27).

Die Sequenz besteht aus zwei RF-Pulsen, welche durch eine variable Wartezeit τ getrennt sind. Nach der Inversion der Spin-Populationen durch den 180° -Puls relaxieren die Spins während der Zeit τ teilweise zurück ins thermische Gleichgewicht. Der folgende 90° -Puls konvertiert die verbleibende z-Magnetisierung in xy-Magnetisierung, welche vom Spektrometer detektiert wird.

Die Amplitude des Signals verhält sich nach folgender Gleichung:

$$a(\tau) = \frac{1}{2} \mathfrak{B} \left(1 - 2e^{-\tau/T_1} \right) \quad (3.3)$$

Ihr Verlauf ist in Abb. 3.27 (b) gezeichnet.

Durch Variation der Wartezeit τ wird die Relaxation des Spin-Systems zu mehreren Zeitpunkten abgetastet und durch einen numerischen Fit an Gl. 3.3 der Parameter T_1 berechnet. Die Messung von T_1 erfolgt unabhängig für jedes Signal im NMR-Spektrum. Multipletts auf Grund von J-Kopplung wurden zu einem Signal zusammengefasst.

Schneller chemischer Austausch

Experimentell ermittelte Relaxationszeiten unterliegen auch dem chemischen Austausch. Chemischer Austausch bedeutet, dass die einzelnen Komponenten in der Probe zunächst räumlich voneinander getrennt vorliegen, danach für eine gewisse Zeit eine Verbindung (oder einen Komplex) eingehen, um sich daraufhin wieder zu trennen. Die Geschwindigkeit des chemischen Austauschs hängt ab von der Dissoziationskonstanten K_D und liegt im hier betrachteten Fall im Bereich von wenigen μs . Im Vergleich dazu ist die Abtastzeit eines NMR-Experiments (100 μs und mehr) sehr groß. Man spricht deshalb von *schnellem chemischen Austausch*. Als Konsequenz sind die beobachtbaren Relaxationsrate $R_{\text{observed}} = \frac{1}{T_1}$, Mittelwerte aus den Relaxationsraten des freien Wirkstoffs R_{free} und des an FPIX gebundenen Wirkstoffs R_{complex} :

$$R_{\text{observed}} = (1 - f) R_{\text{complex}} + f R_{\text{free}} \quad (3.4)$$

Die Gewichtung erfolgt durch den Molenbruch f von FPIX. Dieser gibt den Anteil von FPIX in der Lösung an.

Durch geschickte Ausnutzung des schnellen chemischen Austauschs konnte 2002 zum ersten Mal die Struktur eines paramagnetischen Komplexes mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden [57]. Die Solomon-Bloembergen-Gleichung erfordert die Messung der T_1 -Relaxationszeiten der gebundenen Wirkstoffe (welche einen 1:1-Komplex mit FPIX bilden). Eine NMR-Probe würde also gleiche Mengen von FPIX und Wirkstoff enthalten. Diese hohe Konzentration paramagnetischer Substanz führt aber zu massiver Signalverbreiterung, sodass sie in der Praxis nicht umsetzbar ist. Das Problem kann durch eine NMR-Titration umgangen werden: Es wird eine Reihe von Proben angesetzt, die ansteigende Konzentrationen von FPIX enthalten (typisch von 1:100 bis 1:10 FPIX:Wirkstoff), während die Konzentration des Wirkstoffs konstant gehalten wird (ca. 2 mM). Ihre Relaxationsraten verhalten sich dann wie der Molenbruch des in der Probe enthaltenen FPIX und die Relaxationsraten können über einen Geradenfit auf die Relaxationsraten R_{complex} im 1:1-Komplex extrapoliert werden.

Die T_1 -Relaxationsraten aller Proben wurden mit XWINNMR Version 3.5 ermittelt. Die Extrapolation auf die Relaxationsraten im 1:1-Komplex wurde mit MATHEMATICA Version 5 bzw. Version 6 durchgeführt.

3.2.3.2 Bestimmung der effektiven Korrelationszeit τ_C

Die experimentell ermittelten Relaxationsraten $R(\text{complex})$ unterscheiden sich je nach Feldstärke B_0 des verwendeten Spektrometers. Die Solomon-Bloembergen-Gleichung beschreibt diese Abhängigkeit von der Resonanzfrequenz ω . Es wird die Annahme getroffen, dass die Struktur der Moleküle unabhängig vom äußeren Magnetfeld ist. Das bedeutet, dass

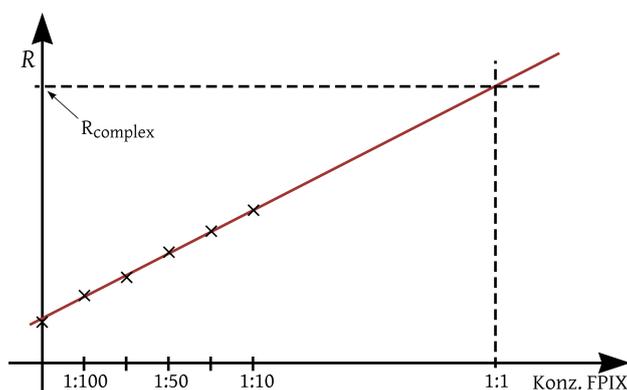


Abbildung 3.28: Interpolation der Relaxationsraten $R_{complex}$

die Solomon-Bloembergen-Gleichung für die gleiche Probe gemessen unter verschiedenen Feldstärken das gleiche Ergebnis (den Abstand r) liefern muss. Es muss also ein Wert für τ_C gefunden werden, bei dem diese Bedingung erfüllt ist.

In der praktischen Umsetzung wurde jede Probe an drei Spektrometern verschiedener Resonanzfrequenzen untersucht, z. B. 400, 600, 750 MHz oder 400, 600, 800 MHz. Es standen Spektrometer von 400 bis 800 MHz zur Verfügung. Ein numerischer Fit der Solomon-Bloembergen-Gleichung an die Messwerte liefert die effektive Korrelationszeit τ_C .

Der Fit von zwei Parametern durch drei Datenpunkte bei einer komplizierten Funktion wie der Solomon-Bloembergen-Gleichung ist nicht unproblematisch. Allerdings kann die Berechnung für jedes Proton im Wirkstoff unabhängig voneinander durchgeführt werden, da die Relaxationsraten einzeln bestimmt wurden. Es stehen also für jeden Wirkstoff ca. 10 Datensätze zur Verfügung. Sie werden einzeln gefittet und der Mittelwert für die weiteren Berechnungen verwendet. Es zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der einzelnen Korrelationszeiten. Der Fit der effektiven Korrelationszeiten wurde mit MATHEMATICA Version 5 bzw. Version 6 durchgeführt.

Experimente wurden an folgenden Spektrometern durchgeführt:

Spektrometer	^1H -Larmorfrequenz		Standort
Bruker Avance 400	400 MHz	9,4 T	Lehrstuhl für Organische Chemie, Würzburg
Bruker Avance 400	400 MHz	9,4 T	Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth
Bruker DMX 600	600 MHz	14,1 T	Lehrstuhl für Organische Chemie, Würzburg
Bruker Avance 600	600 MHz	14,1 T	Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth
Bruker Avance 750WB	750 MHz	17,6 T	Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5, Würzburg
Bruker Avance 800	800 MHz	18,8 T	Lehrstuhl für Biopolymere, Universität Bayreuth

3.2.3.3 Bestimmung des Spin-Zustandes

Der Spin-Zustand des Eisenions in FPIX kann über die *Evans-Methode* [58, 59, 60] bestimmt werden. Die Anwesenheit paramagnetischer Ionen verursacht eine Verschiebung der Resonanzfrequenzen um Δf [58]:

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{2\pi}{3} (\chi - \chi_0) \quad (3.5)$$

Dabei ist f_0 die Spektrometer-Basisfrequenz, χ die Suszeptibilität der Lösung mit paramagnetischen Ionen, χ_0 die Suszeptibilität einer diamagnetischen Referenzlösung und $k = \frac{3}{2\pi}$ ist der Geometriefaktor einer idealen zylinderförmigen Probe. Daraus folgt für die Suszeptibilität χ einer gelösten paramagnetischen Substanz:

$$\chi = k \frac{\Delta f}{f_0} + \chi_0 \quad (3.6)$$

Der Faktor k beschreibt die Geometrie der Probe und muss zu Beginn jedes Experiments durch die Messung eines Standardradikals mit bekannter Anzahl freier Elektronen kalibriert werden. Als Signalquelle dienen die Lösungsmittelsignale von Probe und Referenz. Der diamagnetische Beitrag kann im Vergleich zur paramagnetischen Komponente vernachlässigt werden ($\chi_0 \ll \chi$). Damit folgt für die molare Suszeptibilität $\chi_m = \chi V_m$ (mit dem molaren Volumen $V_m = \frac{M}{\rho}$):

$$\chi_m = \chi V_m = k V_m \frac{\Delta f}{f_0} \quad (3.7)$$

Wie in Abschnitt 2.4 gezeigt wurde, verhält sich die paramagnetische Suszeptibilität gemäß dem Curie-Gesetz:

$$\chi_m = \frac{C}{T} \quad \text{mit } C = \frac{\mu_0 S(S+1) g_e^2 \mu_B^2 N_A}{3k_B} \quad (3.8)$$

Aus den Gleichungen 2.61 und 3.7 ergibt sich ein Ausdruck, mit dessen Hilfe der Spin-Zustand S einer Substanz aus der Frequenzaufspaltung Δf bestimmt werden kann [59]:

$$S(S+1) = \frac{3k_B}{g_e^2 \mu_B^2 \mu_0 N_A} \cdot k V_M T \frac{\Delta f}{f_0} \quad (3.9)$$

Darin ist N_A die Avogadro-Konstante, μ_B das Bohr'sche Magneton, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Proben temperatur. Häufig wird auch die effektive Anzahl freier Elektronen $n_{eff} = 2S$ angegeben.

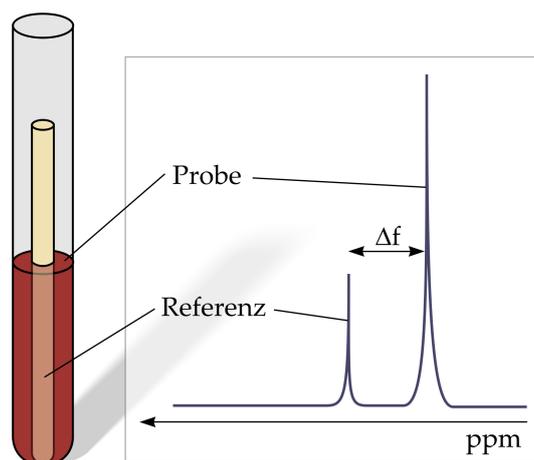


Abbildung 3.29: Bestimmung des Spin-Zustandes nach der *Evans-Methode* [58, 59, 60].

3.2.3.4 Bestimmung der Komplex-Stöchiometrie: „Job-Plot-Analyse“

Die Stöchiometrie chemischer Komplexe kann mit Hilfe der *Job-Plot-Analyse* [61, 62] bestimmt werden. Die Methode ermittelt die optimale Stöchiometrie einer Reaktion anhand eines Parameters, der sich im Reaktionsverlauf verändert. Im hier vorliegenden Fall wird die Änderung des Spinzustandes von FPIX bei Zugabe von einem Wirkstoff beobachtet. Eine alternative Möglichkeit ist die Messung der UV-Absorption einer bestimmten Absorptionsbande von FPIX.

Die Methode verläuft analog zur Bestimmung des Spin-Zustandes, mit dem Unterschied, dass FPIX und der Wirkstoff in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt werden, so dass die Summe der Konzentrationen konstant bei 2 mM bleibt. Es wurden folgende Proben mit dem FPIX-Wirkstoff-Verhältnis von 0,1 ... 1 in Schritten von 0,1 hergestellt.

Für jede Probe wird die Differenz der chemischen Verschiebung von Referenz- und Messlösung Δf ermittelt und über die molare Konzentration von FPIX aufgetragen. Am Maximum der Kurve kann die relative Stöchiometrie der FPIX-Wirkstoff-Komplexe abgelesen werden.

3.2.3.5 Proben

Folgende Materialien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen: Ferriprotoporphyrin IX Chlorid (FPIX), Chloroquin-Diphosphatsalz (CQ), Primaquin Disphosphat (PRQ), Quinacrin Dihydrochlorid (QCR), 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin 1-oxyl (TEMPO), Tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propionsäure Natriumsalz (TSP), Phosphat gepuffte Kochsalzlösung (PBS), 5 mm NMR-Röhrchen und WILMAD Coaxial Inserts.

Deuteriumoxid (D_2O), Methan- d_1 -ol (MeOD) und Deuterium-Natrium-Oxid (NaOD) wurde von Euroisotop (Saarbrücken, Deutschland) bezogen.

Die im Laufe des Projektes untersuchten Wirkstoffe können in drei Klassen eingeteilt werden.

T_1 -Messungen an Aminoquinolin-Derivaten Es wurden Stammlösungen der Wirkstoffe (20 mM) in deuteriertem PBS-Puffer bzw wässriger MeOD-Lösung (30% vol/vol, deuterierter PBS-Puffer) und FPIX (7,5 mM) in 0,1 mM NaOH hergestellt und innerhalb einer Stunde verbraucht. Die Stammlösungen wurden in festgelegten Verhältnissen gemischt und mit 750 μ l deuteriertem PBS-Puffer aufgefüllt, sodass die endgültige Konzentration in den Proben 2 mM Wirkstoff und 0 - 0,2 mM FPIX betrug. CQ bei pH 6,5 wurde zuvor bereits in [56] untersucht und hier erneut in verschiedenen Lösungsmitteln vermessen.

Wirkstoff		Lösungsmittel	pH
Chloroquin	CQ	D ₂ O	6,5
		D ₂ O	9,0
		D ₂ O/MeOD 3:1	
Methylenblau	MeBl	D ₂ O	6,5
Primaquin	PRQ	D ₂ O	6,5
Quinacrin	QCR	D ₂ O	2,4

T_1 -Messungen an C,C-gekoppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloiden Proben der N,C-NIQs wurden in der AG Bringmann hergestellt [63]. Es wurden Stammlösungen der Wirkstoffe (5 mM) in deuteriertem PBS-Puffer bzw. wässriger MeOD-Lösung (30% vol/vol, deuterierter PBS-Puffer) und FPIX (7,5 mM) in 0,1 mM NaOH hergestellt und innerhalb einer Stunde verbraucht. Die Stammlösungen wurden in festgelegten Verhältnissen gemischt und mit 750 μ l deuteriertem PBS-Puffer aufgefüllt, sodass die endgültige Konzentration in den Proben 2 mM Wirkstoff und 0 - 0,2 mM FPIX betrug. DioC bei pH 11 wurde bereits in [56] untersucht.

Wirkstoff		Lösungsmittel	pH
Dioncophyllin C	DioC	D ₂ O	5,6
		D ₂ O	11
		D ₂ O/MeOD 3:1	
Dioncopeltin A	DiopA	D ₂ O	11
		D ₂ O/MeOD 3:1	
Dioncophyllin A	DioA	D ₂ O	11
		D ₂ O/MeOD 3:1	
Korupensamin A	KorupA	D ₂ O	11

T_1 -Messungen an N,C-gekoppelten Arylisoquinolinen Proben der N,C-NIQs wurden in der AG Bringmann hergestellt [64]. Zur Charakterisierung der N,C-gekoppelten Arylisoquinoline wurden Stammlösungen (5 mM) in wässriger DMSO-Lösung (10% vol/vol, deuterierter PBS-Puffer) und FPIX (7,5 mM) in 0,1 mM NaOH hergestellt und innerhalb einer

Stunde verbraucht. Die Arylisochinolin- und FPIX-Stammlösungen wurden in festgelegten Verhältnissen gemischt und mit 800 μl deuteriertem PBS-Puffer aufgefüllt, sodass die endgültige Konzentration in den Proben 2 mM Wirkstoff und 0 - 0,2 mM FPIX betrug.

Wirkstoff		Lösungsmittel	pH
TGMP59	GBAP104	D ₂ O	5,6
		D ₂ O	6,5
KH20	GBAP187	D ₂ O	5,6
		D ₂ O	6,5
FM103	GBAP99	D ₂ O	5,6
		D ₂ O	6,0
		D ₂ O	6,5
TGMP61		D ₂ O	6,5
FM98	GBRB94	D ₂ O	6,5

Für alle Wirkstoffe wurden die NMR Signale mit Hilfe von ¹H-¹H-COSY Spektren zugeordnet. Die Proben temperatur während aller NMR-Experimente betrug 300 K. Es wurden Proben mit den Konzentrationsverhältnissen FPIX(monomer):Wirkstoff 0:1, 1:100, 1:80, 1:50, 1:20, 1:10 hergestellt. In keiner der Proben konnte eine Änderung der chemischen Verschiebung der Wirkstoffsignale festgestellt werden.

Proben für die Bestimmung des Spin-Zustandes

Zur Bestimmung des Spin-Zustandes über die Differenz der chemischen Verschiebung wurden zwei koaxial ineinander gesteckte NMR-Röhrchen (WILMAD coaxial inserts) verwendet. Die innere Kapillare enthielt eine diamagnetische Referenzlösung aus 100 μl 1 mM TSP Lösung in D₂O mit 10 mM PBS-Puffer (pH-Wert wie Mess-Lösung). Zur Kalibrierung des Geometriefaktors k wurde das äußere Röhrchen mit 1 mM TSP und 2 mM des Standardradikals TEMPO ($n_{eff} = 1$) gefüllt. Messlösungen enthielten 1,0 mM FPIX (Dimer), 1 mM TSP und steigende Konzentrationen Wirkstoff (0 - 8 molare Äquivalente zu FPIX) in 500 μl D₂O mit 10 mM PBS-Puffer. Um eventuelle Verunreinigung durch paramagnetischen Sauerstoff zu entfernen, wurde Argon für 30 Minuten durch die Proben geleitet. Von jeder Messlösung wurden schließlich 300 μl in das äußere NMR-Röhrchen gefüllt. Die Proben wurden in der AG Bringmann hergestellt [63].

1D-¹H-NMR-Spektren von jeder Probe wurde an einem Bruker DMX 600 (14.1 T) Spektrometer (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) aufgenommen und der Unterschied der chemischen Verschiebung der TSP- und Lösungsmittelsignale Δf ermittelt.

3.2.3.6 Moleküldynamik-Simulation

Aus den Ergebnissen der vorherigen Experimente lassen sich die intermolekularen Abstände zwischen den Protonen des Wirkstoffmoleküls und dem Eisenzentrum in FPIX berechnen. Um aus diesen experimentellen Daten eine dreidimensionale Struktur des FPIX-Wirkstoff-Komplexes bestimmen zu können, wird die *Moleküldynamiksimulation* (MD-Simulation) verwendet.

X-PLOR

Zur Durchführung der Moleküldynamiksimulation wurde die Software *X-PLOR NIH Version 2.16* [65] verwendet. Computermodelle der Wirkstoffmoleküle wurden mit *ChemOffice Ultra Version 9* erstellt. Jedes Molekül wurde einzeln einer *simulated annealing* Phase mit anschließender Energieminimierung unterzogen, um eine energiearme Ausgangskonfiguration der Moleküle zu erzeugen. Die für die MD-Simulationen notwendigen Parameter- und Topologie-Dateien wurden, soweit vorhanden, aus der HiCUP-Datenbank [66] abgerufen bzw. mit dem dort verfügbaren Programm *XPLO2D* erstellt. Ausgangspunkt für die Struktur des FPIX-Dimers war eine Röntgenkristallstruktur [67].

X-PLOR untergliedert die Moleküldynamiksimulation in mehrere Schritte. Jeder wird durch ein separates *Input-File* beschrieben (Listings siehe [56]):

1. `sa.inp`
Hochtemperaturphase der Simulation. Anfangstemperatur 2000 K, Abkühlung in 100.000 Schritten.
2. `refine.inp`
Verfeinern der in 1. erzeugten Strukturen. Anfangstemperatur 1000 K, Abkühlung in 200.000 Schritten.
3. `accept.inp`
Sortieren der Strukturen nach Energie und verwerfen von Modellen mit fehlerhafter Chiralität.

Für jeden Komplex wurden 400 Strukturen berechnet (24 - 48 Stunden Rechenzeit). Um die Dynamik des Komplexes nicht zu stark einzuschränken, wurden Abweichungen von $\pm 0,2$ nm von den experimentell ermittelten Abständen zugelassen. Für alle weiteren Analysen wurden die 30 energieärmsten Modelle selektiert. Die akzeptierten Strukturen wurden mit der Software PyMOL [68] überlagert, d. h. ihre relative Orientierung im Raum wird so angepasst, dass die Strukturen möglichst gut zur Deckung kommen. Je genauer die Moleküle aufeinander passen, desto höher ist die Qualität des Ergebnisses.

3.2.3.7 Massenspektrometrie

Es wurden Stammlösungen von FPIX (2.5 mM, Dimer) und CQ (5mM) in MeOH:H₂O (3:1 vol/vol) unmittelbar vor den Messungen hergestellt. FPIX und CQ wurden im molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und mit MeOH:H₂O (3:1 vol/vol) auf eine Konzentration von 250 µM CQ und 125 µM FPIX-µ-oxo-dimer verdünnt. Der pH-Wert der Proben betrug ca. 7. Analog wurden Proben in MeOD:D₂O hergestellt.

Electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) Massenspektren wurden an einem Bruker Daltonics micrOTOF focus Massenspektrometer (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) mit ESI Ionenquelle (Apollo) aufgenommen. Ionen wurden kontinuierlich durch Einbringen der Proben über eine Spritzenpumpe (Cole Palmer Instruments 789100C) mit einer Flussrate von 4 µl/min erzeugt. Die Messparameter waren: Capillary voltage -4.6 kV; end plate voltage: -4.1 kV; exit voltage: 110 V; skimmer voltage: 60 - 70 V; hexapol RF: 400 V; Set Flight tube: 9000 V; Set Corrector Fill: 56 V; Set Pulsar Pull 406 V; Set Pulsar Push: 406 V; Transfer Time: 89 µs; Pre Puls Storage: 20 µs; temperature of drying gas: 50°C; dry gas flow 2.0 l/min; nebulizer pressure 0.5 bar; vacuum in the TOF analyzer $3.12 \cdot 10^7$ mbar; mass range m/z 200 - 3000. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte nach den Messungen mit einer 1:100 verdünnten Lösung von ES Tuning Mix (G2421A; Agilent) in 95% Acetonitril / 5% Wasser mit m/z 622, 922, 1522, 2122.

In den Messungen wurden Mittlungen über 24 Scans aufgenommen, um das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu verbessern. Da Eisen und Chlor eine große Isotopenverteilung zeigen, war die Intensität des Isotops mit kleinster Masse (X+0) nicht ausreichend für eine akkurate Messung. Stattdessen wurde das Isotop mit der größten Intensität (X+n) verwendet und mit den theoretisch vorhergesagten Werten verglichen. Zur Berechnung der Isotopenverteilung wurden das Softwaremodul Bruker Daltonics IsotopePattern (aus Compass 1.1) verwendet.

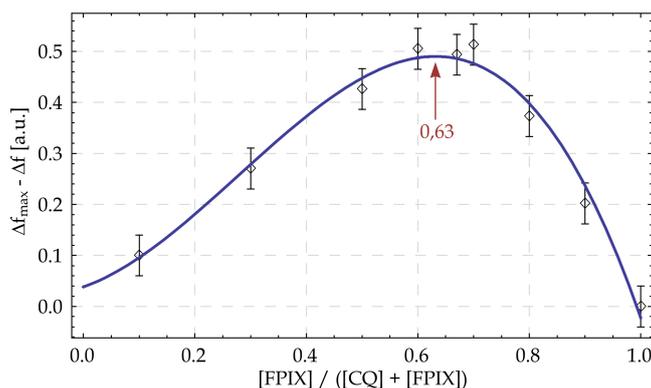


Abbildung 3.30: Job-Plot-Analyse für den FPIX-CQ-Komplex

3.2.4 Ergebnisse

3.2.4.1 Job-Plot-Analyse: Stöchiometrie der FPIX-Wirkstoff-Komplexe

Die Job-Plot-Analyse mittels NMR wurde für den Komplex aus FPIX und CQ bei pH 6,5 durchgeführt. In Abb 3.30 sind die Messergebnisse aufgetragen. Das Maximum der Kurve liegt bei 0,63 Anteilen von FPIX in der Lösung. Daraus geht hervor, dass der FPIX-CQ-Komplex eine relative Stöchiometrie von zwei FPIX-Monomer-Einheiten zu einem Molekül CQ aufweist.

Job-Plot-Analysen für weitere Substanzen und Lösungsmittel wurde in der AG Bringmann zusätzlich mit UV-Spektroskopie durchgeführt [63, 69]. In der UV-Spektroskopie kann im Vergleich zum NMR-Experiment mit geringeren Konzentrationen der Substanzen gearbeitet werden, sodass die Komplexe auch bei neutralem pH-Wert ausreichend löslich sind. In diesen Experimenten konnte die Ergebnisse der NMR Versuche bestätigt werden. So zeigte sich für die Komplexe FPIX:DioC (pH 6,5 und 11) und FPIX:FM103 ebenfalls eine Stöchiometrie von 2:1 [63, 64, 69].

3.2.4.2 Spin-Zustand der Komplexe

Der Spin-Zustand von FPIX im Komplex mit CQ (pH 6,5; pH 9; MeOD), DioC (pH 11), DiopA (pH 11) und FM103 (pH 6,5) wurde aus Messungen der Suszeptibilität bestimmt. Er wurde für eine Konzentrationsreihe mit steigendem molarem Anteil Wirkstoff in den Lösungen gemessen: 1 FPIX zu 0 - 8 molaren Äquivalenten Wirkstoff.

Für die FPIX-NIQ-Komplexe zeigte sich eine konstante Zahl freier Elektronen $n_{eff} \approx 3,2$, was einem Spin-Zustand von $S = \frac{3}{2}$ entspricht. Ähnlich verhält sich FPIX:CQ in 30% wässriger MeOD-Lösung mit $n_{eff} \approx 2,6$. FPIX:CQ in Wasser (pH 6,5 und 9) hingegen zeigte einen veränderlichen Spin-Zustand. Ebenso wie in den anderen Proben nimmt reines FPIX zunächst den Zustand $S = \frac{3}{2}$ ein. Bei Zugabe von CQ reduziert sich der Spin-Zustand und bleibt ab dem molaren Verhältnis von einem Molekül FPIX zu zwei Molekülen CQ konstant

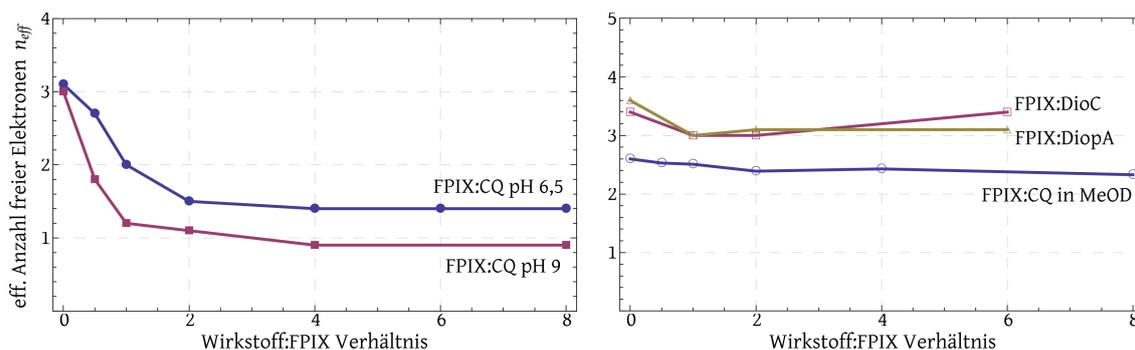


Abbildung 3.31: Verlauf des Spin-Zustandes von FPIX bei Zugabe verschiedener Wirkstoffe.

bei $S = \frac{1}{2}$ ($n_{eff} \approx 1,4$ für pH 6,5 und $n_{eff} \approx 1,0$ für pH 9). Eine genaue Erklärung für dieses Verhalten wird im nächsten Abschnitt gegeben. Der Verlauf ist in Abb. 3.31 gezeigt. Das anfängliche Absinken des Spin-Zustandes ist in der Literatur bisher nicht bekannt. Für den FPIX-CQ-Komplex wird $S = \frac{1}{2}$ angegeben [57], der hier für einen Überschuss an Wirkstoff bestätigt werden konnte.

Der FPIX-Tetramer-Komplex Eine Arbeitshypothese zur Erklärung der durch UV-Spektroskopie ermittelten Komplexstöchiometrie von 2:1 konnte bereits in [56] aufgestellt werden. In dieser Arbeit gelang die experimentelle Bestätigung der Idee. Der veränderliche Spin-Zustand von FPIX und die im Job-Plot ermittelte Komplexstöchiometrie kann durch die Einführung des folgenden Modells erklärt werden [70]:

In Lösung liegt FPIX als Tetramer, genauer als doppelter μ -oxo-Dimer vor, welcher an seinen Außenseiten Bindungsstellen für insgesamt zwei Wirkstoffmoleküle bietet (siehe Abb 3.32). Die μ -oxo-Dimere sind durch Bindung der Carboxygruppen an das Eisenzentrum des jeweils anderen μ -oxo-Dimers verbunden. Dieser Bindungsmechanismus wurde auch in β -Hämatin, der kristallisierten Form von FPIX wie sie durch *Plasmodium* erzeugt wird, nachgewiesen [53]. Ein solcher Komplex kann durch die Ligandenfeldtheorie beschrieben werden (siehe Kapitel 2.5). Alle Eisenatome sind oktaedrisch gebunden. Die beiden inneren Eisenatome, welche die Verbindung zwischen den μ -oxo-Dimern herstellen, werden durch vier Stickstoffatome im Porphyringerüst von FPIX, einem Sauerstoff (μ -oxo-Dimerbrücke) und einer Carboxygruppe des zweiten μ -oxo-Dimers umschlossen. Dies führt zu einer starken Aufspaltung Δ der Molekülorbitale t_{2g} und e_g , das wiederum zu einer *low spin* Konfiguration von Eisen mit einem Spin-Zustand von $S = \frac{1}{2}$ führt. Im Fall der Eisenatome in den Außenseiten des Tetramers ist die sechste Koordinationstelle durch ein Wassermolekül besetzt. Da Wasser ein relativ schwacher Ligand ist, verursacht es nur eine geringe Aufspaltung Δ der Molekülorbitale und Eisen nimmt die *high spin* Konfiguration $S = \frac{5}{2}$ an. Da durch NMR-Spektroskopie nur die Suszeptibilität der gesamten Probe bestimmt werden kann, erscheint der Komplex mit einem mittleren Spin-Zustand von $S = \frac{3}{2}$.

Bei der Bindung des starken Liganden CQ an den FPIX-Tetramer vergrößert sich auch die

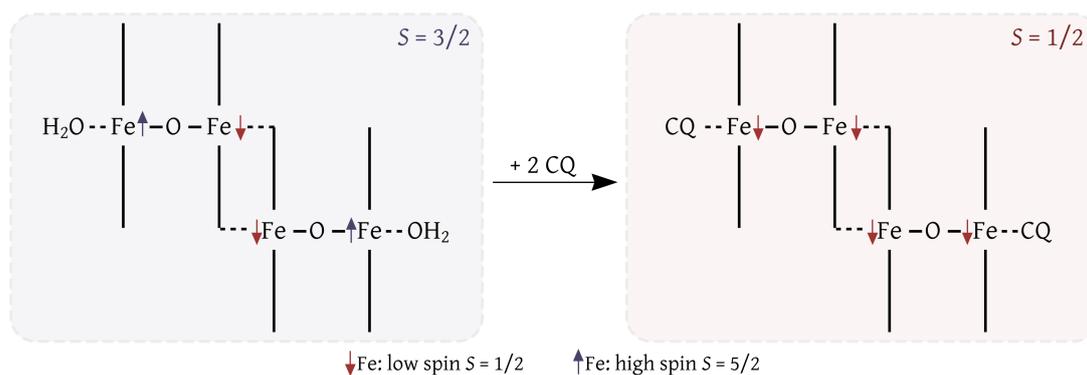


Abbildung 3.32: Modell des FPIX-Tetramer Komplexes

Aufspaltung ΔO der Molekülorbitale der äußeren Eisenatome und sie wechseln den Spin-Zustand von $S = \frac{5}{2}$ zu $S = \frac{1}{2}$. Dies bedeutet für den gesamten Komplex eine Verschiebung des Spin-Zustandes von $S = \frac{3}{2}$ auf $S = \frac{1}{2}$. Exakt dieses Verhalten konnte in den NMR-Experimenten beobachtet werden. Die Änderung des Spin-Zustandes beginnt mit der Zugabe von CQ in die Lösungen und erreicht eine Sättigung bei doppeltem Überschuss von CQ, also genau dann, wenn beide Bindungsstellen des FPIX-Tetramers besetzt sind. Die absolute Stöchiometrie des Komplexes entspricht mit 4:2 ebenfalls den Messergebnissen der Job-Plot-Analysen durch NMR- und UV-Spektroskopie.

Massenspektrometrie Bestätigung für den FPIX-Tetramer-Komplex konnte außerdem durch Massenspektrometrie eingeholt werden. Bei genauer Analyse sind im Massenspektrum des FPIX-CQ-Komplexes zwei überlagerte Spezies zu erkennen. Der einfach protonierte Komplex $[\text{FPIX-O-FPIX-CQ} + \text{1H}]^+$ überlagerte dabei die ganzzahligen Signale des doppelt protonierten $[\text{CQ-FPIX-O-FPIX}_2\text{-O-FPIX-CQ} + \text{2H}]^{2+}$ („Tetramer-Komplex“). Erkennbar wird der Tetramer-Komplex durch die halbzahligen Signale zwischen den Isotopen des Dimers (siehe Abb. 3.33). Der Unterschied zwischen dem berechneten Maximum der Isotopenverteilung $[X+9]$ des Tetramers (m/z 1569,04111) und dem experimentell ermittelten Wert (m/z 1569,03806) beträgt nur 1,9 ppm. Zusätzlich stimmt die theoretische Isotopenverteilung von $[\text{C}_{172}\text{H}_{182}\text{Cl}_2\text{Fe}_4\text{N}_{22}\text{O}_{18}]^{2+}$ gut mit $[\text{CQ-FPIX-O-FPIX}_2\text{-O-FPIX-CQ} + \text{2H}]^{2+}$ überein. Damit konnte die Existenz des Tetramerkomplexes bestätigt werden.

In einem weiteren Experiment wurde die Massenspektrometrie des FPIX-CQ-Komplexes in deuteriertem Lösungsmittel (MeOD/D₂O vol/vol 3:1) wiederholt, um die Anzahl der austauschbaren Protonen zu bestimmen. Das FPIX-Molekül besitzt zwei Carboxygruppen mit jeweils einem austauschbaren Proton, der μ -oxo-Dimer folglich vier Austauschpositionen. CQ besitzt ein austauschfähiges N-H-Proton. Für den CQ-FPIX-O-FPIX₂-O-FPIX-CQ Tetramer ergeben sich also zehn Protonen, zwei weitere kommen durch die zweifache Ladung während der MS-Experimente hinzu. Insgesamt erwartet man also eine Massenerhöhung um 12 Einheiten. Experimentell konnte im *doppelt* geladenen Komplex eine Massenerhöhung 6 m/z (= 12 Einheiten bei einfacher Ladung) nachgewiesen werden (sie-

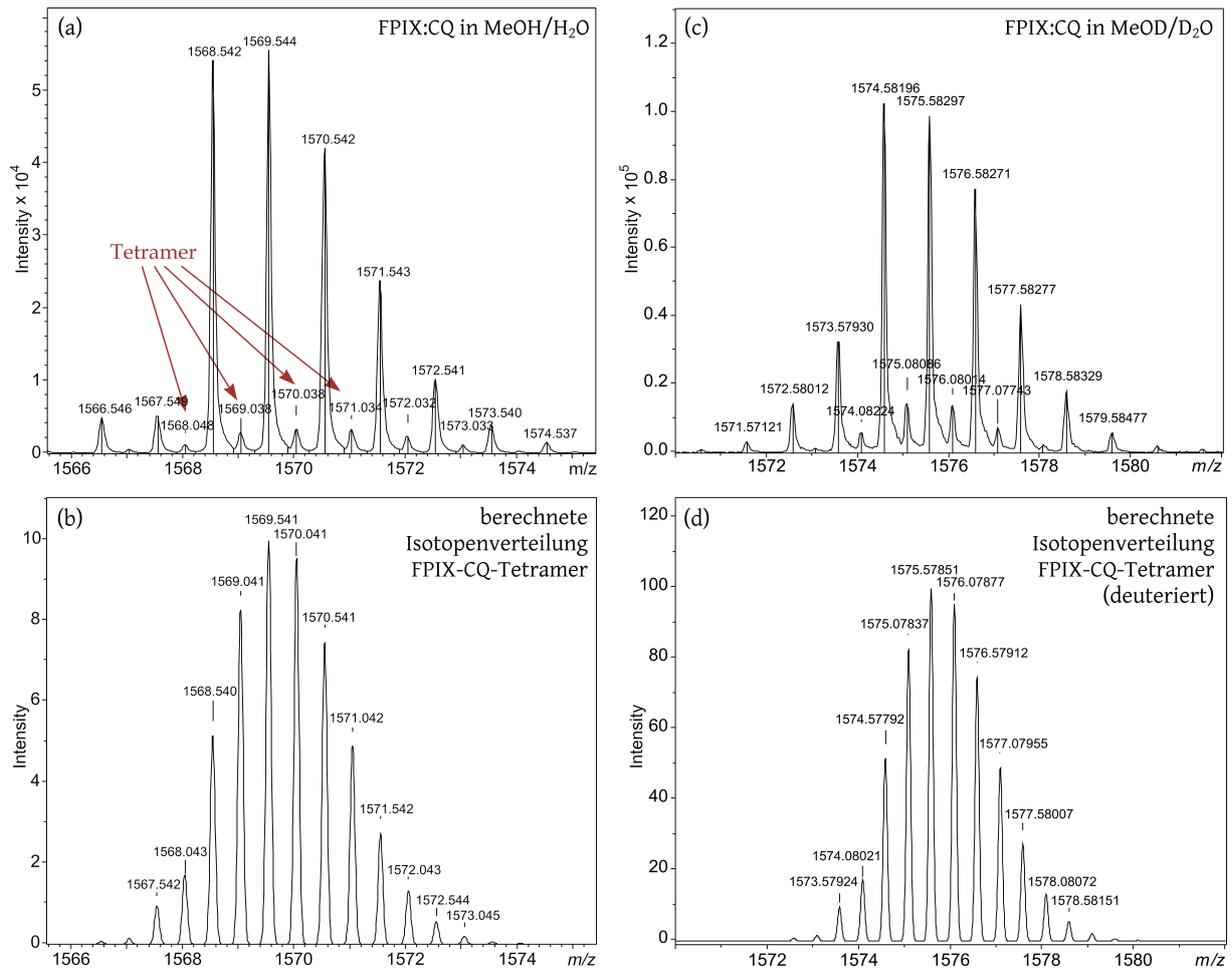


Abbildung 3.33: a) Massenspektrum des FPIX-CQ-Tetramer-Komplexes, c) Massenspektrum des FPIX-CQ-Tetramer-Komplexes in deuteriertem Lösungsmittel. b) und d) zeigen die zugehörigen theoretischen Isotopenverteilungen.

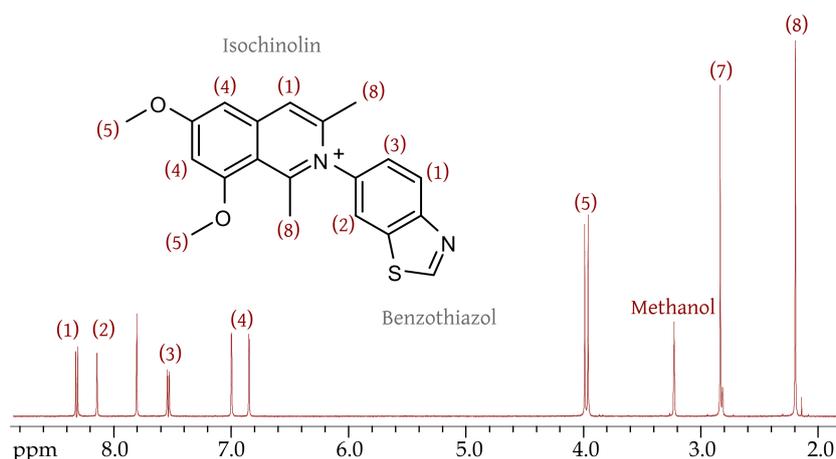


Abbildung 3.34: ^1H -NMR-Spektrum von KH20 und Zuordnung der Signale

he Abb. 3.33). Dies stimmt exakt mit dem theoretisch erwarteten Wert überein. Weiterhin stimmt auch die Isotopenverteilung für $X+9$ des nun 1575 m/z wiegenden Komplexes $[\text{C}_{172}\text{H}_{170}\text{Cl}_2\text{Fe}_4\text{N}_{22}\text{O}_{18}\text{D}_{12}]^{2+}$ mit der Theorie überein.

Weitere Komplexe, welche in der Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten, sind: $[\text{FPIX}]^+$ (m/z 614), $[2 \text{ CQ} + \text{H}]^+$ (m/z 639), $[\text{CQ-FPIX}]^+$ (m/z 993), $[\text{FPIX}_2 + \text{H}]^+$ (m/z 1231), $[\text{FPIX-O-FPIX} + \text{H}]^+$ (m/z 1249), $[\text{CQ-FPIX}_2 + \text{H}]^+$ (m/z 1550).

3.2.4.3 Relaxationsraten und effektive Korrelationszeit im Komplex

Die Bestimmung der Relaxationsraten im FPIX-Wirkstoff-Komplex und die anschließende Berechnung der Komplexstruktur werden im Folgenden exemplarisch für den Wirkstoff KH20 (pH 6,5) dargestellt. Daten für die übrigen Wirkstoffe wurden analog gewonnen und sind im Anhang A.4.1 beigefügt.

Das ^1H -NMR-Spektrum von KH20 mit der Zuordnung der Signale ist in Abb. 3.34 dargestellt. Es wurden Proben mit den Konzentrationsverhältnissen 0:1, 1:100, 1:80, 1:50, 1:20 und 1:10 FPIX:KH20 hergestellt und vermessen. Für jede Probe wurde die T_1 -Relaxationszeit jedes einzelnen Signals bestimmt. Die Extrapolation auf die Relaxationsraten im FPIX-KH20-Komplex R_{complex} ist in Abb. 3.35 dargestellt.

Effektive Korrelationszeit Um auch die effektive Korrelationszeit des FPIX-KH20-Komplexes berechnen zu können, wurden Relaxationsraten der oben genannten Proben an NMR-Spektrometern mit 400, 600 und 750 MHz Protonenresonanzfrequenz⁷ bestimmt und auf die Relaxationsraten im Komplex R_{complex} extrapoliert. In Tabelle 3.3 sind die ermittelten Daten aufgelistet.

⁷Bruker Avance 400 bzw. Bruker DMX 600 (Institut für Organische Chemie) und Bruker Avance 750WB (Experimentelle Physik 5), Universität Würzburg

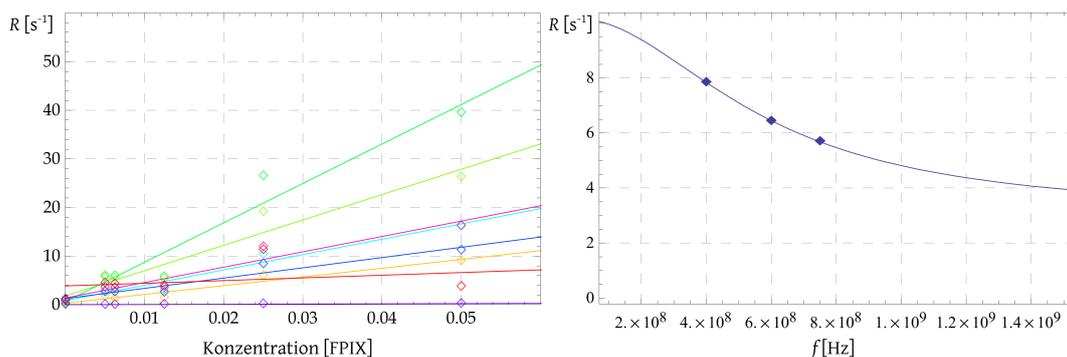


Abbildung 3.35: links: Extrapolation der Relaxationsraten im FPIX-KH20-Komplex für jedes Signal im Spektrum, rechts: Fit der effektiven Korrelationszeit für eines der Signale.

Nr	$R_{400\text{MHz}}$ [s^{-1}]	$R_{600\text{MHz}}$ [s^{-1}]	$R_{750\text{MHz}}$ [s^{-1}]	τ_c [ps]	r [nm]
1	227,39	195,05	180,08	1,86	0,573
2	969,10	635,05	521,22	3,88	0,467
3	795,52	858,64	810,99	1,96	0,453
4	350,17	339,87	315,16	1,00	0,526
5	290,18	242,07	210,87	2,53	0,554
6	(-0,46)	(2,65)	(4,42)	-	-
7	397,16	323,80	316,08	1,96	0,524
8	595,40	494,92	55,21	3,57	0,560

Tabelle 3.3: Extrapolierte Relaxationsraten des FPIX-KH20-Komplex bei 400, 600 und 750 MHz Protonenresonanzfrequenz. Daneben die effektive Korrelationszeit τ_c für jedes Signal (Mittelwert $\tau_c = 2,47 \pm 1,09$ ps) und der berechnete Abstand r vom Eisenzentrum in FPIX. Signal Nr. 6 stammt aus dem Lösungsmittel und liefert keine relevanten Informationen.

Durch einen numerischen Fit der Solomon-Bloembergen-Gleichung 3.2 an die Relaxationsraten wurde die effektive Korrelationszeit τ_c für jedes Signal einzeln berechnet. Trotz des komplizierten Fits durch nur drei Datenpunkte zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Korrelationszeiten. Für die anschließende Berechnung der intermolekularen Abstände (siehe Tabelle 3.3) wurde die mittlere Korrelationszeit $\tau_c = (2,47 \pm 1,09)$ ps verwendet.

Optimierte Bestimmung von τ_c Die effektive Korrelationszeit τ_c kann nicht nur aus den extrapolierten Relaxationsraten $R_{complex}$ bestimmt werden, sondern auch direkt aus den gemessenen Relaxationsraten z. B. der Probe FPIX:Wirkstoff 1:100. Im Fit der effektiven Korrelationszeit geht nur die relative Änderung der Relaxationsraten aufgrund unterschiedlicher Larmorfrequenzen bei verschiedenen B_0 -Feldstärken ein. Der diamagnetische Anteil ungebundener Wirkstoffmoleküle ist davon unabhängig. Wirkstoffmoleküle, welche aufgrund des hohen Konzentrationsüberschusses also keinen Komplex gebildet haben, beeinflussen deshalb den Fit der effektiven Korrelationszeit nicht. Es ist folglich ausreichend, die Relaxationsraten von nur einer Probe bei unterschiedlichen B_0 -Feldstärken zu bestimmen.

Dieses Verfahren wurde an KH20 verifiziert. Wie zuvor beschrieben, wurden für den FPIX-KH20-Komplex Relaxationsraten aller Proben an drei unterschiedlichen Spektrometern ge-

Probe	τ_c [ps]	SD [ps]
1:100	1,99	1,29
1:80	2,70	0,82
1:50	2,40	0,85
1:20	2,72	0,90
1:10	1,83	1,19
Mittelwert	2,33	0,41

Tabelle 3.4: Effektive Korrelationszeiten für FPIX:KH20. τ_c wurde getrennt aus den Relaxationsraten jeder Probe berechnet. Der Mittelwert über die einzelnen Proben stimmt gut mit der aus den extrapolierten Relaxationsraten $R_{complex}$ berechneten Korrelationszeit ($\tau_c = 2,47 \pm 1,09$ ps) überein.

messen. Für jede Konzentration wurde die effektive Korrelationszeit τ_c bestimmt (siehe Tabelle 3.4). Der berechnete Wert von τ_c jeder einzelnen Probe stimmt innerhalb der Fehlergrenzen gut mit dem für die extrapolierten Relaxationsraten $R_{complex}$ ermittelten Wert überein.

Damit genügt für die Bestimmung der effektiven Korrelationszeit eines FPIX-Wirkstoff-Komplexe, also die Vermessung einer einzigen Probe an drei verschiedenen Spektrometern. Die Relaxationsraten der übrigen Proben müssen an nur einem Spektrometer charakterisiert werden. Dies bedeutet eine Reduzierung der erforderlichen Messzeit um fast zwei Drittel.

Der gemessene Spin-Zustand für den FPIX-KH20-Komplex betrug $S = \frac{3}{2}$. Dies entspricht gemäß dem Modell des Tetramer-Komplexes einen Spin-Zustand von $S = \frac{5}{2}$ für das dem Wirkstoff zugewandte Eisenzentrum in FPIX. Damit wurden alle Parameter zur Berechnung der intermolekularen Abstände zwischen FPIX und KH20 bestimmt. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 3.3 angegeben. Sie wurden als NOE-Distanzbeschränkungen in eine XPLOR Moleküldynamiksimulation integriert.

Die größte Unsicherheit bei der Bestimmung intermolekularer Abstände entsteht durch Ungenauigkeiten in den Konzentrationsverhältnissen von FPIX und Wirkstoff. Hierdurch ändert sich potenziell der Geradenfit und es ergeben sich Abweichungen in den extrapolierten Relaxationsraten $R_{complex}$. Das Konzentrationsverhältnis kann mit einer Genauigkeit von $\pm 15\%$ eingestellt werden. Daraus kann der experimentelle Fehler in der Abstandsbestimmung mit $\pm 0,1$ nm abgeschätzt werden. In den anschließenden Moleküldynamiksimulationen wird eine Toleranz von 0,2 nm zugelassen, um die Flexibilität der Komplexe nicht einzuschränken. Die experimentellen Abweichungen spielen deshalb nur eine untergeordnete Rolle.

3.2.4.4 Moleküldynamiksimulation und Analyse der berechneten Komplex-Strukturen

Da der FPIX-Tetramer-Komplex symmetrisch aufgebaut ist und jeder FPIX μ -oxo-Dimer als unabhängige Bindungsstelle fungiert, wurden die Simulationen auf die Wechselwirkung eines Wirkstoffmoleküls mit einem FPIX μ -oxo-Dimer reduziert.

Es wurden 300 Modelle der Komplexe berechnet. Strukturen mit falscher Chiralität, verzerrter Geometrie oder Abweichungen von mehr als 0,2 nm von den berechneten Distanzbeschränkungen wurden aussortiert. Von den verbleibenden 250 Strukturen wurden die 30 Modelle mit der niedrigsten Gesamtenergie für weitere Analysen selektiert.

Die übrigen Wirkstoffe wurden analog charakterisiert. Abbildungen der berechneten Strukturen finden sich auf den Datenblättern im Anhang A.4.1. Im Folgenden werden die Ergebnisse präsentiert und diskutiert.

Aminoquinoline

Chloroquin (pH 6,5, pH 9 und in MeOD/D₂O) Die größten Relaxationsraten $R_{complex}$ wurden bei pH 9 beobachtet. Bei pH 6,5 und in MeOD waren die Relaxationsraten deutlich kleiner. Durch die $r^{\frac{1}{6}}$ -Abhängigkeit in der Solomon-Bloembergen-Gleichung sorgt dies jedoch nur für eine kleine Variation der intermolekularen Abstände.

Die effektive Korrelationszeit der Komplexe wurde bestimmt zu: $\tau_c = (1,11 \pm 0,46) \cdot 10^{-10}$ s für pH 6,5, $\tau_c = (1,09 \pm 0,60) \cdot 10^{-10}$ s für pH 9 und $\tau_c = (1,5 \pm 1,1) \cdot 10^{-11}$ s für MeOD.

Bei pH 9 sind die berechneten intermolekularen Abstände zwischen 0,45 und 0,72 nm, bei pH 6,5 zwischen 0,56 und 0,89 nm und in MeOD zwischen 0,56 und 0,95 nm.

Abb. 3.36 zeigt eine Überlagerung der sieben Strukturen mit niedrigster Gesamtenergie. In den wässrigen Lösungen ist das Quinolin-Ringsystem von CQ nahezu parallel zur Oberfläche von FPIX ausgerichtet. Abstand und Winkel zwischen beiden Ebenen betragen 0,36 nm und 25° (pH 6,5) bzw. 0,32 nm und 5° (pH 9). Dabei befindet sich CQ nicht direkt über dem zentralen Eisenion in FPIX, sondern ist zu dessen Rand hin verschoben. Es konnten keine kovalenten Bindungen oder Wasserstoffbrücken beobachtet werden. Trotzdem rotiert der FPIX μ -oxo Dimer nur in scheinbar festen Schritten von 90° um die Fe-O-Fe-Achse. Dies lässt eine Wechselwirkung mit der Seitenkette von CQ unwahrscheinlich erscheinen. Der offensichtlichste Unterschied zwischen beiden Komplexen ist die Orientierung der Seitenkette von CQ. Während sie bei pH 6,5 vom Zentrum weg zeigt, verläuft sie bei pH 9 entlang des Randes von FPIX. In MeOD ist die gesamte Komplexstruktur weniger gut definiert und gibt damit ein Anzeichen für eine schwächere Wechselwirkung. Das Quinolin-Ringsystem von CQ ist 0,43 nm von FPIX entfernt und um ca. 40° verkippt.

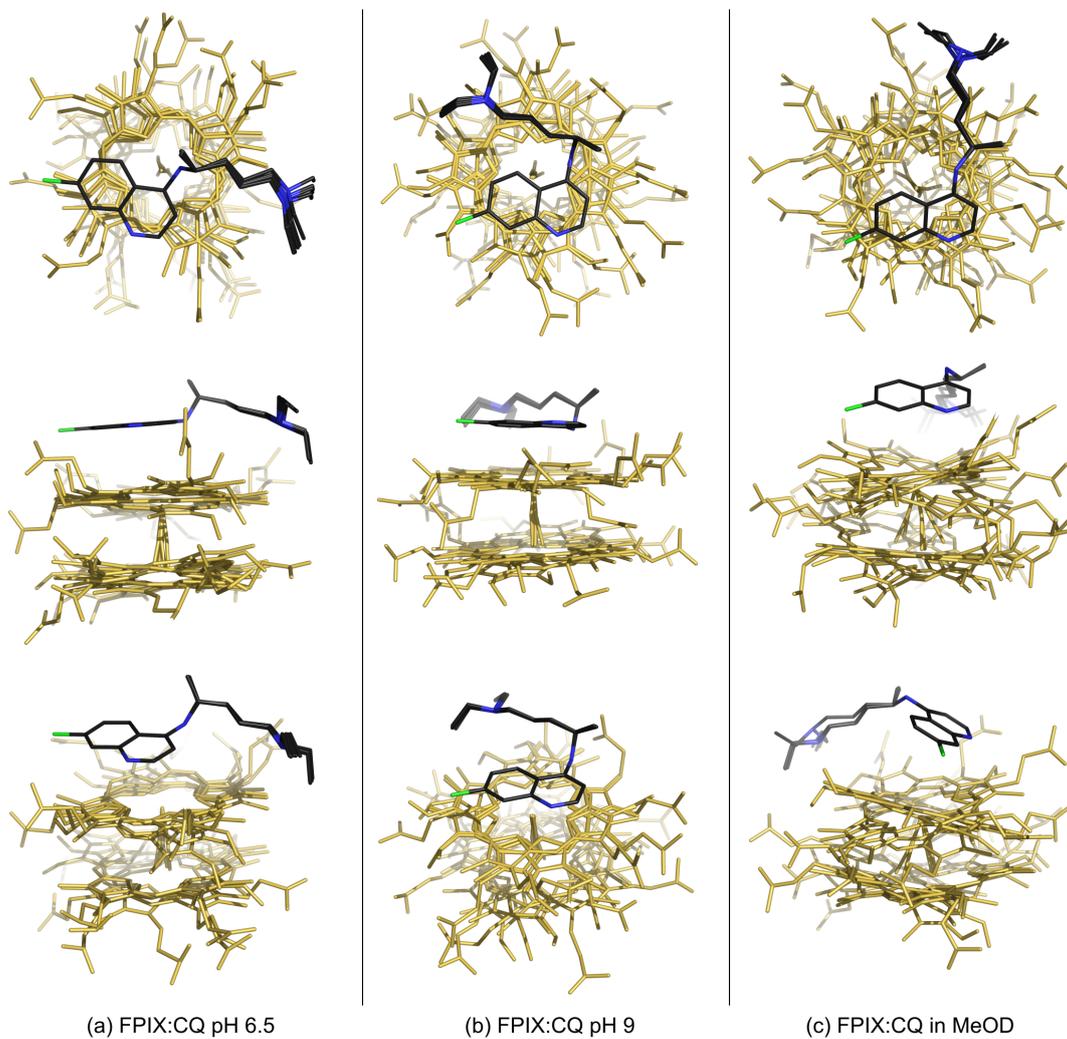


Abbildung 3.36: 3D Modelle von FPIX:CQ pH 6.5 (a), pH 9 (b) und in MeOD/D₂O (c). CQ (schwarz) lagert sich über dem FPIX μ -oxo-Dimer (gelb) an.

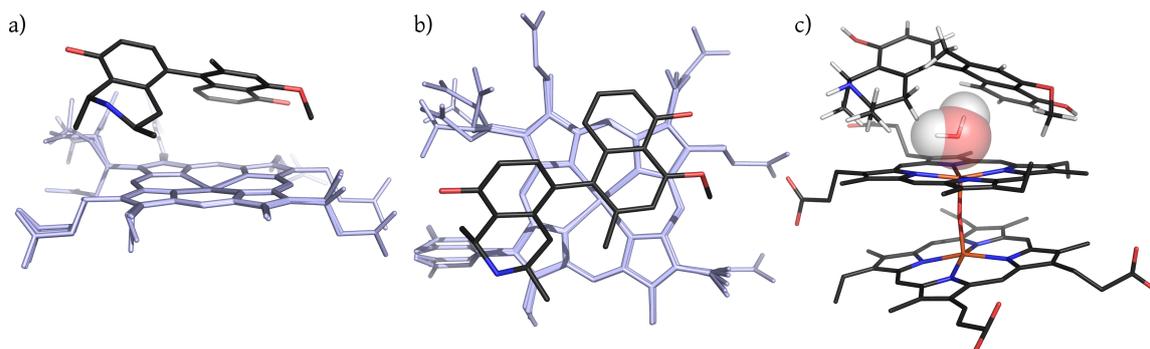


Abbildung 3.37: 3D Modelle des FPIX-DioC-Komplexes. (a) und (b) zeigen die Struktur des Komplexes ohne eingeschlossenes H₂O, (c) mit H₂O. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in (a) und (b) die untere Hälfte des FPIX- μ -oxo-Dimers ausgeblendet.

C,C-gekoppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloide

Dioncophylline C Die berechneten Strukturen von DioC im Komplex mit dem FPIX- μ -oxo-Dimer sind in Abb. 3.37 dargestellt. DioC ordnet sich über dem zentralen Eisenion in FPIX an, zeigt aber keine direkte Wechselwirkung damit. Auch eine elektrostatische Anziehung des positiv geladenen Stickstoffs in DioC und der negativ geladenen Propionsäuregruppen der FPIX-Seitenketten ist unwahrscheinlich, da diese keine bevorzugte Orientierung bei der Anlagerung von DioC zeigen.

Die nichtkovalente Stabilisierung des FPIX-DioC-Komplexes wird wahrscheinlich durch π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Elektronensysteme in beiden Molekülen hervorgerufen. Dies erklärt auch die zur Kante von FPIX verschobene Anordnung des DioC Naphthylrests. Dort ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der π -Elektronen größer und damit auch die zu erwartende Anziehungskraft. Die Abstände von DioC zur FPIX-Oberfläche liegen zwischen 0,31 nm (C5' im Naphthylrest von DioC) und 0,5 nm (C2'). Diese Kombination von Abstand und Winkel (siehe unten) stimmt sehr gut mit theoretischen Vorhersagen zur anziehenden Wechselwirkung von π -Elektronensystemen überein [71]. Ähnliche Orientierungen aromatischer Reste wurden auch bei Wirkstoffen aus der Familie der Quinoline beobachtet [57, 72]. Molekülteile, welche π - π -Wechselwirkungen ausbilden, sind immer in Richtung der Kante von FPIX verschoben und um einen Winkel von 20° bis 40° geneigt. Auch der Isoquinolinrest von DioC kann über π - π -Wechselwirkungen an FPIX binden, allerdings wird die Anziehungskraft durch den größeren Abstand von 0,57 nm (C6) deutlich geringer ausfallen als im Naphthylrest von DioC.

Sowohl der Naphthyl- als auch der Isoquinolinrest sind gegenüber der FPIX-Oberfläche verkippt. Die eingeschlossenen Winkel sind 25° (Naphthylrest) und 38° (Isoquinolinrest). Diese Konformation schafft einen Hohlraum zwischen den beiden Molekülen, der groß genug ist, um ein Wassermolekül aufzunehmen.

Um zu untersuchen, ob Wasser einen Einfluss auf die Komplexbildung hat, wurde eine weitere MD-Simulation durchgeführt, welche ein zusätzliches H₂O-Molekül (koordiniert

Atom	exp. [nm]	MD [nm]	MD + H ₂ O [nm]
1	0,47	0,58	0,57
2	0,48	0,57	0,57
3	0,49	0,51	0,51
4	-	0,59	0,59
8	0,45	0,51	0,52
9	-	0,47	0,47
11	0,53	0,59	0,62
13	0,56	0,64	0,65
14	0,50	0,55	0,57

Tabelle 3.5: Experimentell ermittelte Abstände im FPIX-DioC-Komplex und Abstände in den berechneten Modellen des Komplexes mit und ohne H₂O.

an das Eisenion in FPIX) enthielt. Zusätzlich wurden die Relaxationsraten von FPIX:DioC in 30% Methanol gemessen.

In der MD-Simulation mit Wasser findet praktisch keine Änderung der Struktur des FPIX-DioC-Komplexes statt. Die Abstände in den berechneten Modellen vergrößern sich um weniger als 1% (Methylgruppen 5%, siehe Tabelle 3.5). Das explizite Einbinden eines Wassermoleküls in die Simulation von FPIX-Komplexen ist bis heute in der Literatur einzigartig. Allerdings zeigte sich keine direkte Erklärung für eine komplexstabilisierende Wirkung von Wasser. Weder Wasserstoffbrückenbindungen noch elektrostatische Anziehungskräfte konnten im FPIX-H₂O-DioC-Komplex beobachtet werden. Diese Situation änderte sich aber für die N,C-gekoppelten NIQs, welche später beschrieben werden (Abschnitt 3.2.4.4). Dennoch könnte das Wassermolekül für eine sterische Stabilisierung der Konformation von DioC sorgen, indem die Rotation um die CC-Bindung zwischen Naphthyl- und Quinolinrest eingeschränkt wird. Damit könnten anziehende π - π -Wechselwirkungen im Komplex maximiert werden.

Mit Methanol als Lösungsmittel zeigt DioC keine Wechselwirkung mit FPIX. Unabhängig von den Konzentrationsverhältnissen bleiben die Relaxationsraten im Wirkstoffmolekül praktisch konstant (siehe Anhang A.4.1.3). Dies beweist, dass keine Anlagerung stattfindet. Auch FPIX mit DiopA bzw. DioA wurden in Methanol untersucht und zeigten ebenfalls keine Wechselwirkung. Offensichtlich ist Wasser ein wichtiger Bestandteil für die Bindung der NIQs an FPIX.

N,C-gekoppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloide

FM103, KH20 und TGMP59 Die Komplexstrukturen der N,C-NIQs weisen große Ähnlichkeit untereinander auf. In allen drei Wirkstoffen ist der Isoquinolinrest in Richtung der Kante von FPIX verschoben und leicht verkippt, um die Wechselwirkung der dort lokalisierten π -Elektronen zu maximieren. Eine analoge Anordnung konnte auch schon für den

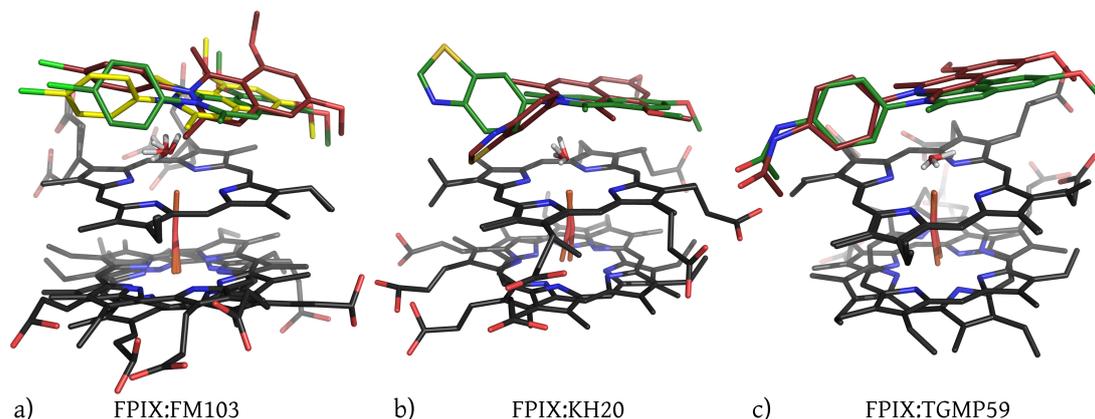


Abbildung 3.38: Berechnete Modelle der N,C-NIQs im Komplex mit FPIX bei pH 6,5 (grün), pH 6,0 (gelb) und pH 5,6 (rot).

Naphthylrest von DioC beobachtet werden. Auch in den N,C-NIQs ist eine Wechselwirkung mit den Seitenketten von FPIX nicht feststellbar.

Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass es erstmals möglich war die Wirkstoffe bei einem pH-Wert von 5,6 zu untersuchen. Dieser pH-Wert herrscht auch *in-vivo* in der Verdauungsvakuole des Malariaparasiten. Die Resultate zeigen, dass der pH-Wert keinen zu großen Einfluss auf die Struktur der Komplexe ausübt. Für Wirkstoffe, welche in basischem Milieu untersucht werden mussten, bedeutet dies, dass ihre Komplexstruktur sehr wahrscheinlich auch in der sauren Umgebung der Verdauungsvakuole erhalten bleibt.

Die N,C-NIQs zeigen eine weitere Besonderheit gegenüber den anderen Wirkstoffen. Der positiv geladene Stickstoff im Isoquinolinrest ist in der Lage eine Wasserstoffbrücke zum Wassermolekül, welches wiederum an das Eisenion in FPIX gebunden ist, aufzubauen. Die Moleküldynamiksimulationen aller drei N,C-NIQs zeigen die Bildung einer solchen Wasserstoffbrücke. Damit wurde ein möglicher zusätzlicher Mechanismus zur Komplexstabilisierung identifiziert, neben der in der Literatur bereits bekannten π - π -Wechselwirkung.

3.2.5 Vergleich und Diskussion

In keinem der durchgeführten Experimente gab es Hinweise auf die Existenz eines 2:2-Komplexes zwischen FPIX und Wirkstoff. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung eines Wirkstoffmoleküls an einer Seite des FPIX μ -oxo-Dimers eine Asymmetrie im Komplex induziert, welche die Bindung eines zweiten Wirkstoffmoleküls verhindert. Die kurzzeitige Entstehung von Zwischenprodukten mit einer Lebensdauer unterhalb der durch NMR auflösbaren Zeitskala kann natürlich nicht ausgeschlossen werden.

Der hier reproduzierbar festgestellte mittlere Spin-Zustand von $S = \frac{3}{2}$ ist in der Literatur bisher einzigartig. Andere Untersuchungen zeigen einen Spin-Zustand von $S = \frac{1}{2}$ mit einer effektiven Zahl freier Elektronen von $n_{eff} \approx 1,2$ für freies FPIX (pH 6.5) [57]. Dieser Wert

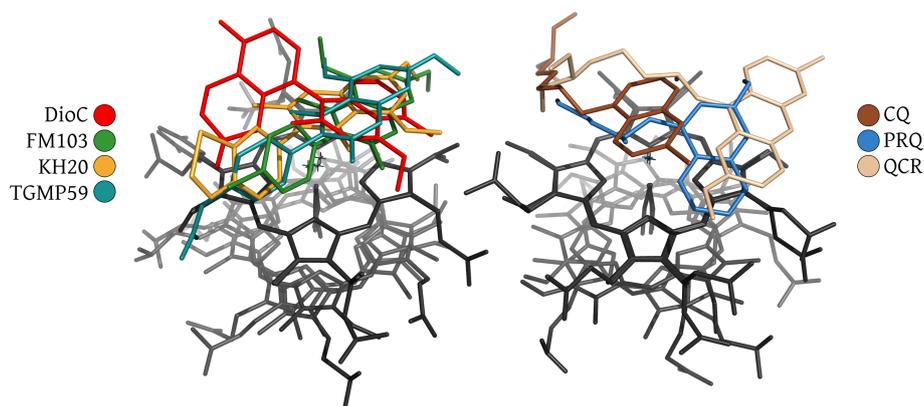


Abbildung 3.39: Überlagerung der berechneten FPIX-Wirkstoff-Komplexe bei physiologischem pH (außer DioC pH 11).

stimmt sehr gut mit den hier nach Wirkstoffzugabe gemessenen $n_{eff} \approx 1,0$ (pH 9) und $n_{eff} \approx 1,4$ (pH 6,5) überein. Der Unterschied könnte durch pH-abhängige Selbstassoziation von CQ hervorgerufen sein [73].

Überlagerung der Strukturen

Vergleicht man die Art der Positionierung der Wirkstoffe in den berechneten Komplexen, so fällt auf, dass sich die aromatischen Ringsysteme eines jeden Wirkstoffs (meist der Isoquinolinrest) nie zentral über dem Eisenzentrum von FPIX anlagern (siehe Abb. 3.39). Vielmehr sind sie stets in Richtung der Kante von FPIX verschoben und um einen Winkel geneigt, der umso größer wird, je weiter die Wirkstoffe von FPIX entfernt sind. Dieses Verhalten ist konsistent mit theoretischen Vorhersagen über den optimalen Abstand und Winkel für attraktive π - π -Wechselwirkungen von Molekülen [71]. In den Komplexstrukturen spielt außerdem die Ausdehnung der aromatischen Anteile im Wirkstoff eine Rolle. So lagern sich bei den N,C-NIQs die Isochinolinreste oberhalb der Kante von FPIX an, bei DioC hingegen der Naphthylrest, da der Isochinolinteil in DioC nicht vollständig aromatisch ist.

„Sandwich-Komplexe“

Die relative Stöchiometrie von 2:1 zwischen FPIX und Wirkstoff erlaubt zwei denkbare Konfigurationen der Komplexe. Entweder lagert sich ein Wirkstoffmolekül an einem FPIX μ -oxo-Dimer an, oder der Wirkstoff wird von zwei FPIX Monomeren umlagert („Sandwich-Komplex“) [74]. Um keine der Möglichkeiten unberücksichtigt zu lassen, wurde für den FPIX-DioC-Komplex eine Moleküldynamiksimulation von DioC im Komplex mit zwei FPIX Monomeren durchgeführt.

Es wurden 300 Strukturen berechnet. In den Simulationen wurden die durch NMR experimentell ermittelten Abstände zu beiden Eisenzentren der FPIX Monomere definiert (*ambiguous distance restraints* gemittelt über die R-6 Funktion [75] in XPLOR).

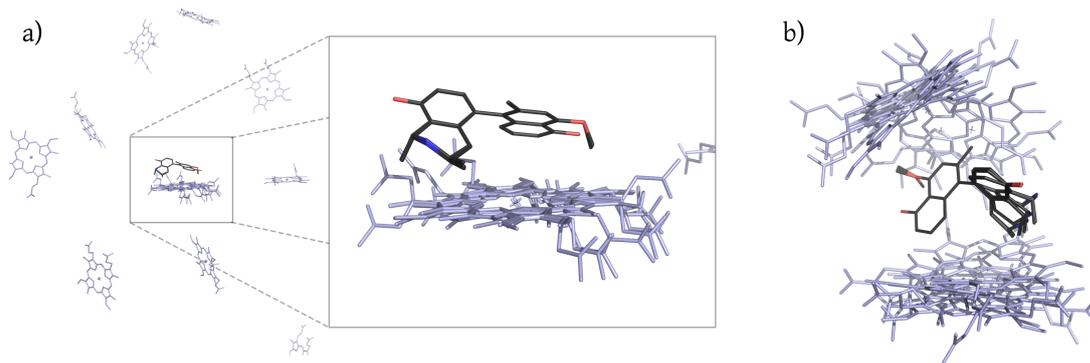


Abbildung 3.40: Strukturen der hypothetischen „Sandwich-Komplexe“ von FPIX:DioC. a) DioC (schwarz) im Komplex mit einem FPIX Monomer (blau), der zweite Monomer befindet sich in großem Abstand. b) Zwei FPIX Monomere umlagern DioC.

Von den 300 berechneten Strukturen zeigten 63 eine Anordnung, die dem „Sandwich-Komplex“ entspricht (siehe Abb 3.40). Drei Gründe machen es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass diese Konfiguration in der Natur wirklich Bestand hat.

1. Die Position des oberen FPIX Monomers ist nicht gut definiert und weist auf eine sehr schwache Wechselwirkung mit DioC hin.
2. Die Abstände zwischen FPIX und DioC sind zu groß ($> 0,7$ nm), als dass stabilisierende Wechselwirkungen zwischen den Molekülen entstehen könnten.
3. Die Bildung eines Komplexes mit drei Komponenten muss in zwei Schritten erfolgen. Der lineare Anstieg der NMR-Relaxationsraten bei der Komplexbildung spricht hingegen klar eine Komplexbildung in nur einem Schritt.

Weitere 76 Strukturen zeigten eine Konformation, in der DioC dicht an einem FPIX Monomer gebunden ist und der zweite Monomer sich in großer Entfernung befindet (siehe Abb. 3.40). Auch diese Anordnung widerspricht der Bildung eines „Sandwich-Komplexes“. Die Anlagerung von DioC oberhalb eines FPIX Monomers ist dagegen fast identisch mit der berechneten Struktur aus DioC und einem FPIX μ -oxo-Dimer.

Zusammenhang zwischen Wirksamkeit und Komplexstruktur

Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen bestimmten Merkmalen der berechneten Komplexstrukturen und ihrer Wirksamkeit konnte bisher nicht identifiziert werden. Betrachtet man jedoch den mittleren intermolekularen Abstand der Wirkstoffe zu FPIX, so ist eine Korrelation mit dem IC_{50} -Wert erkennbar (siehe Tabelle 3.6 und Abb. 3.41). Insbesondere bei physiologischem pH-Wert in der Messlösung stimmt die Reihenfolge der Wirkstoffe sortiert nach ihrem mittleren Abstand fast genau mit der Reihenfolge der IC_{50} -Werte überein. Allgemein gesprochen ist die Wirksamkeit einer Substanz umso höher, je enger die Bindung an FPIX erfolgt.

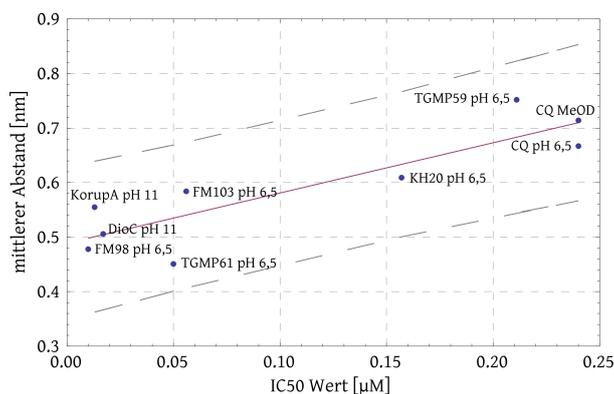


Abbildung 3.41: Grafische Darstellung von Tabelle 3.6. Aufgetragen ist der mittlere Abstand jedes Wirkstoffs bei möglichst physiologischem pH-Wert über den IC_{50} -Wert.

Die rote Linie entspricht einem linearen Fit durch die Datenpunkte (Kenndaten der Regression an die Funktion $y = ax + c$: $a = 0,922 \pm 0,186$, $c = 0,489 \pm 0,027$) Die gestrichelten Linien geben das Konfidenzintervall von 95% an.

Wirkstoff	pH	IC_{50} [μ M]	mittlerer Abstand [nm]	SD [nm]
TGMP61	pH 6,5	0,050	0,451	0,041
PRQ	pH 6,5		0,452	0,021
FM98	pH 6,5	0,010	0,478	0,054
DioC	pH 11	0,017	0,506	0,034
CQ	pH 9	0,240	0,555	0,098
KorupA	pH 11	0,013	0,555	0,066
FM103	pH 6,0	0,056	0,569	0,257
MeBl	pH 6,5	n/a	0,580	0,077
FM103	pH 6,5	0,056	0,584	0,283
DiopA	pH 11		0,589	0,055
KH20	pH 5,6	0,157	0,602	0,303
KH20	pH 6,5	0,157	0,609	0,246
TGMP59	pH 5,6	0,211	0,623	0,234
CQ	pH 6,5	0,240	0,667	0,119
QCR	pH 2,4		0,685	0,230
FM103	pH 5,6	0,056	0,713	0,301
CQ	MeOD	0,240	0,714	0,125
TGMP59	pH 6,5	0,211	0,752	0,412

Tabelle 3.6: Übersicht der untersuchten Wirkstoffe sortiert nach dem mittleren intermolekularen Abstand. Eine Korrelation mit dem jeweiligen IC_{50} -Wert der Wirkstoffe [63, 64] ist deutlich zu erkennen.

Potenzieller Wirkmechanismus

Die treibenden Kräfte hinter der Komplextstehung sind π - π -Wechselwirkung, hydrophobe Abstoßung und Ligandenfeldaufspaltung. Da der FPIX μ -oxo-Dimer eine Vorstufe im Abbau des toxischen Hämin durch den Parasiten ist, könnte der FPIX-Tetramer-Komplex eine mögliche Erklärung für die Wirkungsweise der Wirkstoffe gegen Malaria sein. Die Bindung zweier FPIX-Moleküle über zwei Eisen-Carboxy-Koordinationsstellen ist identisch mit der Einheitszelle von β -Hämatin, der *in-vivo* kristallinen Form von FPIX. Der FPIX-Tetramer ist damit möglicherweise ein wichtiger Zwischenschritt hin zum Hämozoin-Kristall. Durch die nichtkovalente Assoziation von Wirkstoffmolekülen an beiden Seiten des Tetramers könnte das weitere Kristallwachstum blockiert werden [76]. Eine ausreichend hohe Konzentration der Wirkstoffe konnte in der Verdauungsvakuole des Parasiten nachgewiesen werden [77]. Das nun in Lösung verbleibende freie FPIX verursacht starken oxidativen Stress und führt schließlich zur Zerstörung der Zellmembranen des Parasiten.

3.2.6 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde eine Methode zur Aufklärung der Molekülstruktur neuartiger Wirkstoffe gegen Malaria im Komplex mit ihrem paramagnetischen Zielmolekül etabliert und weiterentwickelt. Die Vorgehensweise leitet intermolekulare Distanzinformationen aus der sog. paramagnetischen Relaxation ab, einem Effekt, der den Einsatz klassischer Methoden zur Molekülstrukturaufklärung mittels NMR verhindert. Es werden drei Parameter durch NMR-Spektroskopie bestimmt: 1. die longitudinale Relaxationszeit der Wasserstoffatome in Wirkstoffmolekül, 2. die effektive Korrelationszeit des Komplexes und 3. der Spin-Zustand des Eisenions im Zielmolekül.

Mit Hilfe dieser Messmethode konnte die Komplexstruktur mehrerer bekannter Medikamente gegen Malaria aufgeklärt werden. Weiterhin wurden zwei neue Klassen von Wirkstoffen untersucht, die *C,C-gekoppelten Naphthylisoquinolin-Alkaloide* und die *N,C-gekoppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloide*. In Übereinstimmung mit theoretischen Vorhersagen aus der Literatur lagern sich die Wirkstoffe stets um einen Winkel geneigt und in Richtung des Randes des Zielmoleküls verschoben an. Diese Konfiguration maximiert die attraktiven π - π -Wechselwirkungen zwischen den Molekülen.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse aus NMR, UV-Spektroskopie und Massenspektrometrie konnte die Existenz eines bisher nicht bekannten Tetramer-Komplexes nachgewiesen werden, welcher eine wichtige Zwischenstufe in der Biokristallisation von Hämozoïn durch die Malariaparasiten darstellen könnte, und Ansatzpunkte für den weiterhin nicht vollständig bekannten Wirkmechanismus der meisten Antimalaria-Wirkstoffe liefert.

Für die Naphthylisoquinolin-Alkaloide zeigte sich weiterhin, dass Wasser eine essenzielle Rolle in der Komplexbildung spielt. In Moleküldynamiksimulationen der N,C-gekoppelten Naphthylisoquinolin-Alkaloide konnte die Entstehung einer Wasserstoffbrücke zwischen Wirkstoff und Zielmolekül gezeigt werden, welche einen zusätzlichen Weg der Komplexstabilisierung neben den bereits bekannten π - π -Wechselwirkungen aufzeigt. Die N,C-NIQs konnten erstmals auch bei einem pH-Wert von 5,6 beobachtet werden, einer chemischen Umgebung wie sie auch *in-vivo* in der Verdauungsvakuole des Malariaparasiten herrscht.

Kapitel 4

Summary

Even in the 21st century, infectious diseases remain the predominant cause of death worldwide. According to reports of the World Health Organisation, 2 million people die of Malaria every year, most of which are children under the age of five years. Respiratory infections claim an additional 3.9 million lives. Other infections are held responsible for a total of more than 10 million deaths. Global climate change leads to the occurrence of tropical infections well beyond their former endemic regions. Additional challenges arise due to the growing number of resistant organisms, rendering most known treatments ineffective.

To achieve sustained success in the fight against infectious diseases, a detailed understanding on the mode of action of newly developed substances on a molecular level is essential. In this thesis, magnetic resonance spectroscopy is used as a tool for molecular structure determination. My results may offer incentives for the development of new agents against infectious diseases and their continuous optimization.

4.1 The MIP-collagen IV complex

The scope of this project was to investigate the interaction between the PPIase enzyme MIP and the NC1 (non-collagenous 1) domain of collagen IV. The MIP (macrophage infectivity potentiator) protein is the major virulence factor of *Legionella pneumophila*, a bacterium causing severe lung infections in humans. MIP exhibits high affinity towards a short peptide sequence in collagen IV ("P290"). Amongst others, this type of collagen is found in the epithelial cells of the lung.

In this work, the interface of interaction between P290 and MIP was mapped using a paramagnetic spin label in combination with nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. Labeled P290 strongly enhances the relaxation rates of individual amino acids in MIP, which are in the immediate vicinity (within 1 nm) of the spin label. The enhanced

relaxation rates were detected through T_2 -sensitive HSQC experiments. Subsequently, results were incorporated in docking and molecular dynamic (MD) simulations to compute a model of the MIP-collagen IV complex.

Results show the MIP dimer “grabbing” collagen IV with both enzymatic domains and pulling the molecules closer together. We suggest that this molecular adhesion mechanism may play a key role in the invasion of host tissue by *L. pneumophila*. A possible destabilization of collagen IV through the enzymatic activity of MIP, as suggested previously by other groups, was not observed.

Additionally, our co-operation partners were able to demonstrate that P290, as an individual peptide, inhibits the biological PPIase activity of MIP, while leaving human homologue enzymes untouched. My findings from NMR measurements and subsequent MD simulations showed that P290 occupies the MIP binding pocket via the amino acid sequence -CYS130-PRO131---TRP134-. This sequence element is stabilized via the attachment of the terminal residues of P290 to the surface of MIP, thereby enabling P290 to distinguish between MIP and human enzymes.

Based on these results, we constructed optimized versions of P290 by ring closure and replacement of two amino acids. Our co-operation partners showed that the resulting structures exhibit improved binding properties on a peptide microarray and may provide the basis for a new class of inhibitors targeting *Legionella pneumophila*.

4.2 Structure elucidation of paramagnetic complexes formed by novel antimalarial agents

We used paramagnetic NMR spectroscopy to characterize the formation of complexes of several antimalarial compounds with their presumed target “heme”. A paramagnetic Fe(III) ion is located at the center of heme, which influences the longitudinal relaxation rates of nearby proton spins. This effect interferes with common strategies for NMR structure elucidation, but in this study was taken advantage of in a newly developed method to map intermolecular distances with high precision using NMR inversion recovery experiments at 9.4 T, 14.1 T, 17.6 T, and 18.8 T.

This method was utilized to solve the molecular structure of known drugs against Malaria as well as two new classes of antimalarial agents (the *C,C*-coupled naphthylisoquinoline alkaloids and the *N,C*-coupled naphthylisoquinoline alkaloids) in complex with their target molecule: heme. In accordance with theoretical predictions from the literature, we showed that the drug molecules align in a configuration maximizing attractive π - π stacking interactions between the molecules.

In combination with findings from NMR, UV spectroscopy and mass spectrometry, we demonstrated the formation of a previously unknown tetrameric complex. This complex may represent an important step in the mode of action of antimalarial drugs.

Additionally, results from NMR measurements and molecular dynamics simulations provided insight into the important role of H₂O for complex stabilization. We were able to demonstrate the formation of a so far undescribed hydrogen bond between drug and target. Furthermore, it was possible to investigate the N,C-coupled naphthylisoquinoline alkaloids at pH 5.6, which exactly matches the chemical environment in the food vacuole of the malarial parasite *in-vivo*. All these findings may contribute to a deeper understanding of the mode of action of new antimalarial agents.

Literaturverzeichnis

- [1] BERG, Jeremy M.; TYMOCZKO, John L. ; STRYER, Lubert: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2003
- [2] TAYLOR, W. R.: The classification of amino acid conservation. In: *J Theor Biol* 119 (1986), Mar, Nr. 2, S. 205–218
- [3] RAMSEY, Norman F: Early History of Magnetic Resonance. In: *Phys. perspect.* 1 (1999), S. 123–135
- [4] EVANS, Jeremy N. S.: *Biomolecular NMR Spectroscopy*. Oxford University Press, 1995
- [5] CAVANAGH, John; FAIRBROTHER, Wayne J.; ARTHUR G. PALMER, III; RANCE, Mark ; SKELTON, Nicholas J.: *Protein NMR Spectroscopy*. second edition. Elsevier Academic Press, 2007
- [6] BERTINI, Ivano; LUCHINAT, Claudio ; PARIGI, Giacomo: *Solution NMR of Paramagnetic Molecules*. Elsevier, 2001
- [7] KEELER, James: *Understanding NMR Spectroscopy*. <http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/>. Version: 2004
- [8] BLOCH, Felix: Nuclear Induction. In: *Physics Review* 70 (1946), S. 460–473
- [9] SOLOMON, I.: Relaxation Processes in a System of Two Spins. In: *Physical Review* 99 (1955), July, Nr. 2, S. 559–565
- [10] BERTINI, Ivano; LUCHINAT, Claudio: *NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*. The Benjamin/Cummings Publisher Company, Inc., 1986
- [11] NEUHAUS, David; WILLIAMSON, Michael P.: *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. Wiley-VCH, 2000
- [12] LEVITT, Malcolm H.: *spin dynamics - Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley, 2002
- [13] JEENER, J.; MEIER, B. H.; BACHMANN, P. ; ERNST, R. R.: Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. In: *J. Chem. Phys.* 71 (1979), S. 4546–4553. <http://dx.doi.org/10.1063/1.438208>. – DOI 10.1063/1.438208
- [14] ATKINS, Peter; FRIEDMAN, Ronald: *Molecular Quantum Mechanics*. Fourth Edition. Oxford University Press, 2007
- [15] CARLIN, Richard L.: Paramagnetic Susceptibilities. In: *Journal of Chemical Education* 43 (1966), S. 521–525
- [16] SHRIVER, D. E.; ATKINS, P. W.: *Inorganic Chemistry*. 3rd Edition. Oxford University Press, 2001. – 227–236 S.
- [17] ANFINSEN, Christian B.: Principles that Govern the Folding of Protein Chains. In: *Science* 181 (1973), S. 223–230

- [18] METROPOLIS, N.; ROSENBLUTH, A.; ROSENBLUTH, M.; TELLER, A. ; TELLER, E.: Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. In: *J. Chem. Phys* 21 (1953), Nr. 6, S. 1087–1092
- [19] GRAY, Perry; HART, William; PAINTON, Laura; PHILLIPS, Cindy; TRAHAN, Mike ; WAGNER, John: *A Survey of Global Optimization Methods - Simulated Annealing*. <http://www.cs.sandia.gov/opt/survey/sa.html>. Version: 1997. – Sandia National Laboratories, Albuquerque, NM
- [20] DOMINGUEZ, Cyril; BOELEN, Rolf ; BONVIN, Alexandre M J J.: HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. In: *J Am Chem Soc* 125 (2003), Feb, Nr. 7, 1731–1737. <http://dx.doi.org/10.1021/ja026939x>. – DOI 10.1021/ja026939x
- [21] FIELDS, Barry S.; BENSON, Robert F. ; BESSER, Richard E.: Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. In: *Clin Microbiol Rev* 15 (2002), Jul, Nr. 3, S. 506–526
- [22] BARTRAM, Jamie (Hrsg.); CHARTIER, Yves (Hrsg.); LEE, John V. (Hrsg.); POND, Kathy (Hrsg.) ; SURMAN-LEE, Susanne (Hrsg.): *Legionella and the prevention of legionellosis*. World Health Organization, 2007. – ISBN 92 4 156297 8
- [23] RIBOLDI-TUNNICLIFFE, A.; KÖNIG, B.; JESSEN, S.; WEISS, M. S.; RAHFELD, J.; HACKER, J.; FISCHER, G. ; HILGENFELD, R.: Crystal structure of Mip, a prolylisomerase from Legionella pneumophila. In: *Nat Struct Biol* 8 (2001), Sep, Nr. 9, 779–783. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb0901-779>. – DOI 10.1038/nsb0901-779
- [24] HORSTMANN, Martin; KAMPHAUSEN, Thilo; SCHWEIMER, Kristian; STEINERT, Michael; HACKER, Jörg; HAASE, Axel; RÖSCH, Paul; SCHWEIMER, Gunter ; FABER, Cornelius: 1H, 13C, 15N backbone and sidechain resonance assignment of Mip(77-213) the PPIase domain of the Legionella pneumophila Mip protein. In: *J Biomol NMR* 31 (2005), Jan, Nr. 1, 77–78. <http://dx.doi.org/10.1007/s10858-004-6041-6>. – DOI 10.1007/s10858-004-6041-6
- [25] HORSTMANN, Martin; EHSSES, Philipp; SCHWEIMER, Kristian; STEINERT, Michael; KAMPHAUSEN, Thilo; FISCHER, Gunter; HACKER, Jörg; RÖSCH, Paul ; FABER, Cornelius: Domain motions of the Mip protein from Legionella pneumophila. In: *Biochemistry* 45 (2006), Oct, Nr. 40, 12303–12311. <http://dx.doi.org/10.1021/bi060818i>. – DOI 10.1021/bi060818i
- [26] CEYMAN, Andreas; HORSTMANN, Martin; EHSSES, Philipp; SCHWEIMER, Kristian; PASCHKE, Anne-Katrin; STEINERT, Michael ; FABER, Cornelius: Solution structure of the Legionella pneumophila Mip-rapamycin complex. In: *BMC Struct Biol* 8 (2008), 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6807-8-17>. – DOI 10.1186/1472-6807-8-17
- [27] HU, Kaifeng; GALIUS, Veniamin ; PERVUSHIN, Konstantin: Structural plasticity of peptidyl-prolyl isomerase sFkpA is a key to its chaperone function as revealed by solution NMR. In: *Biochemistry* 45 (2006), Oct, Nr. 39, 11983–11991. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0607913>. – DOI 10.1021/bi0607913
- [28] WAGNER, Carina; KHAN, Abdul S.; KAMPHAUSEN, Thilo; SCHMAUSSER, Bernd; ÜNAL, Can; LORENZ, Udo; FISCHER, Gunter; HACKER, Jörg ; STEINERT, Michael: Collagen binding protein Mip enables Legionella pneumophila to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. In: *Cell Microbiol* 9 (2007), Feb, Nr. 2, 450–462. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00802.x>. – DOI 10.1111/j.1462-5822.2006.00802.x
- [29] ÜNAL, Can, Universität Würzburg, Diss., 2009
- [30] *Wikipedia*. <http://de.wikipedia.org/>

- [31] THIELE, Alexandra: *persönliche Mitteilung*, Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle), Diplomarbeit, 2009
- [32] IWAHARA, Junji; SCHWIETERS, Charles D. ; CLORE, G. M.: Ensemble approach for NMR structure refinement against (1)H paramagnetic relaxation enhancement data arising from a flexible paramagnetic group attached to a macromolecule. In: *J Am Chem Soc* 126 (2004), May, Nr. 18, 5879–5896. <http://dx.doi.org/10.1021/ja031580d>. – DOI 10.1021/ja031580d
- [33] CLORE, G. M.; TANG, Chun ; IWAHARA, Junji: Elucidating transient macromolecular interactions using paramagnetic relaxation enhancement. In: *Curr Opin Struct Biol* 17 (2007), Oct, Nr. 5, 603–616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2007.08.013>. – DOI 10.1016/j.sbi.2007.08.013
- [34] IWAHARA, Junji; TANG, Chun ; CLORE, G. M.: Practical aspects of (1)H transverse paramagnetic relaxation enhancement measurements on macromolecules. In: *J Magn Reson* 184 (2007), Feb, Nr. 2, 185–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2006.10.003>. – DOI 10.1016/j.jmr.2006.10.003
- [35] VRIES, Sjoerd J.; DIJK, Aalt D J.; KRZEMINSKI, MickaÅł; DIJK, Mark van; THUREAU, Aurelien; HSU, Victor; WASSENAAR, Tsjerk ; BONVIN, Alexandre M J J.: HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. In: *Proteins* 69 (2007), Dec, Nr. 4, 726–733. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.21723>. – DOI 10.1002/prot.21723
- [36] KÖHLER, Rolf; FANGHÄNEL, Jörg; KÖNIG, Bettina; LÜNEBERG, Edeltraud; FROSCH, Matthias; RAHFELD, Jens-Ulrich; HILGENFELD, Rolf; FISCHER, Gunter; HACKER, Jörg ; STEINERT, Michael: Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. In: *Infect Immun* 71 (2003), Aug, Nr. 8, S. 4389–4397
- [37] THAN, Manuel E.; HENRICH, Stefan; HUBER, Robert; RIES, Albert; MANN, Karlheinz; KÜHN, Klaus; TIMPL, Rupert; BOURENKOV, Gleb P; BARTUNIK, Hans D. ; BODE, Wolfram: The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), May, Nr. 10, 6607–6612. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.062183499>. – DOI 10.1073/pnas.062183499
- [38] SPOEL, David Van D.; LINDAHL, Erik; HESS, Berk; GROENHOF, Gerrit; MARK, Alan E. ; BERENDSEN, Herman J C.: GROMACS: fast, flexible, and free. In: *J Comput Chem* 26 (2005), Dec, Nr. 16, 1701–1718. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20291>. – DOI 10.1002/jcc.20291
- [39] HESS, Berk; KUTZNER, Carsten; SPOEL, David van d. ; LINDAHL, Erik: GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. In: *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008), S. 435–447
- [40] BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F. ; HERMANS, J.: *Interaction models for water in relation to protein hydration*. Dordrecht, The Netherlands : D. Reidel Publishing Co., 1981
- [41] SOARES, T. A.; DAURA, X.; OOSTENBRINK, C.; SMITH, L. J. ; GUNSTEREN, W. F.: Validation of the GROMOS force-field parameter set 45Alpha3 against nuclear magnetic resonance data of hen egg lysozyme. In: *J Biomol NMR* 30 (2004), Dec, Nr. 4, 407–422. <http://dx.doi.org/10.1007/s10858-004-5430-1>. – DOI 10.1007/s10858-004-5430-1
- [42] HUMPHREY, William; DALKE, Andrew ; SCHULTEN, Klaus: VMD – Visual Molecular Dynamics. In: *Journal of Molecular Graphics* 14 (1996), S. 33–38
- [43] FISCHER, G.; BANG, H.; LUDWIG, B.; MANN, K. ; HACKER, J.: Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPlase) activity. In: *Mol Microbiol* 6 (1992), May, Nr. 10, S. 1375–1383

- [44] REIMER, Ulf; REINEKE, Ulrich ; SCHNEIDER-MERGENER, Jens: Peptide arrays: from macro to micro. In: *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002), Aug, Nr. 4, S. 315–320
- [45] NAHTMAN, Tatjana; JERNBERG, Alexander; MAHDAVIFAR, Shahnaz; ZERWECK, Johannes; SCHUTKOWSKI, Mike; MAEURER, Markus ; REILLY, Marie: Validation of peptide epitope microarray experiments and extraction of quality data. In: *J Immunol Methods* 328 (2007), Dec, Nr. 1-2, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2007.07.015>. – DOI 10.1016/j.jim.2007.07.015
- [46] JANOWSKI, B.; WÄLLNER, S.; SCHUTKOWSKI, M. ; FISCHER, G.: A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates. In: *Anal Biochem* 252 (1997), Oct, Nr. 2, 299–307. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2330>. – DOI 10.1006/abio.1997.2330
- [47] SCHMIDT, B.; RAHFELD, J.; SCHIERHORN, A.; LUDWIG, B.; HACKER, J. ; FISCHER, G.: A homodimer represents an active species of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. In: *FEBS Lett* 352 (1994), Sep, Nr. 2, S. 185–190
- [48] HELBIG, J. H.; LÜCK, P. C.; STEINERT, M.; JACOBS, E. ; WITT, M.: Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. In: *Lett Appl Microbiol* 32 (2001), Feb, Nr. 2, S. 83–88
- [49] NCBI: *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [50] WINTERMEYER, E.; LUDWIG, B.; STEINERT, M.; SCHMIDT, B.; FISCHER, G. ; HACKER, J.: Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. In: *Infect Immun* 63 (1995), Dec, Nr. 12, S. 4576–4583
- [51] SNOW, Robert W.; GUERRA, Carlos A.; NOOR, Abdisalan M.; MYINT, Hla Y. ; HAY, Simon I.: The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. In: *Nature* 434 (2005), S. 214–217
- [52] BRINGMANN, Gerhard; FAIRLAMB, A. H. (Hrsg.); RIDLEY, R. G. (Hrsg.) ; VIAL, H. J. (Hrsg.): *Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues (Discoveries and drug development)*. World Health Organization, 2003
- [53] PAGOLA, S.; STEPHENS, P. W.; BOHLE, D. S.; KOSAR, A. D. ; MADSEN, S. K.: The structure of malaria pigment beta-haematin. In: *Nature* 404 (2000), Mar, Nr. 6775, 307–310. <http://dx.doi.org/10.1038/35005132>. – DOI 10.1038/35005132
- [54] EGAN, T. J.: Haemozoin Formation as a Target for the Rational Design of New Antimalarials. In: *Drug Design Reviews - Online* 1 (2004), S. 93–110
- [55] BULLER, Ronit; PETERSON, Matthew L.; ALMARSSON Örn ; LEISEROWITZ, Leslie: Quinoline Binding Site on Malaria Pigment Crystal: A Rational Pathway for Antimalaria Drug Design. In: *Crystal Growth and Design* 2 (2002), Nr. 6, S. 553–562
- [56] SCHWEDHELM, Kai F.: *Paramagnetische Relaxation in der NMR zur Aufklärung der Molekülstruktur von Antimalaria-Wirkstoffen*, Universität Würzburg, Diplomarbeit, 2005
- [57] LEED, Alison; DUBAY, Kateri; URSOS, Lyann M B.; SEARS, Devin; DIOS, Angel C D. ; ROEPE, Paul D.: Solution structures of antimalarial drug-heme complexes. In: *Biochemistry* 41 (2002), Aug, Nr. 32, S. 10245–10255
- [58] EVANS, D. F.: The Determination of the Paramagnetic Susceptibility of Substances in Solution by Nuclear Magnetic Resonance. In: *J. Chem. Soc.* (1959), S. 2003–2005
- [59] DEUTSCH, John L.; POLING, Stephen M.: The Determination of Paramagnetic Susceptibility by NMR. In: *Journal of Chemical Education* 46 (1969), S. 167 – 168

- [60] CRAWFORD, T. H.; SWANSON, J.: Temperature dependent magnetic measurements and structural equilibria in solution. In: *J Chem Educ* 48 (1971), S. 382–386
- [61] MACCARTHY, Patrick: Simplified Experimental Route for Obtaining Job's Curves. In: *Analytical Chemistry* 50 (1978), S. 2165–2165
- [62] HIROSE, Keiji: A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. In: *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 39 (2001), S. 193–209
- [63] FABER, Johan H.: *Naphthylisoquinoline Alkaloids: Structural Elucidation, Metabolism, and Functional Analysis of their Bioactivities*, Universität Würzburg, Diss., 2006
- [64] GULDER, Tanja: *Neuartige Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten: N,C-gekuppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloide*, Universität Würzburg, Diss., 2008
- [65] BRÜNGER, Axel T.: *X-PLOR Version 4.0 - A System for X-ray Crystallography and NMR*. 266 Whitney Avenue, P.O. Box 208114, New Haven, CT : The Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, 1996
- [66] KLEYWEGT, Gerard: *HIC-Up - Hetero-compound Information Centre - Uppsala*. <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>
- [67] CHENG, Lin; LEE, Jonghyuk; POWELL, Douglas R. ; RICHTER-ADDO, George B.: μ -Oxo-bis[(protoporphyrin IX dimethyl ester)-iron(III)]. In: *Acta Crystallographica Section E - Structure Reports Online* E60 (2004), S. m1340–m1342
- [68] DELANO, W. L.: *The PyMOL Molecular Graphics System*, 2002. <http://www.pymol.org>
- [69] SCHWEDHELM, Kai F.; HORSTMANN, Martin; FABER, Johan H.; REICHERT, Yana; BRINGMANN, Gerhard ; FABER, Cornelius: The Novel Antimalarial Compound Dioncophylline C Forms a Complex with Heme in Solution. In: *ChemMedChem* 2 (2007), Apr, Nr. 4, 541–548. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.200600263>. – DOI 10.1002/cmdc.200600263
- [70] SCHWEDHELM, Kai F.; HORSTMANN, Martin; FABER, Johan H.; REICHERT, Yana; BÜCHNER, Michael; BRINGMANN, Gerhard ; FABER, Cornelius: Spin State of Chloroquine-Heme Complexes: Formation of a Hemin Tetramer Adduct. In: *The Open Spectroscopy Journal* 1 (2008), S. 10–18
- [71] TSUZUKI, Seiji; HONDA, Kazumasa; UCHIMARU, Tadafumi; MIKAMI, Masuhiro ; TANABE, Kazutoshi: Origin of attraction and directionality of the pi/pi interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction. In: *J Am Chem Soc* 124 (2002), Jan, Nr. 1, S. 104–112
- [72] DIOS, Angel C.; CASABIANCA, Leah B.; KOSAR, Andrew ; ROEPE, Paul D.: Structure of the Amodiaquine–FPIX μ Oxo Dimer Solution Complex at Atomic Resolution. In: *Inorganic Chemistry* 43 (2004), S. 8078–8084
- [73] CASABIANCA, L. B.; DEDIOS, A. C.: C-13 NMR study of the selfassociation of chloroquine, amodiaquine, and quinine. In: *J Phys Chem A* 108 (2004), S. 8505–8513
- [74] CONSTANTINIDIS, I.; SATTERLEE, James D.: UV-Visible and Carbon NMR Studies of Quinine Binding to Urohemin I Chloride and Uroporphyrin I in Aqueous Solution. In: *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988), S. 927–932
- [75] NILGES, M.: Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. In: *J. Mol. Biol.* 245 (1995), S. 645–660

- [76] EGAN, Timothy J.; NCOKAZI, Kanyile K.: Quinoline antimalarials decrease the rate of beta-hematin formation. In: *J Inorg Biochem* 99 (2005), Jul, Nr. 7, 1532–1539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.04.013>. – DOI 10.1016/j.jinorgbio.2005.04.013
- [77] FOLEY, M.; TILLEY, L.: Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. In: *Pharmacol Ther* 79 (1998), Jul, Nr. 1, S. 55–87

Originalarbeiten

Konferenzbeiträge

K. Schwedhelm, M. Horstmann, J. H. Faber, Y. Reichert, G. Bringmann, A. Haase, C. Faber, NMR investigation of complex formation between antimalarial drugs, chloroquine and dioncophylline C, and their presumed target FPIX, Proc. Euromar/EENC, Veldhoven, The Netherlands, 2005.

K. Schwedhelm, R. Vicik, T Schirmeister, C. Faber, Characterization of Covalent Protease-Inhibitor-Complexes using High Field NMR Spectroscopy, Proc. 2nd Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB544 & SFB630, P14, Heidelberg, Germany, 2006.

K. Schwedhelm, T. Gulder, G. Bringmann, C. Faber, Structural Models of Antimalarial NIQ-Heme-Complexes as Determined by Paramagnetic NMR Spectroscopy, Proc. GDCh FGMR 29th Annual Discussion Meeting, Göttingen, Germany, 2007.

Periodika

Kai F. Schwedhelm, Martin Horstmann, Johan H. Faber, Yana Reichert, Gerhard Bringmann, Cornelius Faber, The Novel Antimalarial Compound Dioncophylline C Forms a Complex with Heme in Solution. ChemMedChem, 2007, 2, 541-548.

Kai F. Schwedhelm, Martin Horstmann, Johan H. Faber, Yana Reichert, Michael Büchner, Gerhard Bringmann, Cornelius Faber, Spin State of Chloroquine-Heme Complexes: Formation of a Hemin Tetramer Adduct. The Open Spectroscopy Journal, 2008, 1, 10-18.

Ünal, C*; **Schwedhelm, K***; Thiele, A; Frese, F; Weiwald, M; Gunther, F; Hacker, J; Faber, C; Steinert, M; Identification of a Mip binding sequence in Collagen IV and optimization towards a peptide inhibitor, *in Vorbereitung*.

Anhang A

Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

NMR Kernspinresonanz (*engl.* nuclear magnetic resonance)

EPR Elektronenspinresonanz (*engl.* electron paramagnetic resonance)

FID Freier Induktionszerfall (*engl.* free induction decay)

ppm Millionstel (*engl.* parts per million)

INEPT Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer

NOE Nuclear Overhauser Effect

NOESY Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

COSY COrelated Spectroscopy

HSQC Heteronuclear Single Quantum Correlation

MD Moleküldynamik

MIP Macrophage Infectivity Potentiator

MIP⁷⁷⁻²¹³ monomerische Deletionsmutante von MIP (Aminosäuren 77-213)

PPIase peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase

NC1-Domäne nicht-kollagenartige Domäne 1

P290 Peptid 290 (ein Peptid mit 13 Aminosäuren Länge)

MTSL (S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonylthioate

MWCO Molecular Weight Cut-Off

MS Massenspektrometrie

ESI-TOF ElectroSpray Ionization Time-Of-Flight Massenspektren

FKBP FK506 Binding Protein

PRE Relaxationszeitverkürzung (*engl.* Paramagnetic Relaxation Enhancement)

PDB Protein Data Bank

NIQ Naphthylisoquinolin-Alkaloid

A.2 Konstanten und Symbole

μ_0	Magnetische Feldkonstante	$4\pi \cdot 10^{-7}$	$\frac{N}{A^2}$
μ_b	Bohrsches Magneton	$9,2741 \cdot 10^{-24}$	$\frac{J}{T}$
\hbar	Planck-Konstante	$1,054571596 \cdot 10^{-34}$	$J \cdot s$
γ_I	gyromagnetisches Verhältnis des Protons	$26,7522128 \cdot 10^7$	$\frac{rad}{sT}$
γ_S	gyromagnetisches Verhältnis des Elektrons	$658 \cdot \gamma_S$	$\frac{rad}{sT}$
S	Spin-Zustand		
T	Relaxationszeit		s
R	Relaxationsrate	$R = \frac{1}{T}$	$\frac{1}{s}$
r	Abstand Fe-H		m
τ_C	(effektive) Korrelationszeit		s
ω_I	Lamor-Frequenz des Protons		$\frac{rad}{s}$
ω_S	Lamor-Frequenz des Elektrons	$658 \cdot \omega_I$	$\frac{rad}{s}$
B_0	externes Magnetfeld		T
k_B	Boltzmann-Konstante	$1,3806505 \cdot 10^{-23}$	$\frac{J}{K}$
k_D	Dissoziationskonstante		Molar
χ	magnetischen Suszeptibilität		
Γ_2	PRE-Faktor		$\frac{1}{s}$

A.3 Der MIP-Kollagen IV-Komplex

A.3.1 ^1H - ^{15}N -HSQC Pulssequenz (fhsqcN15_T2.ks)

```
# 1 "/opt/xwinnmr/exp/stan/nmr/lists/pp/fhsqcN15_T2.ks"
;fhsqcN15_T2.ks
;avance-version
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;phase sensitive using States-TPPI method
;with decoupling during acquisition
;S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O'Neil-Johnson & P.C.M. van Zijl,
; J. Magn. Reson. B 108, 94-98 (1995)

;with additional delay d9 during first INEPT for
;estimation of 1HN T2
;run experiment twice with different settings of d9
;first : d9=100u, second : d9=5.1m

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"d11=30m"
"d12=20u"

"d0=(in0-(p21*1.273+6u+4*p3))*0.5"

"DELTA=d19-p22/2"
"DELTA1=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p28*3-d19*5+p22/2-8u-p21-108u"

"TAU=d26-p16-d16-4u"
"TAU1=TAU+p21*4+6u"

"CEN_HN2=(p22*2+6u-p2)/2"
"CEN_HC2=(p4*2+6u-p2)/2"

; ; "l3=(td1/2)"

define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.500000*d1"
"MCREST = d1 - d1"

1 ze
  d11 p116:f3
2 MCWRK do:f3
LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCREST
  3m
3 d11
4 d12 p11:f1
  50u setnmr3|0 setnmr0|34|32|33
  (p1 ph0)
  4u
  p16:gp1
  d16
```

```

TAU1 p13:f3
d9
(p2 ph0)
d9
(p21 ph0 3u p22 ph1 3u p21 ph0):f3
4u
p16:gp1
d16 p12:f2
TAU
(p1 ph1)
4u
p16:gp2
d16
(p21 ph4):f3
d0
(CEN_HC2 p2 ph6) (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
d0
(p21 ph5):f3
4u
p16:gp2
d16
(p1 ph2)
DELTA1
p16:gp3
d16 p118:f1
p28*0.231 ph1
d19*2
p28*0.692 ph1
d19*2
p28*1.462 ph1
DELTA
(p22 ph0):f3
DELTA
p28*1.462 ph3
d19*2
p28*0.692 ph3
d19*2
p28*0.231 ph3
4u
p16:gp3
d16
4u setnmr3^0 setnmr0^34^32^33
DELTA2
(p21 ph0):f3
4u
100u p116:f3
4u
go=2 ph31 cpd3:f3
MCWRK do:f3 wr #0 if #0 zd ip4
lo to LBLSTS1 times 2
MCWRK id0
lo to LBLF1 times ST1CNT
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=0 2
ph5=0 0 0 0 2 2 2 2

```

```
ph6=0 0 2 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p11 : f1 channel - 1H PL for p1 (high pow)
;p118: f1 channel - 1H PL for p28 (3-9-19)
;p12 : f2 channel - 13C PL for p3 (high pow)
;p13 : f3 channel - 15N PL for p21 (high pow)
;p116: f3 channel - 15N PL for pcpd3 (decoup.)
;p1 : f1 channel - 90 deg high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 deg high power pulse
;p21 : f3 channel - 90 deg high power pulse
;p28 : f1 channel - 90 deg pulse (3-9-19)
;p16 : gradient pulse
;d16 : delay for gradient recovery
;pcpd3: f3 channel - 90 deg dec. pulse at p116
;cpdprg3: composite pulse dec. for ch.3 [garp]
;d26 : ca. 1/(2*J(N,HN)) [2.5m]
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d1 : relaxation delay
;NDO = 2
;NS = N*2
;DS >= 8
;phc0(F1) = 90 deg, phc1(F1) = -180 deg
```

A.3.2 Haddock

Liste der Aminosäure-IDs in MIP⁷⁷⁻²¹³, welche als *aktiv* für das Docking mit HADDOCK markiert wurden („PRE strong“):

K79, K80, A81, N84, S115, N117, S124, Y131, T132, D142, S143, E145, K146, T147, T152, Q154, Q157, V158, G161, W162, T163, E164, A165, S181, S189, V190, G191, G192, I194, L206

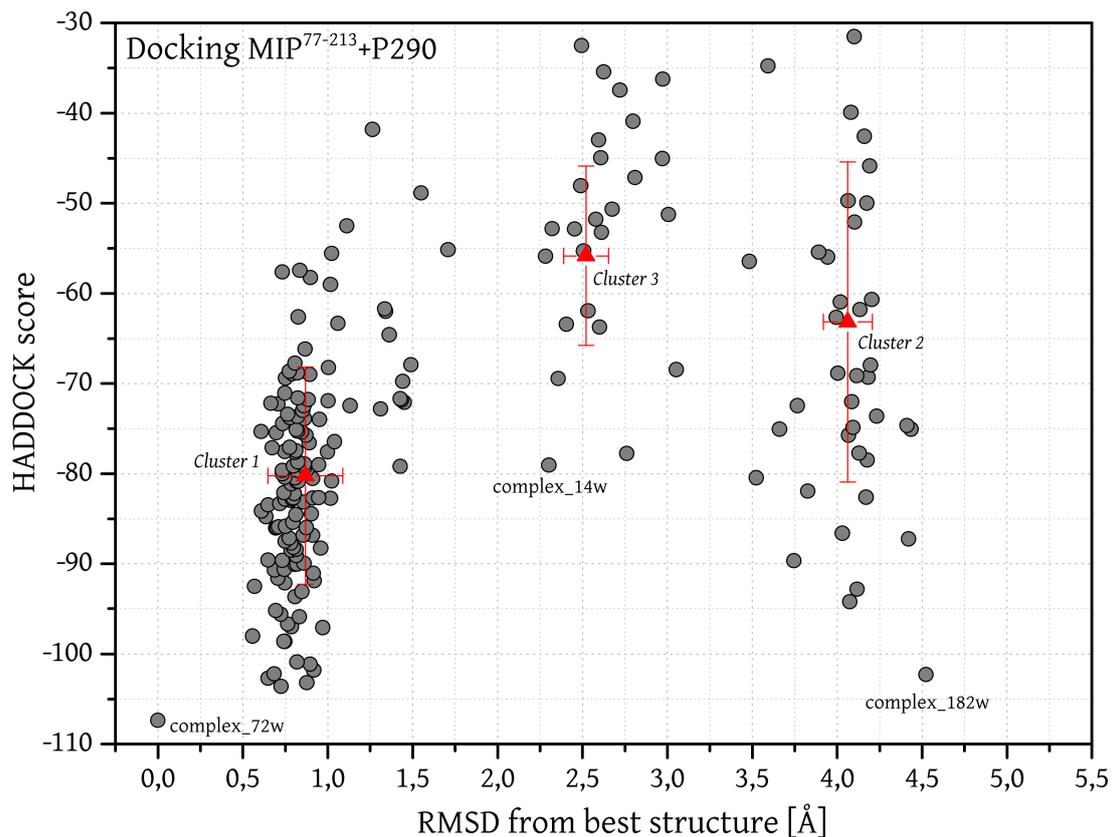


Abbildung A.1: Clustering der Docking-Strukturen des MIP⁷⁷⁻²¹³-P290 Komplexes durch Haddock. Jeder graue Kreis stellt eine Docking-Struktur da. *complex_72w* besitzt die niedrigste Gesamtenergie (niedrigsten Haddock score) und wurde für die weiteren Berechnungen verwendet.

2. Position Restraint Run, um die eingefügten Wassermoleküle ins thermische Gleichgewicht zu bringen - pr.mdp

```
title           = Col4
cpp             = /usr/bin/cpp
define         = -DPOSRES
constraints    = all-bonds
integrator     = md
dt             = 0.002      ; ps
nsteps        = 20000      ; total 40.0 ps
nstcomm       = 1
nstxout       = 250        ; output coordinates every 0.5 ps
nstvout       = 1000      ; output veolcity every 2.0 ps
nstfout       = 0
nstlog        = 10
nstenergy     = 10
nstlist       = 10
ns_type       = grid
coulombtype   = PME
rvdw          = 1.4
rlist         = 0.9       ; rlist == rcoulomb
rcoulomb      = 0.9
fourierspacing = 0.12
pme_order     = 4
ewald_rtol    = 1.0E-5
vdwtype       = cut-off
fourier_nx    = 0
fourier_ny    = 0
fourier_nz    = 0
optimize_fft  = yes
;table-extension = 8
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl        = berendsen
tau_t         = 0.1 0.1
tc_grps      = protein non-protein
ref_t         = 300 300
; Pressure coupling is on
Pcoupl        = berendsen
pcoupltype    = isotropic
tau_p         = 1; 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p         = 1.0
; Generate velocities is on at 300 K
gen_vel       = yes
gen_temp      = 300.0
gen_seed      = 173529
```

3. freie Moleküldynamiksimulation über einen wählbaren Zeitraum - md.mdp

```
title                = Col4 MD
cpp                  = /usr/bin/cpp
constraints          = all-bonds
integrator           = md
dt                   = 0.002      ; ps
nsteps              = 9000000     ; total 18000 ps
nstcomm             = 1
nstxout             = 500          ; output coordinates every 1.0 ps
nstvout             = 0            ; no output velocity
nstfout            = 0
nstlist            = 5
ns_type             = grid
coulombtype         = PME
rvdw                = 1.4
rlist               = 0.9
rcoulomb            = 0.9
fourierspacing      = 0.12
pme_order           = 4
ewald_rtol          = 1.0E-5
vdwtype             = cut-off
fourier_nx          = 0
fourier_ny          = 0
fourier_nz          = 0
optimize_fft        = yes
; Berendsen temperature coupling is on in four groups
Tcoupl              = berendsen
tau_t               = 0.1 0.1
tc_grps             = protein non-protein
ref_t               = 300 300
; Pressure coupling is on
Pcoupl              = berendsen
pcoupltype          = isotropic
tau_p               = 0.5
compressibility     = 4.5e-5
ref_p               = 1.0
; Generate velocities is on at 300 K
gen_vel             = yes
gen_temp            = 300.0
gen_seed            = 173529
```

A.3.5 Moleküldynamiksimulation des MIP-Dimer-Kollagen IV Komplexes

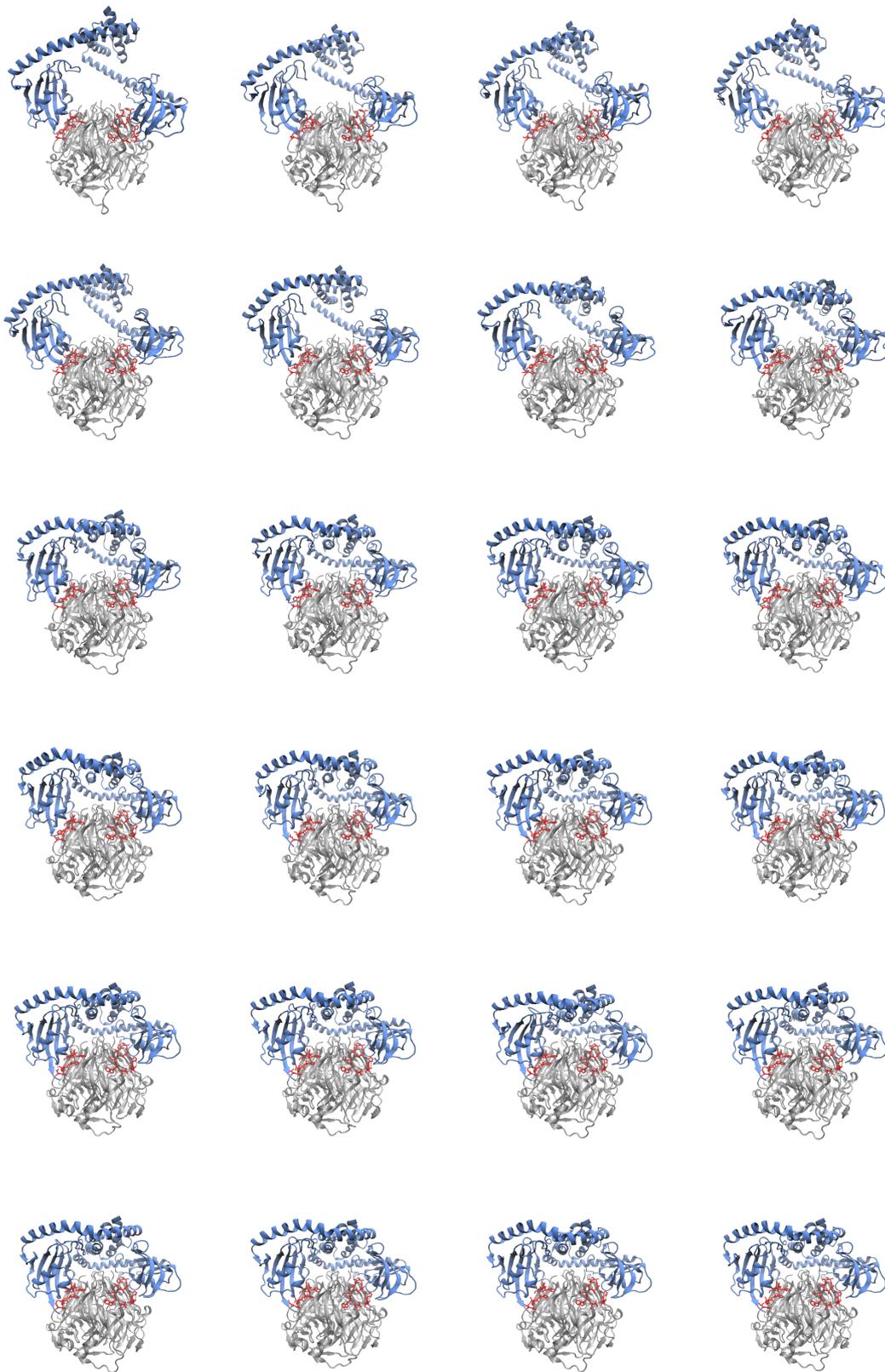


Abbildung A.3: Snapshots aus der Moleküldynamiksimulation des MIP-Dimer (blau) im Komplex mit der Kollagen IV NC1-Domäne (grau) im Abstand von 1,6 ns (von oben links nach unten rechts). Die P290-Sequenz in Kollagen IV ist als rotes Stabmodell dargestellt.

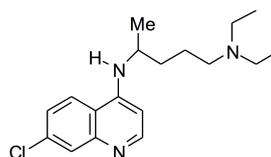
A.4 Strukturaufklärung paramagnetischer Komplexe

A.4.1 Datenblätter

A.4.1.1 Aminoquinolin-Derivate

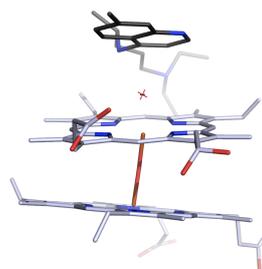
Chloroquin / CQ

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 1/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 1.11 \cdot 10^{-10}$ s



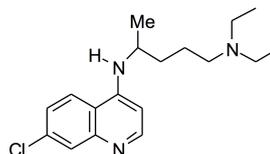
Intermolekulare Abstände [Å]:

1	5.79
2	5.89
3	5.66
4	5.75
5	5.79
6	6.07
7	8.37
8	7.41
9	7.01
10	8.88



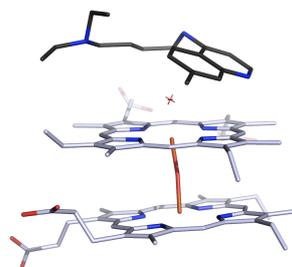
Chloroquin / CQ

Lösungsmittel: Wasser, pH 9
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 800 MHz
 Spin-Zustand: $S = 1/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 1.09 \cdot 10^{-10}$ s



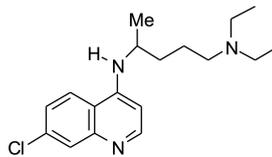
Intermolekulare Abstände [Å]:

1	4.81
2	4.59
3	4.66
4	4.74
5	5.13
6	6.83
7	6.11
8	5.88
9	7.16



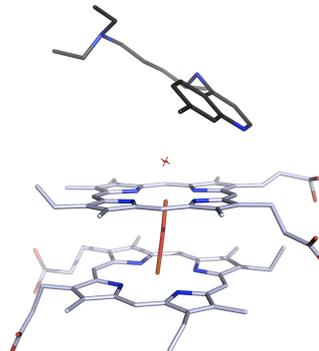
Chloroquin / CQ

Lösungsmittel: MeOD
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 800 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 1.53 \cdot 10^{-11}$ s



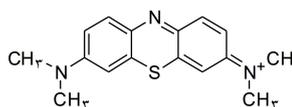
Intermolekulare Abstände [Å]:

1	6.50
2	5.89
3	5.62
4	7.03
5	6.18
6	6.40
7	8.45
8	7.98
9	7.80
10	9.45



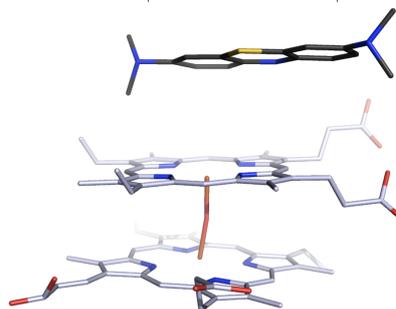
Methylenblau / MeBl

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
 NMR-Spektrometer: 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2 \cdot 10^{-12}$ s



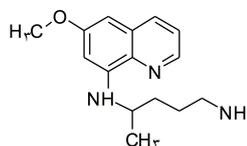
Intermolekulare Abstände [Å]:

1	6.77
2	5.07
3	5.29
4	6.05



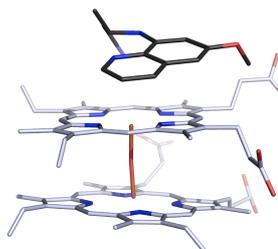
Primaquin / PRQ

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
 NMR-Spektrometer: 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2 \cdot 10^{-12}$ s



Intermolekulare Abstände [Å]:

1	4.32
2	4.28
3	4.26
4	4.74
5	4.39
6	4.62
7	4.61
8	4.74
9	4.73

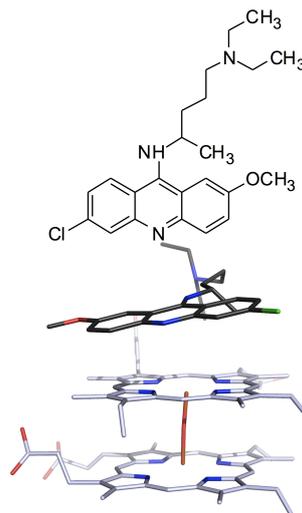


Quinacrin / QCR

Lösungsmittel: Wasser, pH 2,4
NMR-Spektrometer: 750 MHz
Spin-Zustand: $S = 5/2$
Korrelationszeit: $\tau_c = 2 \cdot 10^{-12}$ s

Intermolekulare Abstände [Å]:

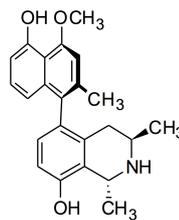
1	5.20
2	5.21
3	6.10
4	6.72
5	6.63
6	6.32
7	6.00
8	6.38
9	6.33
10	9.96
11	7.31



A.4.1.2 C,C-gekoppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloiden

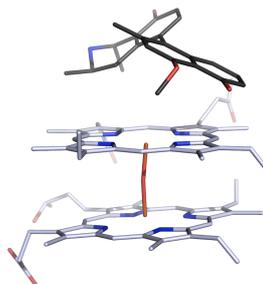
Dioncophyllin C / DioC

Lösungsmittel: Wasser, pH 11
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 5,88 \cdot 10^{-13}$ s



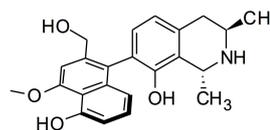
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 4.72
- 2 4.83
- 3 4.91
- 4 4.54
- 5 5.31
- 6 5.56
- 7 5.00



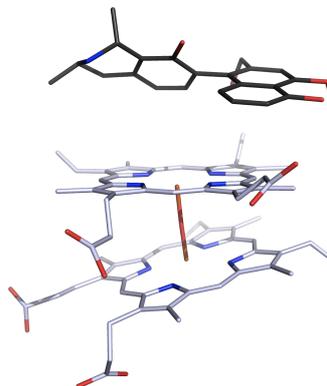
Dioncopeltin A / DiopA

Lösungsmittel: Wasser, pH 11
 NMR-Spektrometer: 400, 600 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 4,93 \cdot 10^{-13}$ s



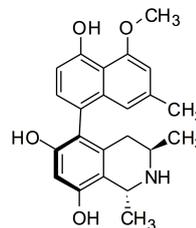
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 6.55
- 2 6.85
- 3 6.64
- 4 6.67
- 5 5.61
- 6 5.59
- 7 5.91
- 8 6.22
- 9 6.71
- 10 7.44
- 11 6.83
- 12 6.93
- 13 7.69



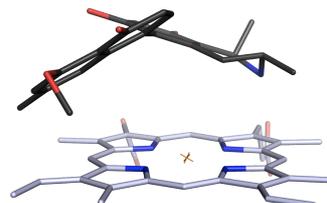
Korupensamin A / KorupA

Lösungsmittel: Wasser, pH 11
 NMR-Spektrometer: 400 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2 \cdot 10^{-12}$ s



Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.92
- 2 6.33
- 3 5.53
- 4 5.31
- 5 5.52
- 6 6.13
- 7 5.48
- 8 4.19



A.4.1.3 C,C-gekoppelte Naphthylisoquinolin-Alkaloiden in MeOD

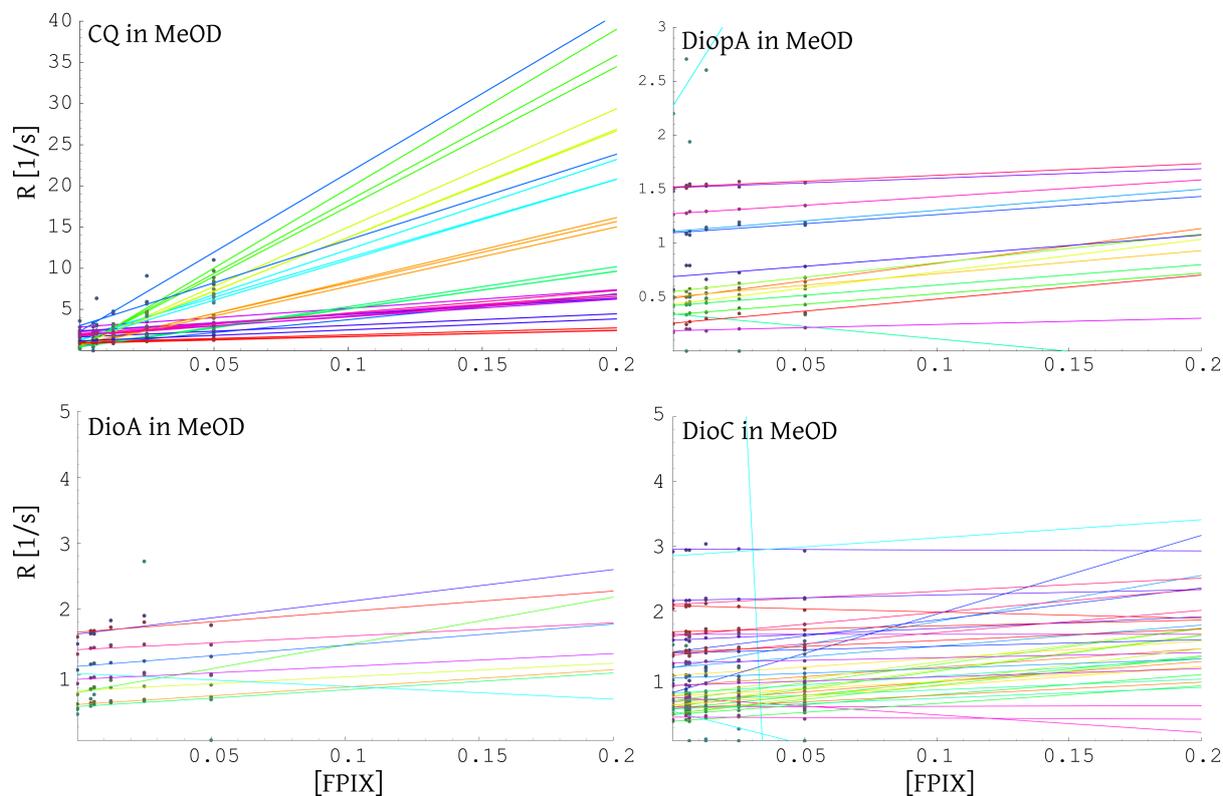
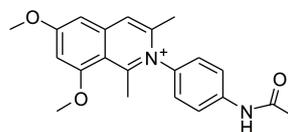


Abbildung A.4: Extrapolation der Relaxationsraten für drei NIQs (DioA, DiopA, DioC) in Methanol. Zum Vergleich ist CQ in Methanol dargestellt. Für NIQs in Methanol weisen die gemessenen Relaxationsraten praktisch keine Abhängigkeit von der FPIX-Konzentration in der Probe auf. Eine Wechselwirkung der NIQs mit FPIX in MeOD als Lösungsmittel ist damit unwahrscheinlich.

A.4.1.4 N,C-gekoppelten Arylisoquinolinen

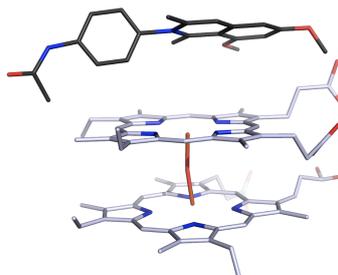
TGMP59 / GBAP104

Lösungsmittel: Wasser, pH 5,6
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2,98 \cdot 10^{-12}$ s



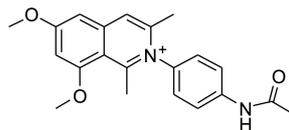
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.87
- 2 5.81
- 3 4.53
- 4 5.33
- 5 5.30
- 6 5.46
- 7 4.83
- 8 6.96



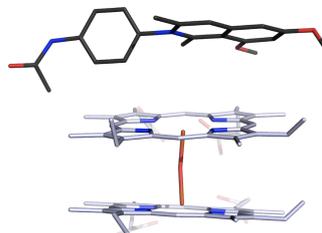
TGMP59 / GBAP104

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2,31 \cdot 10^{-12}$ s



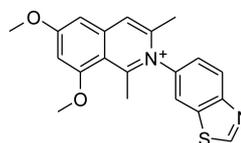
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.65
- 2 4.39
- 3 5.20
- 4 5.24
- 5 5.03
- 6 6.59



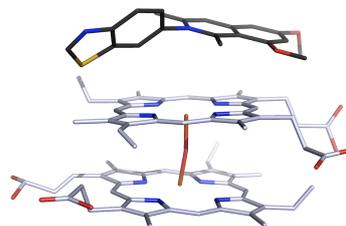
KH20 / GBAP187

Lösungsmittel: Wasser, pH 5,6
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2,40 \cdot 10^{-12}$ s



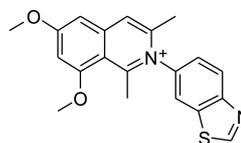
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 4.87
- 2 5.64
- 3 5.48
- 4 4.64
- 5 4.64
- 6 5.40
- 7 5.37
- 8 5.49
- 9 5.07
- 10 4.50



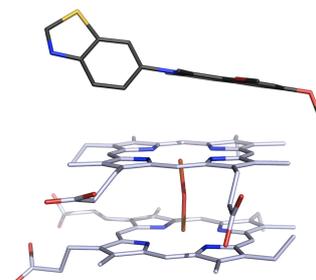
KH20 / GBAP187

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2,47 \cdot 10^{-12}$ s



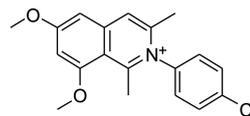
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.73
- 2 4.67
- 3 4.53
- 4 5.26
- 5 5.54
- 6 5.23
- 7 5.60



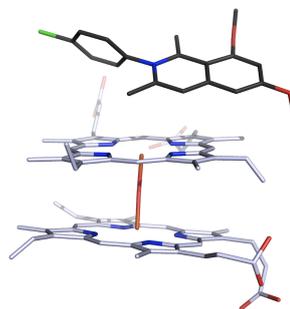
FM103 / GBAP99

Lösungsmittel: Wasser, pH 5,6
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 5,97 \cdot 10^{-12}$ s



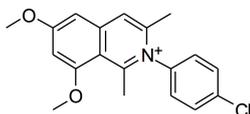
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.71
- 2 5.67
- 3 4.76
- 4 5.88
- 5 5.85
- 6 6.02
- 7 5.59
- 8 11.29



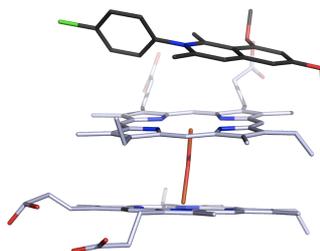
FM103 / GBAP99

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,0
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2,64 \cdot 10^{-12}$ s



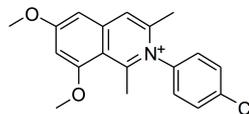
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.05
- 2 4.95
- 3 4.07
- 4 4.08
- 5 5.17
- 6 5.27
- 7 4.93
- 8 5.20



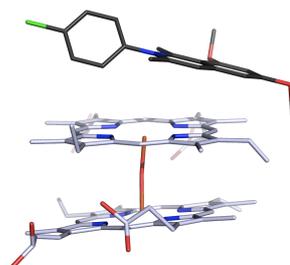
FM103 / GBAP99

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
 NMR-Spektrometer: 400, 600, 750 MHz
 Spin-Zustand: $S = 5/2$
 Korrelationszeit: $\tau_c = 2,31 \cdot 10^{-12}$ s



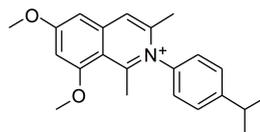
Intermolekulare Abstände [Å]:

- 1 5.01
- 2 4.94
- 3 5.07
- 4 5.38
- 5 5.18
- 6 5.15
- 7 4.40
- 8 4.12



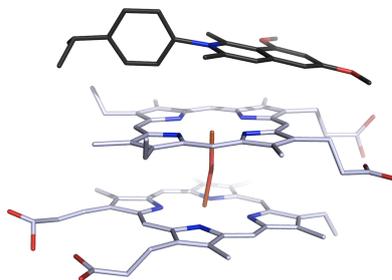
TGMP61

Lösungsmittel: Wasser, pH 6,5
NMR-Spektrometer: 400 MHz
Spin-Zustand: $S = 5/2$
Korrelationszeit: $\tau_c = 2 \cdot 10^{-12}$ s



Intermolekulare Abstände [Å]:

1	3.02
2	3.74
3	4.51
4	4.62
5	4.54
6	4.82
7	4.31
8	4.45
9	5.00



A.4.2 T₁ Inversion Recovery Pulssequenz (t1irw5)

```
# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/&t1irw5"
;@t1irw5
;avance-version (00/02/07)
;T1 measurement using inversion recovery
;water suppression using watergate W5 pulse sequence with gradients
;using double echo
;M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J.K. Nicholson & J.C. Lindon,
; J. Magn. Reson. 132, 125 - 129 (1998)
```

```
# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Avance.incl"
;Avance.incl
;version 00/07/27
;switch between high and low stage oh H amplifier
;use 2H channel for lock or pulse (lockswitch)
;allow for 2H decoupling (lockswitch)
;turn lock-hold on/off (BSMS)
;switch between 1H or 19F output (H amplifier)
;select output for 19F (amplifier)
;homospoil on/off (BSMS)
;for Q-switch probes
;for mixing probe
;gating pulse for RX22, ADC and HPPR
;not active
```

```
;$Id: Avance1.incl,v 1.1.2.5 2000/08/16 13:28:44 ber Exp $
```

```
# 11 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/&t1irw5"
```

```
# 1 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp//Grad.incl"
;Grad.incl - include file for Gradient Spectroscopy
;
;avance-version (00/07/27)
;gradient pulse for gs-syntax
;blank/unblank gradient amplifier and turn lock-hold on/off
;blank/unblank gradient amplifier
;for RCB board (BSMS)
```

```
define list<gradient> EA=<EA>
```

```
;$Id: Grad1.incl,v 1.1.2.6 2000/10/16 11:49:03 ber Exp $
```

```
# 12 "/u/exp/stan/nmr/lists/pp/&t1irw5"
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"d11=30m"
```

```
1 ze
2 d1
  p2 ph1
  vd
  p1 ph2
50u setnmr2|0 setnmr0|34|32|33
```

```
p16:gp1
d16 p118:f1
p27*0.087 ph3
d19*2
p27*0.206 ph3
d19*2
```

```

p27*0.413 ph3
d19*2
p27*0.778 ph3
d19*2
p27*1.491 ph3
d19*2
p27*1.491 ph4
d19*2
p27*0.778 ph4
d19*2
p27*0.413 ph4
d19*2
p27*0.206 ph4
d19*2
p27*0.087 ph4
50u
p16:gp1
d16

4u

p16:gp2
d16
p27*0.087 ph5
d19*2
p27*0.206 ph5
d19*2
p27*0.413 ph5
d19*2
p27*0.778 ph5
d19*2
p27*1.491 ph5
d19*2
p27*1.491 ph6
d19*2
p27*0.778 ph6
d19*2
p27*0.413 ph6
d19*2
p27*0.206 ph6
d19*2
p27*0.087 ph6
p16:gp2
d16

4u setnmr2^0 setnmr0^34^32^33
go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 ivd
lo to 1 times td1
exit

ph1=1 3
ph2=0 2
ph3=0 0 1 1 2 2 3 3
ph4=2 2 3 3 0 0 1 1
ph5=0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
    2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
ph6=2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3
    0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1
ph31=0 2 2 0 0 2 2 0 2 0 0 2 2 0 0 2

```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d17: delay for STE BigDelta
;d19: delay for binomial water suppression
; d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;vd : variable delay, taken from vd-list
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;td1: number of experiments = number of delays in vd-list

;define VDLIST

;this pulse program produces a ser-file (PARMOD = 2D)
;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 34 : 22

;for z-only gradients:
;gpz1: 34%
;gpz2: 22%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

;$Id: t1ir,v 1.8 2002/06/12 09:05:15 ber Exp $
```


C U R R I C U L U M V I T A E

Kai Schwedhelm



Angaben zur Person

Adresse	Rudolph-Glauber-Straße 56 97753 Karlstadt
eMail	kai@schwedhelm.info
Geburtsdatum	26. Januar 1980
Geburtsort	Würzburg

Ausbildung

05/2005 – 05/2009	Promotion mit Stipendium des Fonds der chemischen Industrie am Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5, Universität Würzburg
03/2005	Abschluss als Diplom-Ingenieur
10/2000 – 02/2005	Studium der Nanostrukturtechnik an der Universität Würzburg Vertiefungsfächer: • Biophysikalische Anwendungen • Nano- und Optoelektronik Thema der Diplomarbeit: <i>Paramagnetische Relaxation in der NMR zur Aufklärung der Molekülstruktur von neuartigen Antimalaria-Wirkstoffen</i>
09/1999 – 07/2000	Grundwehrdienst im Fernmelderegiment 220, Donauwörth
05/1999	Allgemeine Hochschulreife am Johann-Schöner-Gymnasium, Karlstadt

Sonstiges

04/1999 und 04/2000	Teilnahme am RYLA-Seminar (Rotary Youth Leadership Award)
2006 – 2008	e-fellows-net Stipendium für überdurchschnittliche Studienleistungen
Sprachen	Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Französisch (Grundkenntnisse)

Danksagung

Viele außergewöhnliche Menschen haben mir auf dem langen Weg bis zur Vollendung dieser Arbeit zur Seite gestanden. Jedem einzelnen gebührt mein aufrichtiger Dank!

Prof. Cornelius Faber ... dem Architekten der Themenstellung dieser Arbeit, der es immer verstanden hat, mich mit meinen Aufgaben wachsen zu lassen.

Prof. Peter Jakob ... an dessen Lehrstuhl ich dieses interessante Thema bearbeiten durfte.

Martin Horstmann ... von dem ich viele praktische Kniffe rund um die NMR lernen konnte.

Meinen Kooperationspartnern ...

aus dem NIQ-Projekt ... **Tanja Gulder, Johan Faber, Yana Reichert, Melanie Diegel** und **Prof. Gerhard Bringmann**.

aus dem MIP-Projekt ... **Can Ünal, Alexandra Thiele** (Halle) und **Prof. Michael Steinert**.

aus dem SAP-Projekt ... **Monika Herb, Radim Vicik** und **Prof. Tanja Schirmeister**.

Kristian Schweimer (Bayreuth)

Matthias Grüne, Michael Büchner

Fonds der chemischen Industrie

Ein besonderes Dankeschön gebührt außerdem ...

meinen tapferen Bürokollegen **Volker Behr** und **Olga Tymofiyeva** ... die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Nicht zu vergessen die Hilfe bei zahllosen Computerpannen und Rettungsmissionen am, um und im Spektrometer.

Sabine Voll ... für die Organisation aller sozialen Ereignisse am Lehrstuhl und den schier unerschöpflichen Vorrat an guter Laune, der jeden Tag durch die Gänge hallt.

meinen Praktikanten **Mirjam Falge** und **Thomas Payne**.

ganz **EP5** ... für eine unvergessliche Zeit.

meinen Nano-Kollegen der ersten Stunde ... **Daniela Spanheimer**, **Stefan Lang**, **Christoph Friederich** und **Michael Grieb**.

allen fleissigen Korrekturlesern ... **Edda Rieß**, **Sabine Voll**, **Thomas Kampf**, **Melanie Diegel** und **Kerstin Pannek**.

meiner Familie ... **Ilona**, **Lea** und **Ivo Schwedhelm**.

Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung gemäß §5 Absatz 2 Ziffern 2 und 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Physik und Astronomie der Universität Würzburg vom 22. September 2003.

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation hat weder in gleicher noch anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsfach vorgelegen.

Am 31. März 2005 wurde mir von der Universität Würzburg der akademische Grad „Diplom-Ingenieur (Univ.)“ in Nanostrukturtechnik verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, den 27. Mai 2009

Kai Schwedhelm

