

**Molekulardynamische Untersuchungen  
zur Charakterisierung von Flexibilität,  
Bindemechanismen und  
Bindungsaffinitäten von Aldose  
Reduktase und Nukleären Rezeptoren**

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

vorgelegt von

**Monika Nocker**

aus Niederdorf

Südtirol 2012



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am \_\_\_\_\_

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am \_\_\_\_\_



Qui proficit in artibus  
et deficit in moribus,  
plus deficit,  
quam proficit.

*Unbekannt*



Meiner Mutter,

meinem Bruder

und

-unvergessen-

meiner lieben Oma.



# Vorwort

Die in dieser Arbeit vorgestellten Studien wurden im Zeitraum von Oktober 2007 bis Januar 2011 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung von *Herrn Prof. Dr. Christoph A. Sotriffer* durchgeführt, dem ich zu Dank verpflichtet bin. Sein Ideenreichtum hat maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Er hat es mir auch ermöglicht, während meiner Promotionszeit zweimal zu einem Forschungsaufenthalt nach Italien aufzubrechen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei *Prof. Pietro Cozzini* bedanken, in dessen Arbeitskreis im „Laboratorio di Modellistica Molecolare, Università degli Studi di Parma“ ich von September bis Oktober 2009 zu Gast war. Dort lernte ich diverse Fragestellungen zu Nukleären Rezeptoren kennen, die ich während meines Forschungsaufenthalts am CINECA in Bologna im Rahmen eines HPC Europa2-Projektes vertiefen konnte.

An dieser Stelle möchte ich nun allen Mitgliedern meines Würzburger Arbeitskreises danken. Sie alle aufzuzählen, würde den Rahmen dieser Arbeit noch völlig sprengen. Trotzdem wünsche ich mir und vor allem ihnen, dass sich ihr Lesen meiner Arbeit nicht nur auf dieses Vorwort beschränken möge!

Auch für die Assistenten des ersten Semesters gilt Ähnliches. Danke!

Zum guten Schluss danke ich noch allen, die sich erhofft hätten, namentlich erwähnt zu werden.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Grundlagen und Methoden</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Einführung und Problemstellung</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Proteinflexibilität und Affinitätsvorhersage im Wirkstoffdesign</b>	<b>4</b>
2.1	Proteinflexibilität . . . . .	4
2.2	Affinitäten . . . . .	6
2.3	Bedeutung im Wirkstoffdesign . . . . .	7
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>12</b>
3.1	Molekulardynamik-Simulationen . . . . .	12
3.1.1	„Klassische“ Molekulardynamik-Simulationen - MD . . . . .	15
3.1.2	Gesteuerte Molekulardynamik-Simulationen („Steered Molekulardynamik-Simulationen“, SMD) . . . . .	19
3.2	Thermodynamische Integration - TI . . . . .	21
3.2.1	Berechnung relativer freier Bindungsenthalpien . . . . .	24
3.2.2	Methode der thermodynamischen Integration . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Modellsysteme</b>	<b>28</b>
4.1	Aldose Reduktase . . . . .	28
4.1.1	Aldo-Keto-Reduktasen Superfamilie . . . . .	28
4.1.2	Struktur der Aldose Reduktase - Flexibilität der Bindetasche . . . . .	29
4.1.3	Kinetik und Mechanismus der Aldose Reduktase . . . . .	35
4.1.4	Physiologische Bedeutung der Aldose Reduktase . . . . .	38
4.1.4.1	Sorbitol-Stoffwechselweg und metabolische Auswirkungen	40
4.1.5	Inhibitoren der Aldose Reduktase . . . . .	45
4.1.5.1	Carbonsäurederivate . . . . .	45
4.1.5.2	Zyklische Imide . . . . .	46
4.1.5.3	Phenolische Verbindungen . . . . .	47
4.1.5.4	Bemerkungen . . . . .	48
4.2	Nukleäre Rezeptoren . . . . .	53
4.2.1	Mechanismus und inhärente Flexibilität der NRs . . . . .	55
4.2.2	Androgenrezeptor . . . . .	59
4.2.3	Estrogenrezeptor . . . . .	60

<b>II</b>	<b>Untersuchungen, Auswertungen und Ergebnisse</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>Proteinflexibilität und unerwartete Bindemodi: MD-Simulationen zur ALR2</b>	<b>63</b>
5.1	Vorstellung der Systeme und Fragestellung . . . . .	63
5.2	Methodisches . . . . .	64
5.3	MD-Simulationen der ITA-Komplexstruktur . . . . .	66
5.3.1	MD-Simulation der ALR2-ITA-Komplexstruktur . . . . .	66
5.3.2	MD-Simulation der ALR2-ITA-freien-Komplexstruktur . . . . .	71
5.3.3	Diskussion . . . . .	75
5.4	MD-Simulationen der ITB-Komplexstruktur . . . . .	77
5.4.1	Modellierung von Trp 219 . . . . .	78
5.4.2	MD-Simulationen der ALR2-ITB-Komplexstruktur . . . . .	80
5.4.2.1	Variante A . . . . .	80
5.4.2.2	Variante B . . . . .	85
5.4.2.3	Variante C . . . . .	89
5.4.2.4	Diskussion . . . . .	94
5.4.3	Untersuchung der Molekülstruktur des Liganden ITB . . . . .	96
5.4.3.1	Quantenmechanische Berechnung der H-Brückenstärke zwischen Trp 20 und ITB . . . . .	96
5.4.3.2	MD-Simulationen der ITB-Komplexstruktur mit veränderten Parametern . . . . .	101
5.4.4	MD-Simulationen der ALR2-ITB-freien-Komplexstruktur . . . . .	109
5.4.4.1	Variante A . . . . .	109
5.4.4.2	Variante B . . . . .	113
5.4.4.3	Variante C . . . . .	118
5.4.4.4	Diskussion . . . . .	123
5.4.5	Clustering der drei Varianten der ITB-freien Komplexsimulationen . . . . .	124
5.5	Zusammenfassende Bemerkungen . . . . .	128
<b>6</b>	<b>SMD-Simulationen: Übergang der Holo- in die Apo-Form der Aldose Reduktase</b>	<b>138</b>
6.1	Vorgehensweise . . . . .	139
6.1.1	Suche eines idealen Pfades . . . . .	141
6.1.2	Abhängigkeit der Kraftprofile von Parametern $\vec{v}$ und $k$ . . . . .	143
6.2	Pfad A . . . . .	144
6.3	Pfad B . . . . .	149
6.4	Pfad C . . . . .	154
6.5	Pfad D . . . . .	158
6.5.1	MD-Simulation nach Pfad D . . . . .	160
6.6	Diskussion . . . . .	163
<b>7</b>	<b>SMD-Simulationen am Androgen- und Estrogenrezeptor</b>	<b>172</b>
7.1	Androgenrezeptor . . . . .	173

7.1.1	Methode . . . . .	173
7.1.2	Resultate . . . . .	176
7.1.2.1	Pfad B . . . . .	183
7.1.2.2	Pfad E . . . . .	186
7.2	Estrogenrezeptor . . . . .	188
7.2.1	Methode . . . . .	188
7.2.2	Resultate . . . . .	190
7.2.2.1	Pfad A . . . . .	194
7.2.2.2	Pfad B . . . . .	197
7.3	Zusammenfassung der Ergebnisse und abschließende Betrachtung . . . . .	203
<b>8</b>	<b>Thermodynamische Integrationsrechnungen am Modellsystem der Aldose Reduktase</b>	<b>206</b>
8.1	Problemstellung . . . . .	206
8.2	Methodik . . . . .	208
8.3	Testsystem . . . . .	209
8.4	Modellsystem Fidarestat-Sorbinil . . . . .	210
<b>III</b>	<b>Zusammenfassung, Summary</b>	<b>217</b>
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>218</b>
<b>10</b>	<b>Summary</b>	<b>222</b>
<b>A</b>	<b>Verwendete Software</b>	<b>227</b>
<b>B</b>	<b>Publikationen und Posterbeiträge</b>	<b>228</b>
B.1	Publikationen . . . . .	228
B.2	Posterbeiträge . . . . .	228
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>230</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>231</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>236</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>239</b>



# **Teil I**

## **Grundlagen und Methoden**

# 1 Einführung und Problemstellung

Die Entschlüsselung der Aminosäuresequenz von Proteinen reicht zur Beschreibung ihrer Struktur und biochemischen Funktion nicht aus. Theoretische Ansätze zur Strukturvorhersage existieren zwar und befinden sich im Aufschwung, jedoch behaupten sich nach wie vor experimentelle Methoden zur Tertiärstrukturbestimmung von Proteinen. Zu den wichtigsten Vertretern gehören die Röntgenkristallografie und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR). Die dadurch gewonnenen Strukturen stellen jedoch nur eine Momentaufnahme, einen Snapshot, in dem dem Makromolekül zugänglichen Konformationsraum dar. Proteine sind dynamische Gebilde mit einer inhärenten Flexibilität. Sie sind in der Lage, weitreichende Veränderungen hinsichtlich ihrer Konformation einzugehen, welche für ihre Funktion von essentieller Bedeutung sind. Um einen Einblick bzw. ein besseres Verständnis der katalytischen Aktivität von Enzymen zu erhalten, ist es zwingend notwendig, die dynamischen Vorgänge in ihrer Struktur zu erfassen. Besonders im Wirkstoffdesign ist die Analyse bzw. Berücksichtigung der inhärenten Proteinflexibilität von immensem Interesse. Nach einer gängigen biochemischen Modellvorstellung [1] existiert ein Protein vor der Ligandenbindung in verschiedenen, energetisch sich voneinander geringfügig unterscheidenden Konformationen. Der Ligand bindet selektiv an eine dieser Konformationen, stabilisiert sie und erhöht den Anteil dieser ausgewählten Konformation relativ zur gesamten Proteipopulation. Die zunehmende Anzahl experimentell erhaltener Protein-Ligand-Komplexe ein und desselben Enzyms mit strukturell unterschiedlichen Liganden in der Bindetasche bestätigt eine Bindung dieser Liganden an unterschiedliche Proteinkonformationen. Diese dynamischen Anpassungen und Veränderungen der Bindetasche bei der Ligandenbindung sind ein zentrales Thema im Wirkstoffdesign. Das Hauptproblem für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist dabei die Unmöglichkeit, im Vorfeld Aussagen zu treffen, welche Konformation das Target als Antwort auf den Bindungsprozess annehmen wird [2].

Molekulardynamik-Simulationen (MD) stellen eine Möglichkeit dar, eine zeitliche Abfolge von Proteinkonformationen zu erhalten und demgemäß die Proteindynamik zu studieren. Dadurch ist es möglich, besonders flexible Bereiche zu identifizieren bzw. bislang nicht durch einen Wirkstoff adressierte Taschen zu entdecken. Darüber hinaus ermöglichen spezielle Formen der Molekulardynamik (wie z.B. die Steered Molekulardynamik SMD), Bewegungen ganzer Proteindomänen nachzuvollziehen. Dabei können Übergänge von einer ligandgebundenen in eine nicht-ligandgebundene Form simuliert werden, welche Rückschlüsse auf Bindemechanismen bzw. dafür relevante dynamische Vorgänge erlauben.

In der vorliegenden Arbeit wird die Methode der MD auf die Aldose Reduktase (ALR2) und zwei Vertreter der Nukleären Rezeptoren (NR), den Androgenrezeptor (AR) und Estrogenrezeptor (ER), angewandt.

Bei der ALR2 werden dabei Studien zu zwei experimentell erhaltenen Protein-Ligand-

---

Komplexen durchgeführt. Die Liganden unterscheiden sich nur geringfügig in der Länge einer Seitenkette, ihre Bindung führt allerdings zu gänzlich unterschiedlichen Bindemodi. Einer davon ist bislang einzigartig für die ALR2 [3]. Mit Hilfe von MD-Simulationen soll versucht werden, eine Erklärung für diese neue Konformation der Bindetasche im Vergleich zu jener eines strukturell sehr ähnlichen Liganden zu finden. Außerdem sind über diese Studien Aussagen über besonders flexible Bereiche der ALR2-Bindetasche möglich, die mit bereits existierenden Erkenntnissen über die Bindetaschenflexibilität verglichen werden können.

Ziel dieser Arbeit ist es demgemäß nicht, einen neuen Inhibitor der ALR2 vorzuschlagen, sondern ALR2 durch MD-Studien und spezielle Anwendungen davon als Modellsystem für Aussagen über Proteinflexibilität heranzuziehen. So wird auch versucht, durch die Methode der SMD einen Übergang zwischen einer röntgenkristallografisch ermittelten kofaktorgebundenen Holo-Konformation und kofaktorfreen Apo-Konformation zu simulieren. Damit wird untersucht, ob es durch die computergestützte Methode möglich ist, den Übergang von einer Proteinkonformation in die andere nachzuvollziehen, bzw. ob die experimentell erhaltenen Strukturen sich mit den theoretisch ermittelten decken. Eine mechanistische Deutung des Kofaktorassoziations- und Kofaktordissoziationsprozesses sollte auf diese Weise versucht werden. Dafür ist es notwendig, strukturelle Veränderungen im Protein zeitlich zu verfolgen und entscheidende Vorgänge zu identifizieren.

Die Methode der SMD wird in dieser Arbeit auch auf ein weiteres, pharmakologisch interessantes System übertragen. Dabei wird versucht auch an zwei Vertretern der Klasse der NRs, dem AR und dem ER, eine solche weitreichende Bewegung nachzuvollziehen. Auch in diesen Rezeptoren sind zwei in der Position einer  $\alpha$ -Helix unterschiedliche Formen bekannt. Auch hier soll versucht werden, mit Hilfe der genannten Methode, relevante Ereignisse hinsichtlich der Helixmobilität zu identifizieren.

Im abschließenden Kapitel dieser Arbeit wird schließlich versucht, auf den thermodynamischen Aspekt der Protein-Ligand-Komplexe einzugehen. Durch Berechnungen anhand der Methode der thermodynamischen Integration (TI) soll versucht werden, relative Bindungsaffinitäten am Modellsystem ALR2 zu gewinnen. Durch Vergleich mit experimentell vorhandenen Daten wird die Methode validiert. Das Verfahren der TI sollte in Zukunft eine Voraussage von Affinitäten beliebiger, sich geringfügig unterscheidender Inhibitoren, die aber denselben Bindemodus aufweisen, ermöglichen und damit den Prozess des Wirkstoffdesigns erleichtern.

# 2 Proteinflexibilität und Affinitätsvorhersage im Wirkstoffdesign

## 2.1 Proteinflexibilität

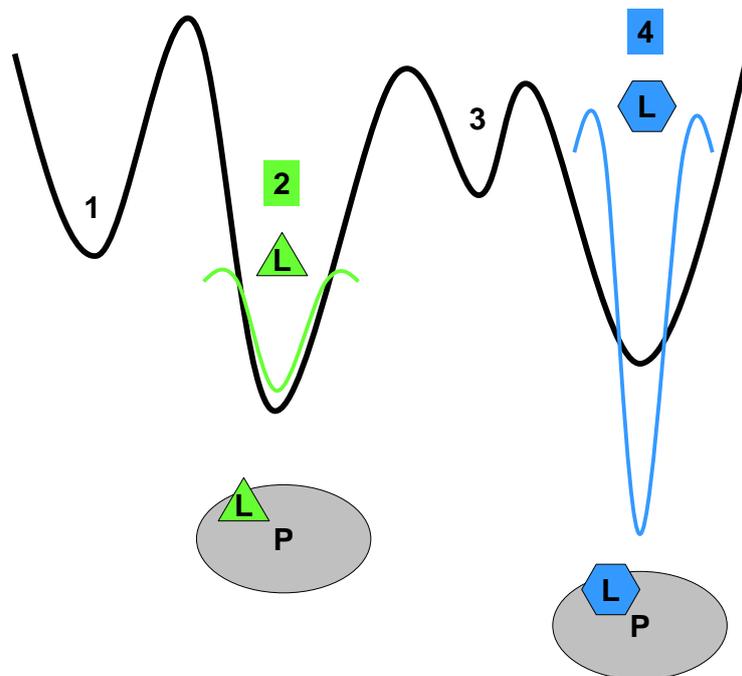
Proteine sind dynamische Gebilde mit einer intrinsischen Plastizität. So wurde durch NMR-Experimente bestätigt, dass die zur Katalyse notwendigen Proteinbewegungen bereits in der freien Enzymform möglich sind [4]. Als Konsequenz dieser intrinsischen Proteinflexibilität ergibt sich die Notwendigkeit ihrer Berücksichtigung im rationalen Wirkstoffdesign, während dies in ersten Vorstellungen über Protein-Ligand-Wechselwirkungen keinen Einfluss nahm.

Erwin Fischer postulierte in seinem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ eine fixierte Proteinstruktur, in welche sich der Ligand in einer optimalen Konformation einpasst, um optimale Wechselwirkungen einzugehen [5]. Linus Pauling übertrug später diese Annahme auf den Übergangszustand [6]. 1958 wurde der Grundstein der „induced-fit-Theorie“ gelegt, in der Koshland sowohl dem Protein als auch dem Liganden ein gewisses Maß an Flexibilität zusprach. Bei einer Wechselwirkung kommt es zu einer Konformationsänderung, und damit ist die Bildung des Ligand-Protein-Komplexes erst möglich [7].

Aktuelle Vorstellungen gehen von einer komplexen Energie-Hyperfläche („potential energy hyper surface“) aus. Demnach sind viele konformativ und energetisch unterschiedliche Zustände möglich [8]. Die Form dieser Hyperfläche wird von umgebungsabhängigen Variablen (Ionenstärke, pH, Temperatur, etc.) bestimmt. Auch durch die Einführung eines Liganden wird das System beeinflusst. In diesem Zusammenhang kommt die Idee einer induzierten Anpassung („induced-fit“) des Proteins wieder ins Spiel. Aber nicht die Einführung des Liganden deformiert das bis dahin in einem fixierten Zustand betrachtete Protein, sondern das Protein ist per se in der Lage, unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden, sämtliche beobachtbaren Konformationen einzunehmen. Einige davon entsprechen dem nativen, gefalteten Zustand, andere dem komplexierten Zustand nach induzierter Anpassung [9, 10]. Der Ligand selektiert daraus die für seine Bindung günstigste Proteinkonformation, führt zu deren Stabilisierung und verschiebt das Gleichgewicht der möglichen Konformationen zu dieser. Das Auftreten mehrerer angepasster Proteinkonformationen mit ähnlich günstiger Energie bedingt die Existenz multipler Bindungsmodi eines Liganden.

Die für die Konformationsänderung benötigte Energie ist von entscheidender Bedeutung in der Wirkstoffentwicklung. Wenn sie vernachlässigbar klein ist, wird die intrinsische Bin-

dungsenergie des Liganden zum maßgeblichen Faktor. Dieser selektiert dann die tatsächlich für seine Bindung günstigste Proteinkonformation. Ist die benötigte Energie allerdings groß, dann bindet ein Ligand mit mäßiger intrinsischer Bindungsenergie an eine energetisch sehr günstige Proteinkonformation, während einer mit hoher intrinsischer Affinität an eine weniger günstige und damit auch weniger populierte Konformation des Proteins binden kann. Der günstigste Fall wäre natürlich eine Bindung eines solchen Liganden an eine günstige Proteinkonformation. Die folgende Abbildung 2.1 versucht diese energetischen Überlegungen darzustellen: Die Zustände 2 und 4 sind im ungebundenen Zustand aufgrund der günstigen Energie am häufigsten populierte. Der Ligand (grün) mit mäßiger intrinsischer Affinität bindet präferentiell an die schon im ungebundenen Zustand am häufigsten populierte Konformation 2. Ein Ligand (blau) mit hoher intrinsischer Affinität bindet bevorzugt an die Konformation 4, da die Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen 2 und 4 und damit die zu einer Konformationsänderung nötige Energie überkompensiert wird [11].



**Abbildung 2.1:** Energetische Überlegungen zur Energie-Hyperfläche der Ligandenbindung: Ein Protein existiert in Lösung in energetisch unterschiedlichen Konformationen (1-4). Beispielhaft bindet ein Ligand (grün) mit mäßiger intrinsischer Affinität an Zustand 2, welcher bereits im ungebundenen Zustand am häufigsten populierte ist; ein Ligand (blau) mit hoher intrinsischer Affinität bindet bevorzugt an Zustand 4, was zu einer Verschiebung der Population im Vergleich zum ungebundenen Zustand führt.

Die beschriebene Flexibilität des Proteins ist oft Grundvoraussetzung für die katalytische Aktivität eines Enzyms. Zudem wird die Bindung von strukturell unterschiedlichen

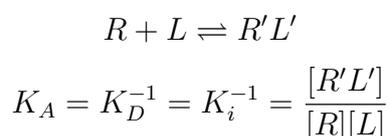
Substraten durch Flexibilität im Bereich des katalytischen Zentrums möglich, was physiologisch für bestimmte Enzyme durchaus erwünscht ist.

Beim strukturbasierten Wirkstoffdesign sollte die Rezeptorflexibilität Berücksichtigung finden. Im Rahmen des *Molecular Modeling* wurden im Laufe der Jahre eine Reihe von Methoden dazu entwickelt. Die Ansätze reichen von einer Berücksichtigung verschiedener Seitenketten-Konformationen bis hin zu Simulationen ganzer Domänen [12, 13, 14].

## 2.2 Affinitäten

Wie im vorhergehenden Abschnitte 2.1 bereits geschildert, wird die selektive Bindung von Liganden an ein Protein sowohl durch die strukturelle Erkennung, als auch durch die sich daraus ergebenden energetischen Beiträge bestimmt [15, 16]. Sowohl eine kovalente als auch eine nichtkovalente Bindung an die Zielstruktur ist möglich, hier soll allerdings nur die nichtkovalente Assoziation beschrieben werden.

Die Stärke derartiger Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist experimentell bestimmbar und wird in der charakteristischen Größe der Assoziations- ( $K_A$ ) bzw. der dazu reziproken Dissoziations- bzw. Inhibitionskonstanten ( $K_D$  bzw.  $K_i$ ) quantifiziert.  $K_i$  ist eine thermodynamische Größe, die angibt, welcher Anteil des Liganden L im Mittel an den Rezeptor R gebunden ist und hat die Dimension einer Konzentration [17]. Die nicht-kovalente, reversible Assoziation von Rezeptor und Ligand zum Rezeptor-Ligand-Komplex (R'L') in wässriger Lösung wird durch das folgende Gleichgewicht beschrieben:



Statt der Konstanten wird häufig die freie Standardbindungsenthalpie  $\Delta G^0$  dieser Reaktion unter der Bedingung der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts angegeben. Sie setzt sich aus einem enthalpischen ( $\Delta H^0$ ) und einem entropisch bedingten ( $T\Delta S^0$ ) Anteil zusammen. T steht für die absolute Temperatur [18].

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_i = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Bei der nicht-kovalenten Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor sind die thermodynamischen Beiträge zur Bindungsaffinität ( $\Delta G^0$ ) rückführbar auf Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol/Dipol-Wechselwirkungen und Wechselwirkungen zu Metallionen. Darüber hinaus müssen Solvatations- und Desolvatationsbeiträge, Komplementarität der Raumstruktur sowie intramolekulare Veränderungen bei Rezeptor (R') und Ligand (L') im Verlauf der Komplexbildung Berücksichtigung finden [19].

Experimentell bestimmte Inhibitionskonstanten liegen in einem Bereich zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-12}$  M, was einer Freien Standardbindungsenthalpie von 10 bis 70 kJ/mol bei  $T = 298$  K entspricht [15]. Eine Änderung der Freien Standardenthalpie um 1,4 kcal/mol bewirkt bei dieser Temperatur eine Änderung der Inhibitionskonstanten um eine Größenordnung.

## 2.3 Bedeutung im Wirkstoffdesign

Voraussetzung für die Entfaltung der Wirkung eines Wirkstoffes ist die Bindung dieses Moleküls an sein Zielmolekül (Target). Bei diesem Bindungsprozess ist es erforderlich, dass die beiden Bindungspartner in ihren Oberflächeneigenschaften zueinander passen, um spezifische Wechselwirkungen miteinander eingehen zu können.

Der Entwicklungsprozess eines neuen Arzneistoffes lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Zu Beginn wird nach einer Leitstruktur gesucht. Diese ist ein Ligand mit erkennbarer Affinität zu einem gegebenen Zielenzym. Daraufhin beginnen Optimierungsphasen dieses Liganden, deren Ziel es sein soll, dessen Affinität und Selektivität zu seinem Rezeptor zu erhöhen. Daneben sind hier auch die Einstellung günstiger pharmakokinetischer Eigenschaften hinsichtlich Absorption des Arzneistoffes, der Verteilung und Metabolisierung im Organismus sowie der Exkretion und Toxizität von Interesse (ADMET). Mehrere Phasen der klinischen Testung erfolgen abschließend.

Grundlage des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ist die steigende Anzahl dreidimensionaler Strukturen aus NMR- und röntgenkristallografischen Messungen. Aus diesen werden Informationen über die Beschaffenheit der Bindetasche unter Berücksichtigung ihrer besonders flexiblen Aminosäuren gewonnen. Ein affiner Ligand sollte deutliche strukturelle und chemische Komplementarität zu diesem Wirkort besitzen. Allerdings reichen die aus den experimentellen Bestimmungen gewonnenen Minimumsgeometrien nicht aus, die flexiblen Bereiche eines Rezeptors zu beschreiben. In Abhängigkeit von der Größe und Struktur eines Liganden kann bei Rezeptoren mit ausgeprägter Plastizität die Form der Bindestelle variieren. Auch für strukturell ähnliche Liganden können sich unterschiedliche Bindemodi ergeben, weswegen überraschende Ligandenorientierungen möglich sind. Genauso kann es durch die Rezeptorflexibilität möglich sein, einen großen, zusätzlichen Substituenten an ausgezeichneten Stellen des molekularen Grundgerüsts in der Bindetasche anzubringen [1]. Vorhersagen bzgl. der Flexibilität sind schwierig, aber computergestützte Methoden (MD-Simulationen) bieten eine Möglichkeit zu zusätzlichem Erkenntnisgewinn über die Charakteristika der Rezeptorflexibilität. Außerdem sollte man sich im Klaren darüber sein, dass Röntgenkristallstrukturen nur einen geringen Informationsgewinn über Affinitäten von Liganden erlauben. Eine darin beobachtete und ausgebildete Wechselwirkung zwischen einem bestimmten Bereich des Liganden und des Rezeptors gibt keinen Aufschluss über den Beitrag dieser zur gemessenen Affinität.

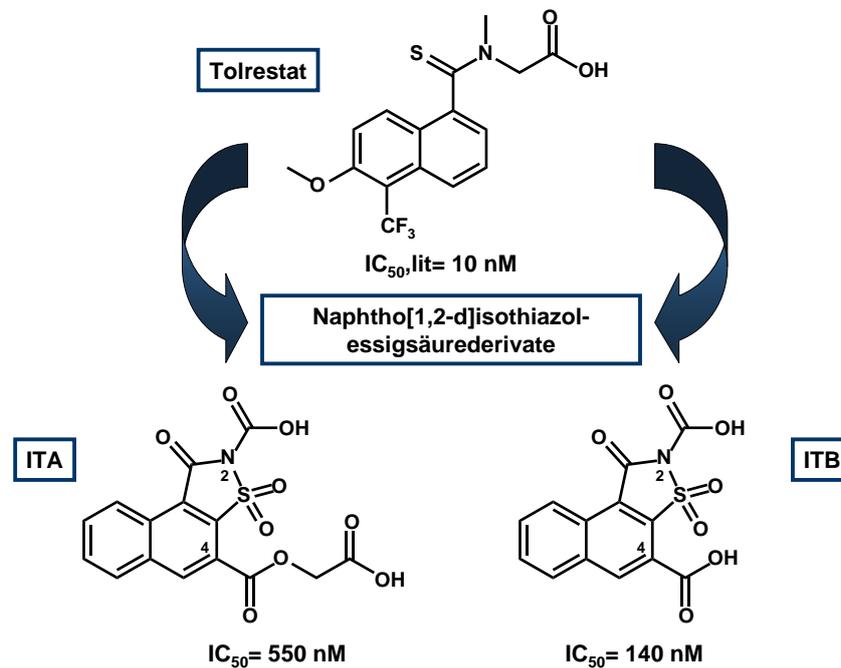
Beim strukturbasierten Entwurf von Wirkstoffen werden hauptsächlich Rezeptorgeometrien direkt aus der Röntgenstrukturanalyse unter der Annahme eingesetzt, dass diese Geometrien den aktiven Strukturen in Lösung gleichen [20, 21]. Es existieren zwei Ansätze zum computergestützten Wirkstoffdesign: Im *de novo*-Designs werden durch Verknüpfung vorher platzierter Atome bzw. Fragmente oder den sukzessiven Aufbau eines Moleküls ausgehend von einer „Keimstelle“ neue Leitstrukturen entworfen [22, 23]. Alternativ werden die einzelnen Moleküle einer Datenbank (flexibel) in die Ligandbindestelle eingepasst (Docking-Verfahren) und nach einem komplementären Liganden durchsucht (virtuelles Screening) [24]. Abschließend erfolgt in beiden Methoden eine Affinitätsvorhersage des jeweiligen Liganden zu seinem Rezeptor.

Zwei Aspekte sind demzufolge maßgeblich für den erfolgreichen Wirkstoffentwurf unter Verwendung der Proteinstruktur: die Berücksichtigung einer ausreichenden Anzahl von Konfigurationen von Ligand und Rezeptor sowie ein Erkennen einer bevorzugten Bindungsgeometrie und die Vorhersage ihrer Affinität im Ligand-Rezeptor-Komplex.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beiden Aspekten nachgegangen und versucht, durch computergestützte Methoden die Flexibilität von Rezeptor-Ligand-Komplexen durch Generierung (MD-Simulationen) von Konfigurationen als relativer Anordnungen von Rezeptor und Ligand zu untersuchen. Daneben wurde auch versucht, Affinitäten strukturell ähnlicher Liganden vorherzusagen (TI).

Die in dieser Arbeit als Gegenstand der Untersuchungen behandelte Aldose Reduktase ist ein Musterbeispiel eines Enzyms mit außerordentlich ausgeprägter Rezeptorflexibilität. Diese ist vor allem im Bereich des aktiven Zentrums ausgeprägt. Darin liegt auch die für sie beschriebene Substratpromiskuität begründet. Ein Vergleich der vielen experimentell zugänglichen Kristallstrukturen der ALR2 (siehe Abschnitt 4.1.2) liefert eine nochmalige Bestätigung der Flexibilität. Die Bindetasche liegt in drei möglichen Hauptkonformationen vor, die durch die röntgenkristallografischen Komplexstrukturen von ALR2 und Sorbinil (PDB-Code 1ah0), Tolrestat (PDB-Code 1ah3) und IDD594 (PDB-Code 1us0) repräsentiert werden. Die Spezifitätstasche liegt dabei bei den beiden letztgenannten offen vor, im erstgenannten Fall ist sie geschlossen.

Eine Reihe von als Tolrestat-Analoga konzipierten Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurederivaten [3] veranschaulicht eindringlich die Notwendigkeit der Berücksichtigung mehrerer Proteinkonformationen im Docking Prozess. Die Idee beim Entwurf dieser Derivate bestand darin, die Tolrestatkonformation durch Einführung eines Sulfonlactamringes zu stabilisieren. Die Liganden sollten demnach wie Tolrestat an die ALR2 mit offener Spezifitätstasche binden. Die beiden Vertreter dieser Reihe mit niedrigstem  $IC_{50}$ -Wert (140 bzw. 550 nM) sind in Abb. 2.2 mit ihrer Strukturformel dargestellt. Sie unterscheiden sich nur in der Länge der Seitenkette in der 4-Position des Naphthylringsystems. Die mit ITB bezeichnete Verbindung ist dort lediglich mit einer Carbonsäurefunktionalität substituiert, während im Falle von ITA diese noch verestert vorliegt.



**Abbildung 2.2:** Strukturformeln und  $IC_{50}$ -Werte von Tolrestat und den beiden aktivsten ALR2-Inhibitoren der Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurereihe.

Zusätzlich zur Synthese wurden Docking Studien der beiden Inhibitoren mit AutoDock 3.0.5 [25] durchgeführt. Diese verwendeten die Tolrestat-Proteinkonformation als Templat. Die daraus resultierenden besten Docking-Lösungen wurden anschließend noch einem Minimierungsprozess gemeinsam mit den Seitenketten der Bindetasche unterzogen. Die Ergebnisse lieferten eine Orientierung der Carboxylfunktion in der 2-Position hin zum katalytischen Zentrum und insgesamt einen Bindemodus, der in beiden Fällen tatsächlich dem von Tolrestat ähnlich ist.

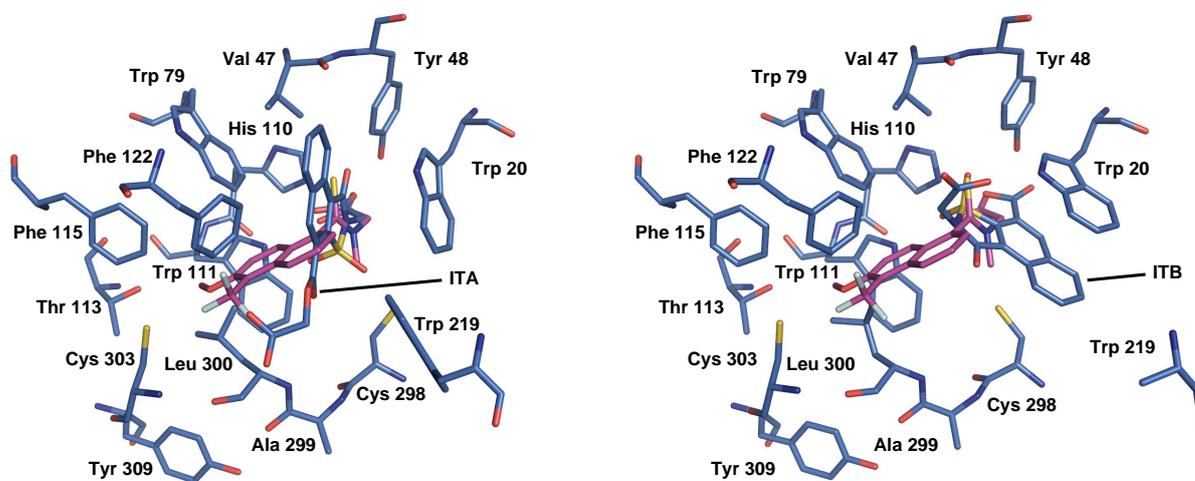
Wie bereits erwähnt, existiert die Bindetasche der ALR2 neben der Konformation wie sie bei der Bindung von Tolrestat eingenommen wird, noch in zwei weiteren Hauptkonformationen. In einer weiteren Docking-Studie wurden daher neben der Tolrestat-Konformation auch die Sorbinil- und IDD594-Konformation als Templat benutzt [26]. In Tab. 2.1 sind die sich dabei ergebenden Werte der AutoDock 3.0.5 Scoring Funktion aufgelistet. Erstaunlicherweise ist in beiden Fällen der Energiewert beim Docken in die Tolrestat-Bindetasche um ca. 1 kcal/mol weniger günstig als jener nach dem Docking in die beiden anderen Bindetaschen. Die Tolrestatkonformation stellt damit die am wenigsten bevorzugte Bindetasche dar, während die Sorbiniltasche den negativsten und damit besten Scoring-Wert liefert und demnach bei der Bindung besonders begünstigt sein sollte. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der sich aus der strukturellen Betrachtung der bestgereihten Docking-Lösungen ergab, ist eine Adressierung des katalytischen Zentrums durch die Carboxylfunktion an der 4-Position des Ringgerüsts von Inhibitor ITB. Dies steht im Gegensatz zur ursprünglichen Designhypothese und wird im Falle des Inhibitors ITA unter den besten Docking-Lösungen

nicht beobachtet.

**Tabelle 2.1:** Ergebnisse der AutoDock Scoring Funktion beim Docking von ITA und ITB in die drei Hauptkonformationen der ALR2 Bindetasche [26].

AutoDock Score Ligand	Hauptkonformationen der ALR2 Bindetasche		
	Sorbinil	Tolrestat	IDD594
ITA	-12,0 kcal/mol	-10,4 kcal/mol	-11,4 kcal/mol
ITB	-10,0 kcal/mol	-9,1 kcal/mol	-9,9 kcal/mol

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für beide Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäure-derivate ein Bindemodus analog zu dem von Sorbinil mit geschlossener Spezifitätstasche postuliert werden konnte. Eine nachfolgende Ermittlung der Kristallstrukturen beider im Komplex mit humaner ALR2 bestätigte dies experimentell [27]. Die ermittelten Strukturen besitzen eine Auflösung von 1,65 (ITA-Komplex) bzw. 1,55 Å (ITB-Komplex) und weisen tatsächlich eine von Tolrestat abweichende Bindetaschenkonformation auf, die in der nachfolgenden Abb. 2.3 dargestellt ist.



**Abbildung 2.3:** Röntgenkristallografisch ermittelte Bindemodi von ITA (links) und ITB (rechts) im Komplex mit ALR2; Tolrestat in pink zum Vergleich.

Dieses Beispiel zeigt eindeutig, wie wichtig es ist, bei der Studie von Proteinen deren Flexibilität zu berücksichtigen. Wäre in diesem Fall nur die Tolrestat Hauptkonformation der Bindetasche für den Dockingprozess herangezogen worden, wäre es nicht möglich gewesen, den Bindemodus der Liganden näherungsweise korrekt vorherzusagen. Eine Möglichkeit zur Untersuchung des Ausmaßes der Enzymflexibilität sind Molekulardynamik-Simulationen (MD). Diese Methode bildet den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit

und wird in ihrer klassischen Form, aber auch in der Spezialform der Steered Molekulardynamik (SMD, siehe Kapitel 6) und als Thermodynamische Integrationsrechnung (TI, siehe Kapitel 8) durchgeführt. Das für die Untersuchungen zugrunde liegende Modellsystem ist die bereits vorgestellte ALR2, daneben werden aber auch zwei Vertreter der Familie der Nukleären Rezeptoren (NRs, Kapitel 4.2) einer entsprechenden Studie unterzogen (Androgenrezeptor AR und Estrogenrezeptor ER, siehe Kapitel 7).

Ein Hauptaugenmerk wird aber zunächst auf die kristallografisch ermittelten und hier vorgestellten Strukturen von ITA und ITB im Komplex mit ALR2 gelegt. In dem Kapitel 5 werden durchgeführte MD-Simulationsstudien dieser beiden Komplexe dargestellt, um ein fundiertes Verständnis ihrer strukturellen Charakteristika sowie der inhärenten Flexibilität der Aldose Reduktase zu gewinnen. Der Fall des Liganden ITB ist dabei von besonderem Interesse, zeigt die zugehörige Kristallstruktur im Komplex mit ALR2 doch einen niemals zuvor experimentell beobachteten Bindemodus, welcher durch das Öffnen einer neuen Untertasche charakterisiert ist. Die Details zu diesem besonderen Bindemodus sind im entsprechenden Kapitel (5.4) aufgeführt.

# 3 Methoden

## 3.1 Molekulardynamik-Simulationen

Im Grenzbereich zwischen Physik, Chemie und Biologie ist das Gebiet der Molekulardynamik (MD) anzusiedeln [28]. Dabei werden (komplexe) biomolekulare Systeme mikroskopisch modelliert [29]. Im Mittelpunkt dieser Modellierung stehen dabei Kraftfelder, auf die im folgenden Unterabschnitt kurz eingegangen wird.

Das Ziel von Molekulardynamik-Simulationen liegt in der Ermittlung makroskopischer Größen. Diese können statischer (Gleichgewicht) sowie auch dynamischer Natur (Nichtgleichgewicht) sein. Zu ersteren gehören strukturelle und thermodynamische Größen, zweite umfassen z.B. Wärmetransport, Diffusion oder Viskosität bis hin zur Simulation von Proteinfaltungen als größte Herausforderung. Bei endlicher Temperatur werden diese Eigenschaften nicht durch das Energieminimum bestimmt, sondern durch alle bei dieser Temperatur zugänglichen Konfigurationen. Dabei sind nicht alle Konfigurationen gleich wichtig. Wie wichtig eine Konfiguration des Systems für eine bestimmte Eigenschaft ist, entscheidet einzig und allein die Häufigkeit mit der diese Konfiguration eingenommen wird. Für Gase und einfache Kristalle lassen sich solche Wahrscheinlichkeiten oft geschlossen ausrechnen. Biochemisch interessante Reaktionen finden aber in der flüssigen Phase statt. Hier liegen allerdings völlig unperiodisch auftretende und sich ständig verändernde Wechselwirkungen vor, die ein direktes Berechnen von Konfigurationswahrscheinlichkeiten völlig unmöglich machen. Aus diesem Grund kam die Technik der Molekulardynamik-Simulationen auf, in der einzelne Atome durch die Newton'sche Bewegungsgleichung beschrieben werden. Die statischen sowie dynamischen Observablen werden als Erwartungswerte bzgl. eines repräsentativen statistischen Systems *in silico* berechnet.

**Kraftfelder** Wie im vorherigen Abschnitt angedeutet, werden die durch Molekulardynamik untersuchten Systeme zunächst mit Hilfe von Kraftfeldern modelliert. Dabei handelt es sich um ein physikalisches Modell zur Beschreibung der Energie des Systems beziehungsweise der Kräfte zwischen den Teilchen. Die Wahl des Kraftfeldes ist keine triviale Angelegenheit und sollte wohl überlegt sein. Eine Fehlentscheidung in diesem Bereich kann durch nichts mehr korrigiert werden. Die Entwicklung von Kraftfeldern geht in die 1970er Jahre zurück und wird bis heute vorangetrieben.

In einem Kraftfeld reicht die Beschreibung der Materie mit Kernladungszahlen nicht aus, daher werden für jedes Element in Abhängigkeit seiner chemischen Umgebung (d.h. der ihn umgebenden Bindungen und Bindungspartner) verschiedene Atomtypen definiert.

Für die Beschreibung wird der Geltungsbereich der klassischen Physik aus dem makroskopischen in den mikroskopischen Raum übertragen. Die Bewegung der Elektronen wird dabei, ausgehend von der Born-Oppenheimer-Näherung, welche eine Trennung der Bewegung von Atomkernen und Elektronen zulässt, vernachlässigt. Die Grundidee besteht in der Modellierung des Systems aus geladenen Massepunkten, die über ein Netzwerk von Federn miteinander verbunden sind. Diese Modell impliziert natürliche Bindungslängen, -winkel und -torsionen, die unter Berücksichtigung nicht-bindender Wechselwirkungen verzerrt werden. Ein einfaches molekülmechanisches Kraftfeld besteht somit aus der Summe einzelner, separierbarer Wechselwirkungen, welche Änderungen von Bindungslängen, -winkeln und -torsionen sowie die van der Waals Energie und Elektrostatik beschreiben. Der Absolutwert der Gesamtenergie ist physikalisch nicht relevant, nur die relativen Energien verschiedener Konformationen zueinander sind aussagekräftig.

Die in dieser Arbeit durchgeführten MD-Simulationen wurde mit dem AMBER Kraftfeld in der Version parm99 [30] und parm99SB [31] durchgeführt, welches eine weit verbreitete Anwendung erfährt und durch experimentelle Daten sowie quantenmechanische Rechnungen parametrisiert wurde. Die grundsätzliche Form des AMBER Kraftfeldes sieht folgendermaßen aus:

$$V_{\text{Gesamt}} = \sum_{\text{Bindungslängen}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Bindungswinkel}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Torsionswinkel}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j}^{\text{Atome}} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] + \sum_{i < j}^{\text{Atome}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}. \quad (3.1)$$

Die ersten drei Terme beschreiben die Energiedifferenz zwischen einer Molekülgeometrie mit Idealwerten und der vorliegenden Geometrie. Term vier und fünf stehen für die nicht-bindenden van der Waals (vdW) und elektrostatischen Wechselwirkungen. Alle werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

- **Bindungslängen**



$$V(r) = \sum_{\text{Bindungen}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 \quad (3.2)$$

In Analogie zum Hook'schen Gesetz der klassischen Physik wird die Auslenkung der Atome über ein harmonisches Potential beschrieben.  $r_{\text{eq}}$  ist der ideale Abstand im Gleichgewicht,  $r$  der aktuelle,  $K_r$  die Federkonstante der hypothetischen Feder zwischen den Atomen.

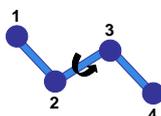
- Winkelbeugung



$$V(\theta) = \sum_{\text{Winkel}} K_{\theta}(\theta - \theta_{\text{eq}})^2 \quad (3.3)$$

Analog zum Term der Bindungslänge wird hier ein quadratischer Ansatz verwendet.  $K_{\theta}$  bestimmt die Proportionalität zwischen Auslenkung des Winkels  $\theta$  vom idealen Winkel  $\theta_{\text{eq}}$  und der Energie.

- Torsionsterm



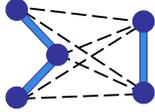
$$V(\phi) = \sum_{\text{Torsionen}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad (3.4)$$

Ein Diederwinkel ist ein Winkel zwischen zwei gedachten Flächen. Dabei wird er durch die Position von 4 Atomen (1-4) zueinander als Winkel bestimmt, der sich bei Betrachtung einer (fiktiven) Bindung entlang der Atome 2 und 3 zwischen den Atomen 1, 2 und 3 sowie aus den Atomen 2, 3 und 4). Der zugehörige Term in seiner allgemeinen Form im Kraftfeld ist in Gleichung 3.4 gegeben.  $n$  ist die Periodizität der Kosinusfunktion und definiert die Anzahl möglicher Minima.  $V_n$  ist ein qualitatives Abbild der Barrierenhöhe.  $\gamma$  ist die Phasenverschiebung und dient dazu, das globale Maximum vom Torsionswinkel  $\phi = 0$  weg zu verschieben, beispielweise wird bei Rotationen um eine Doppelbindung auf diese Weise ein Maximum bei  $\phi = 0$  erreicht. Des Weiteren sind in manchen Kraftfeldern sogenannte „improper torsion“ oder „out-of-plane“ Terme notwendig, um eine Planarität wie z.B. in Cyclobutanon sicher zu stellen. Dabei handelt es sich um Pseudo-Torsionspotentiale.

Bei „improper torsion“ Termen wird der Diederwinkel mittels vier beliebiger nicht miteinander verbundener Atome festgelegt. Bei dem „out-of-plane“ Term definieren drei Atome eine Ebene. Die Abweichung von dieser Ebene wird entweder über den Bindungswinkel aus ihr oder durch den Normalabstand zu ihr beschrieben. Dafür werden harmonische Potentiale verwendet.

Üblicherweise wird aufgrund der direkten Implementierbarkeit in den Kraftfeldalgorithmen der „improper torsion“ Ansatz dem „out-of-plane“ Ansatz vorgezogen.

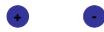
- van der Waals Wechselwirkungen



$$V(R) = \sum_{i < j}^{Atome} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \quad (3.5)$$

Ein Teil der nicht-kovalenten Wechselwirkungen umfassen van der Waals Wechselwirkungen. In ihnen werden langreichweitige, attraktive und kurzreichweitige, repulsive Kräfte miteinander kombiniert. Die Erklärung für beide erfolgt quantenmechanisch. Empirisch werden sie durch das Lennard-Jones Potential, einer sogenannten 12-6-Funktion beschrieben.  $R_{ij}$  bezeichnet den Abstand zwischen den Teilchen  $i$  und  $j$ . Die Konstanten  $A_{ij}$  und  $B_{ij}$  beinhalten die Tiefe der Potentialmulde  $\epsilon$  und den Gleichgewichtsabstand  $r_m$  der jeweiligen Teilchen und sind definiert als  $A_{ij} = \epsilon r_m^{12}$  und  $B_{ij} = 2\epsilon r_m^6$ .

- Elektrostatische Wechselwirkungen



$$V(r) = \sum_{i < j}^{Atome} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.6)$$

Diese Wechselwirkung wird mit Hilfe des Coulombschen Gesetzes beschrieben. Dabei ist es wichtig, zunächst Atomladungen zu gewinnen, welche die molekularen Eigenschaften möglichst gut widerspiegeln. In Gleichung 3.6 sind  $q_i$  und  $q_j$  diese Ladungen,  $r_{ij}$  ist der Abstand der Atome  $i$  und  $j$ . Die Dielektrizitätskonstante des Vakuums wird mit  $\epsilon_0$  bezeichnet.

Die hier vorgestellten nicht-kovalenten Wechselwirkungen bestimmen maßgeblich die Rechenzeit, da sie zwischen allen Atompaaren des Systems ermittelt werden müssen. Es ist üblich, für die van der Waals Wechselwirkungen einen Abbruchradius zu definieren. Für die elektrostatische Wechselwirkung ist das aber nicht zulässig, da das Volumen einer Kugelschale ( $\propto R^3$ ) (beinhaltet die Wechselwirkungspartner) mit steigendem Abstand schneller größer wird als die Wechselwirkung ( $\propto 1/R$ ) abnimmt. Das bedeutet, dass die Wechselwirkung mit Teilchen in größerer Entfernung nie vernachlässigbar wird.

### 3.1.1 „Klassische“ Molekulardynamik-Simulationen - MD

Bei MD-Simulationen werden alle Atome des Systems über die Newtonschen Bewegungsgleichungen beschrieben. Ihre gleichzeitige Integration resultiert in einer Trajektorie.

**Euler Verfahren** Die Newtonsche Bewegungsgleichung

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad (3.7)$$

beschreibt die Bewegung eines Teilchens mit der Masse  $m_i$  entlang einer Koordinate  $\vec{r}_i$  mit einer Kraft  $\vec{F}_i$ . Dabei ist

$$\vec{a}_i = \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad (3.8)$$

beziehungsweise

$$\vec{v}_i = \frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t} \quad (3.9)$$

und

$$\vec{a}_i = \frac{\partial \vec{v}_i}{\partial t} \quad (3.10)$$

Durch einfache Umformung erhält man aus der Newtonschen Bewegungsgleichung

$$\frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \frac{1}{m_i} \vec{F}_i. \quad (3.11)$$

Die Kraft, die auf ein Teilchen wirkt, ergibt sich aus dem Potential  $V$

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i}, \quad (3.12)$$

und damit

$$\frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = - \frac{1}{m_i} \left[ \frac{\partial V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i} \right]. \quad (3.13)$$

bzw. anders geschrieben gilt auch

$$\frac{\partial \vec{v}_i}{\partial t} = - \frac{1}{m_i} \left[ \frac{\partial V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i} \right]. \quad (3.14)$$

Nähert man nun die Ableitungen durch Division von Differenzen an

$$\frac{\partial \vec{v}_i}{\partial t} \approx \frac{\Delta \vec{v}_i}{\Delta t} = \frac{\vec{v}_i(t + \Delta t) - \vec{v}_i(t)}{\Delta t} \quad (3.15)$$

sowie

$$\frac{\partial \vec{r}_i}{\partial t} \approx \frac{\Delta \vec{r}_i}{\Delta t} = \frac{\vec{r}_i(t + \Delta t) - \vec{r}_i(t)}{\Delta t} \quad (3.16)$$

und setzt dies in die Gleichungen 3.14 und 3.9 ein, so ergibt sich das sogenannte Euler-Verfahren als

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i(t) - \frac{1}{m_i} \left[ \frac{\partial V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i} \right] \Delta t \quad (3.17)$$

und

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i + \vec{v}_i(t)\Delta t \quad (3.18)$$

Das Euler Verfahren kann also über das Potential  $V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$ , welches sich aus dem verwendeten Kraftfeld ergibt, für beliebige Startkoordinaten  $\vec{r}(t_0)$  und Startgeschwindigkeiten  $\vec{v}(t_0)$  die Positionen  $\vec{r}(t_1)$  und Geschwindigkeiten eines darauffolgenden Zeitpunktes  $t_1$  berechnen.

**Leap-Frog Algorithmus** Da die Fehler aus der einfachen Eulerschen Näherung nicht zu unterschätzen sind, wurden auch Integrationsverfahren höherer Ordnung entwickelt. Während in dem sehr einfachen Verfahren nach Euler die Ableitung durch einen Differenzenquotient ersetzt wird, wird in diesen Verfahren die Funktion durch mehrere Zwischenschritte im Integrationsintervall besser angenähert. In AMBER wird standardmäßig der *Leapfrog* Algorithmus verwendet. Geschwindigkeiten und Positionen werden dabei versetzt zueinander berechnet und „überspringen“ sich, wovon der Name abgeleitet wurde. Ausgehend von der Geschwindigkeit zu einem Zeitpunkt  $t - \frac{1}{2}\Delta t$  wird die Geschwindigkeit für einen Zeitpunkt berechnet, der ein halbes Zeitintervall weiter in der Zukunft liegt.

$$\begin{aligned} \vec{v}_i \left( t + \frac{1}{2}\Delta t \right) &= \vec{v}_i \left( t - \frac{1}{2}\Delta t \right) + \vec{a}_i(t)\Delta t \\ &= \vec{v}_i \left( t - \frac{1}{2}\Delta t \right) + \frac{1}{m_i} \left[ -\frac{\partial V(\vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_n(t))}{\partial \vec{r}_i} \right] \Delta t \end{aligned} \quad (3.19)$$

Die neue Position zum Zeitpunkt  $t + \Delta t$  wird dann ermittelt über

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i \left( t + \frac{1}{2}\Delta t \right) \Delta t. \quad (3.20)$$

Zu jedem beliebigen Zeitpunkt ergibt sich  $\vec{v}_i(t)$  als

$$\vec{v}_i(t) = \frac{1}{2} \left[ \vec{v}_i \left( t + \frac{1}{2}\Delta t \right) + \vec{v}_i \left( t - \frac{1}{2}\Delta t \right) \right] \quad (3.21)$$

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Geschwindigkeiten und Positionen in diesem Verfahren nie gleichzeitig bekannt sind. Dies hat zur Konsequenz, dass potentielle und kinetische Energie ebenfalls nie zur gleichen Zeit bekannt sein können und die exakte Gesamtenergie des Systems unbekannt ist [32].

**Wahl des Zeitschrittes** Es wird klar, dass der Zeitschritt der MD-Simulation von den schnellsten Bewegungen im System bestimmt wird. Es gilt

$$\Delta t \ll \nu_{max}^{-1}$$

Valenzschwingungen der Wasserstoffatome sind die höchstfrequenten Schwingungen im System. Fixiert man diese Bindungslängen mittels SHAKE [33], so können Zeitschritte von 1-2 fs zur hinreichenden Erfassung der interessanten Bewegungen im System gewählt werden.

**Particle Mesh Ewald Methode** Wie bereits geschildert, nimmt bei den elektrostatischen Wechselwirkungen die Bedeutung „weiter außen liegender“ Teilchen zu. Bei der Simulation ionischer Systeme müssen daher die Fehler, die sich beim Abbruch der Wechselwirkungen in der Elektrostatik ergeben, unbedingt korrigiert werden. Die älteste Methode dazu stammt aus dem Jahr 1921. Ewald entwickelte die Theorie, um die Energie ionischer Kristalle zu berechnen. Hintergrund der Ewald Methode ist die exakte Berechnung aller Wechselwirkungen eines Teilchens mit allen Teilchen der Originalbox sowie auch in jeder periodisch fortgesetzten Box.

$$V = \frac{1}{2} \sum_{|n|=0}^{\infty} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_{ij} + n|} \quad (3.22)$$

Die erste Summe darin geht über alle Boxen. In der Originalbox ( $n=0$ ) wird aber nicht die Wechselwirkung für  $i = j$  berechnet, da die Wechselwirkung des Teilchens mit sich selbst natürlich, aufgrund von  $r = 0$ , unendlich groß wäre. Die beiden anderen Summen gehen über alle Ladungen in der jeweiligen Box. Da jede Paarwechselwirkung doppelte Berücksichtigung findet, ist der Faktor  $1/2$  notwendig. Aufgrund extrem langsamer Konvergenz ist die Summe nicht direkt berechenbar. Daher wird nicht im Ortsraum, sondern im „reziproken Raum“ die Fouriertransformierte summiert. Da diskrete Summen nicht fouriertransformiert werden können, werden die Ladungen dafür durch Gaußfunktionen ersetzt. Die Summation der Fouriertransformierten konvergiert deutlich schneller.

**RESP Restrained Electrostatic Potential** Zur adäquaten Beschreibung nicht-kovalenter Wechselwirkungen ist es notwendig, geeignete atomare Partialladungen zu ermitteln. Dazu dienen die sogenannten RESP Verfahren [34, 35]. Dabei wird zunächst das elektrostatische Potential aus der Wellenfunktion des Moleküls an ausgewählten Punkten berechnet.

$$\Phi(r) = \Phi_{nucl}(r) + \Phi_{elec}(r) = \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|r - R_A|} - \int \frac{\rho(r')}{|r' - r|} dr \quad (3.23)$$

In der Formel beschreibt der erste Term die Kern-Elektronen-Anziehung, mit  $Z_A$  als Ladung der Atome und  $|r - R_A|$  als Abstand zwischen Elektronen und Kernen. Der zweite Term ist das Integral der Elektronendichte und beschreibt die Elektronen-Elektronen Abstoßung. Durch Wahl von Partialladungen wird nun versucht, dieses molekulare elektrostatische Potential auf  $N$  repräsentativen Punkten  $r_i$  um das Molekül wiederzugeben

$$\Phi_{calc}(r_i) = \sum_{j=1}^N \frac{q_j}{4\pi\epsilon_0 |r_j - r_i|} \quad (3.24)$$

und zwar nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, indem die Summe  $R$  der quadratischen Abweichungen des sich aus der Wellenfunktion an verschiedenen Punkten ergebenden elektrostatischen Potentials  $\Phi(r_i)$  und des sich durch die Wahl von Partialladungen an verschiedenen Punkten ergebenden elektrostatischen Potentials  $\Phi_{calc}(r_i)$  minimiert wird

$$R = \sum_{i=1}^N (\Phi(r_i) - \Phi_{calc}(r_i))^2 \quad (3.25)$$

unter der Nebenbedingung des Erhalts der Gesamtladung.

$$Z = \sum_{j=1}^N q_j \quad (3.26)$$

Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich nun in der Wahl der Referenzpunkte. Für die Berechnung der Wellenfunktion hat sich in der Hartree-Fock-Rechnung der Basissatz 6-31G(d) bewährt, der als Kompromiss zwischen Aufwand und Qualität des Ergebnisses gilt. Dieser Basissatz überschätzt die Dipolmomente im Vakuum gerade so, dass sich ein gutes Abbild der Dipolmomente im Wasser ergibt [36].

### 3.1.2 Gesteuerte Molekulardynamik-Simulationen („Steered Molekulardynamik-Simulationen“, SMD)

Biochemisch interessante Prozesse betreffen oft Übergänge von einem Zustand in einen anderen [37]. Die Beobachtung dieser ist mit klassischen Molekulardynamik-Simulationen schwierig, vielmehr wären extrem lange Simulationszeiten dafür notwendig, die rechnerisch schwer umsetzbar sind.

Gesteuerte Molekulardynamik-Simulationen (Steered Molekulardynamik-Simulationen, SMDs) sind eine Methode mit immenser Bedeutung für die Evaluation solcher konformationeller Änderungen, indem sie durch Einwirkung externer, artifizierlicher Kräfte das System entlang eines bestimmten Pfades zwingen [38]. Allerdings führen diese Kräfte auch dazu, dass sich das System aus dem Gleichgewichtszustand entfernt und die Auswertung unter diesem Gesichtspunkt erfolgen muss.

SMD ermöglicht somit den Erwerb eines genaueren Verständnisses für biochemisch interessante Mechanismen wie Ligandenbindung und -dissoziation oder Denaturierungsprozesse, indem entscheidene Details molekularer Interaktionen beobachtet werden können. Große Bewegungen werden in rechentechnisch sinnvollen Simulationsdauern erwirkt [39]. In diesem Sinne sind SMDs eine Ergänzung zur Atomkraftmikroskopie (AFM Atomic Force Microscopy).

Während andere gängige MD-Methoden (wie z.B. Umbrella Sampling) zur Beschreibung von Ligandenbindung und Ermittlung von Bindungsaffinitäten auf das Ideal der Reversibilität bauen, akzeptieren SMD-Studien die Irreversibilität des betrachteten Prozesses.

Sie erfordern daher im Gegensatz zu erstgenannten Methoden keine extrem langsam voranschreitenden Manipulationen. Das Konzept, dass keine thermodynamischen Daten aus irreversiblen Prozessen gewonnen werden können wurde von Jarzynski mit der nach ihm benannten Identität (siehe 3.27) widerlegt [40, 41].

$$\langle e^{(-W/k_bT)} \rangle = e^{(-\Delta F/k_bT)} \quad (3.27)$$

Diese Gleichung verknüpft die Ensemblemittelung des Exponenten der am System geleisteten Arbeit  $W$  des irreversiblen Prozesses mit der freien Energiedifferenz  $\Delta F$  zwischen den beiden Zuständen.

In dieser Art von MD-Simulationen wirkt eine konstante Kraft oder ein harmonisches Potential auf ein Atom oder eine Atomgruppe (per Definition als SMD Atom bezeichnet). Die Stärke des Potentials kann eingestellt werden [37].

Prinzipiell lassen sich zwei Arten der SMD unterscheiden:

1. **Constant Force (CF) Pulling:**

Zusätzlich zum Kraftfeld wirkt auf spezielle Atome (SMD Atom), die bewegt werden sollen, eine externe Kraft in eine definierte Richtung [42]. Diese Kraft liegt im Bereich zwischen zehn und mehreren tausend pN und bleibt über die Simulationsdauer konstant, unabhängig von Position und Geschwindigkeit der bewegten Atome.

2. **Constant Velocity (CV) Pulling:**

Ein Atom oder eine Gruppe von Atomen (SMD Atom) wird von einem harmonischen Potential im Raum gehalten und mit einer definierten Geschwindigkeit  $\vec{v}$  in eine bestimmte Richtung gezogen, die frei gewählt werden kann. Das SMD Atom wird auf diese Weise gezwungen, sich von seiner ursprünglichen Position weg zu bewegen und neue Kontakte mit der Umgebung einzugehen, die verfolgt werden können.

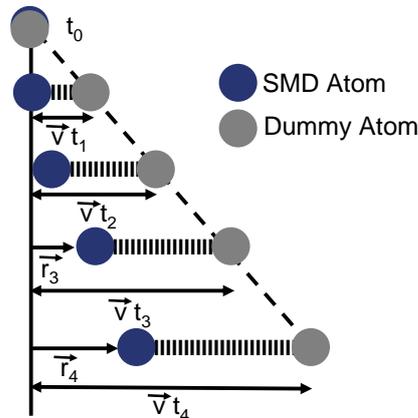


Abbildung 3.1: Prinzip der CV SMD im Eindimensionalen.

Abb. 3.1 zeigt das Prinzip der CV-SMD im Eindimensionalen. Ein Dummy Atom (blau) ist mit dem SMD Atom über eine virtuelle, harmonische Feder verbunden. Die Federkonstante kann frei gewählt werden. Sobald sich das Dummy Atom mit konstanter Geschwindigkeit in eine angegebene, definierbare Richtung bewegt, erfährt das SMD Atom eine Kraft, die linear von dem Abstand zwischen Dummy und SMD Atom abhängt. Bei Annahme einer einzigen Reaktionskoordinate  $x$  und eines externen Potentials

$$U = \frac{1}{2}k[v * t - (\vec{r} - \vec{r}_0) * \vec{n}]^2,$$

beträgt diese Kraft

$$\vec{F} = k(\vec{r}_0 + \vec{v}t - \vec{r}).$$

Dabei ist  $k$  die Federkonstante,  $\vec{r}_0$  die Ausgangsposition von der aus sich das Dummy Atom mit konstanter Geschwindigkeit  $\vec{v}$  bewegt.  $\vec{r}$  ist die aktuelle Position und  $\vec{n}$  der Einheitsvektor.

Die Wahl der Kraftkonstanten ist ein kritischer Punkt. Eine zu starre wie auch eine zu weich eingestellte Feder haben großen Einfluss auf das Resultat. Es gibt aber keine *a priori* Regel zu ihrer Festsetzung [43].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der CV SMD angewandt. Diese Methode ist für die Untersuchung großer Bewegungen eines Systems von einem Anfangs- in einen Endzustand geeignet, während die CF SMD über solche Veränderungen hinweg die Stabilität der konstanten Kraftrestraints nicht gewährleisten kann. Allerdings können die bei der CV SMD im Laufe des Übergangs resultierenden Kräfte stark fluktuieren [44, 45, 46].

## 3.2 Thermodynamische Integration - TI

Die Grundlage thermodynamischer Integrationsrechnungen bildet die statistische Thermodynamik. Eine zentrale Größe ist hierbei die Zustandssumme  $Z$ . Aus ihr lassen sich alle thermodynamischen Größen ableiten. In einem kanonischen Ensemble, welches der Realisierung aller möglichen Zustände eines Systems mit fester Teilchenanzahl  $N$  in einem festen Volumen  $V$  bei gegebener Temperatur entspricht, wird diese folgendermaßen ermittelt:

$$Z(\beta) = \sum_n e^{-\beta E_n} \quad (3.28)$$

In der genannten Gleichung beschreibt  $e^{-\beta E_n}$  mit  $\beta = 1/k_b T$  einen möglichen Zustand des Systems.  $k_b$  ist die Boltzmannkonstante und  $E_n$  der Energiewert des  $n$ -ten Eigenzustandes. Die kanonische Zustandssumme ist somit die Summe aller möglichen (Mikro)zustände und realisiert den Makrozustand des Systems. Ist die Teilchenzahl  $N$  groß genug, kann das System auch als kontinuierlich betrachtet werden und die Zustandssumme lässt sich als Zustandsintegral formulieren.

Die meisten freien Enthalpieberechnungsmethoden zielen darauf ab, einen Unterschied in der freien Enthalpie  $\Delta G$  zwischen zwei verschiedenen Gleichgewichtszuständen A und B zu

berechnen. Ein Anwendungsbeispiel ist die Berechnung relativer freier Bindungsenthalpien zweier ähnlicher Liganden an ein gemeinsames Rezeptorprotein.

Der freie Enthalpieunterschied zweier Zustände A und B ergibt sich über Zwanzig's Formel [47] als

$$\Delta G = G_B - G_A = -\beta^{-1} \ln Z = -k_b T \ln \langle e^{-\beta \Delta V} \rangle_A \quad (3.29)$$

Wichtig dabei ist, dass  $\langle \rangle_A$  ein im Bereich  $\Delta V = V_B - V_A$  durch eine MD-Simulation generiertes Ensemble unter Verwendung des Potentials  $V_A$  bezeichnet. Gleichung 3.29 nimmt an, dass das Sampling im Konfigurationsraum unter konstantem Druck und Temperatur im sogenannten isotherm-isobaren Ensemble ausgeführt wird, während das kanonische (N,V,T)-Ensemble zur Helmholtz-Energie  $\Delta A$  führen würde.

Ein wichtiges Problem bei freien Enthalpieberechnungen ist, dass durch eine MD-Simulation niemals der gesamte Konfigurationsraum des Systems zugänglich ist. Es werden vorwiegend Konfigurationen im niederenergetischen Bereich gesammelt. Gerade die hochenergetischen Konfigurationen sind jedoch wegen der Potentialfunktion im Exponenten der Zustandssumme von immenser Bedeutung. Aus diesem Grund ist die Ermittlung von Absolutwerten der freien Enthalpie nicht ohne weiteres aus MD-Trajektorien möglich. Daher werden wie in Formel 3.29 angedeutet, Differenzen der Freien Enthalpie betrachtet. Werden nämlich zwei chemisch nicht sehr unterschiedliche Systeme vergleichend betrachtet, ist davon auszugehen, dass sich auch die Verteilung ihrer hochenergetischen Konfigurationen nur wenig voneinander unterscheidet. Ihre niederenergetischen Konfigurationen sind nach wie vor durch MD-Simulation gut zugänglich. Anders formuliert ist das Hauptkriterium für die Anwendbarkeit von Gleichung 3.29, dass die zugänglichen Konfigurationen für  $V_A$  auch für  $V_B$  wahrscheinlich auftreten und die thermisch zugänglichen Regionen für beide Potentiale  $V_A$  und  $V_B$  eine signifikante Überlappung zeigen.

In der Praxis wird ein Pfad zwischen den beiden Zuständen A und B durch Einführung eines Satzes intermediärer Potentialfunktionen zwischen  $V_A$  und  $V_B$  definiert. Diese sind üblicherweise als Linearkombinationen der Potentialfunktionen des initialen (A) und finalen (B) Zustandes definiert:

$$V_m = (1 - \lambda_m)V_A + \lambda_m V_B \quad (3.30)$$

wobei  $\lambda_m$  von 0 bis 1 variiert wird und somit den Pfad in eine diskrete Anzahl von Schritten aufteilt ( $m=1, \dots, n$ ), die das System von Zustand A in Zustand B überführen. Jeder von diesen wird durch eine eigene Potentialfunktion beschrieben, die durch den Wert von  $\lambda$  definiert ist. Da die Freie Enthalpie eine Zustandsfunktion ist, ist jede beliebige Variation von A nach B erlaubt. Die freie Enthalpiedifferenz ist nur von Anfangs- und Endpunkt abhängig und nicht von dem Weg, wie dieser Übergang erreicht wird. Demgemäß ist jeder reversible Pfad erlaubt, der die beiden Zustände verknüpft.

Der Gesamtunterschied in der Freien Enthalpie kann nun durch Summation über die Zwischenzustände entlang  $\lambda$  ermittelt werden.

$$\Delta G = G_B - G_A = -k_b T \sum_{m=1}^{n-1} \ln \langle e^{[-\beta(V_{m+1}-V_m)]} \rangle_m \quad (3.31)$$

Durch Definition von  $\Delta\lambda_m = \lambda_{m+1} - \lambda_m$  und Kombination von Gleichungen 3.30 und 3.31 erhält man

$$\Delta G = G_B - G_A = -k_b T \sum_{m=1}^{n-1} \ln \langle e^{[-\beta\Delta V\Delta\lambda_m]} \rangle_m \quad (3.32)$$

$\Delta V$  ist, wie weiter oben definiert, die Differenz aus  $V_B$  und  $V_A$ . Daneben gilt aufgrund der hier aufgeführten Definition von  $V_m$  auch  $\Delta V = \partial V_m / \partial \lambda_m$ . Wird die Potentialdifferenz in Gleichung 3.31 als  $\Delta V = V_{m+1} - V_m = \frac{\partial V_m}{\partial \lambda_m} \Delta \lambda_m$  geschrieben, ergibt sich Gleichung 3.33, sofern die  $\lambda$ -Schritte genügend klein sind.

$$\Delta G = G_B - G_A = -k_b T \sum_{m=1}^{n-1} \ln \langle e^{[-\beta \frac{\partial V_m}{\partial \lambda_m} \Delta \lambda_m]} \rangle_m \quad (3.33)$$

Für kleine  $\lambda$ -Schritte kann die Gleichung auf folgende Art linearisiert werden.

$$\Delta G = \sum_{m=1}^{n-1} \langle \frac{\partial V_m}{\partial \lambda_m} \rangle_m \Delta \lambda_m \quad (3.34)$$

Geht  $\lambda$  gegen 0 wird die Summe durch ein Integral ersetzt:

$$\Delta G = \int_0^1 \langle \frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda} \rangle_\lambda d\lambda \quad (3.35)$$

Diese letztgenannte Formel stellt die zentrale Formel der thermodynamischen Integration dar, welche es erlaubt, die Freie Enthalpiedifferenz zu bestimmen. Da dieses Integral nicht analytisch berechnet werden kann, wird die Gauß-Quadratur herangezogen, die es erlaubt, die bei jedem  $\lambda$ -Wert erhaltenen

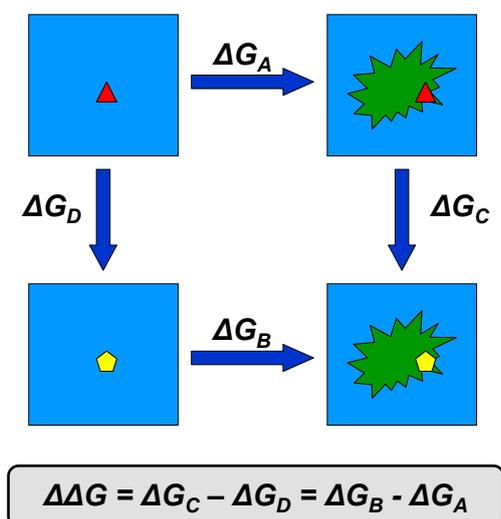
$$\frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda}$$

mit einem vorberechneten Koeffizienten zu gewichten und so durch folgende Summation den numerisch integrierten  $\Delta G$ -Wert zu erhalten.

$$\Delta G = \sum_i w_i \langle \frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda} \rangle_\lambda \quad (3.36)$$

### 3.2.1 Berechnung relativer freier Bindungsenthalpien

Die Herleitung der zentralen Formel thermodynamischer Integrationsrechnungen im vorangehenden Kapitel 3.2 erlaubt die Ermittlung von Differenzen in der Freien Enthalpie. Eine direkte Berechnung der Bindungsenthalpie eines Liganden an sein zugehöriges Protein ist im Rahmen der TI-Berechnungen innerhalb sinnvoller Simulationszeiten nicht möglich, da für diese Art der Berechnungen, wie bereits erwähnt, die Annahme gilt, dass sich die beiden Zustände nur geringfügig voneinander unterscheiden dürfen. Einen Ausweg liefert hier die Zuhilfenahme thermodynamischer Kreisprozesse. Damit lassen sich physikalisch sinnvolle, aber nicht in realistischer Zeit simulierbare Prozesse, wie die Ligandenbindung an ein Protein, durch innerhalb realistisch zugänglicher Simulationszeiten realisierbarer Prozesse simulieren. Eine schematische Darstellung eines solchen Kreisprozesses zeigt Abb. 3.2.



**Abbildung 3.2:** Thermodynamischer Kreisprozess zur Bestimmung relativer Bindungsaffinitäten.

Die vertikal dargestellten Transformationen sind dabei sogenannte „alchemische“ Transformationen, die allerdings unter Verwendung von TI-Berechnungen berechnet werden können, während die horizontal dargestellten Transformationen jene sind, deren Berechnung durch TI versagt bleibt. In dem hier dargestellten Fall handelt es sich um einen thermodynamischen Kreisprozess zur Bestimmung der relativen freien Bindungsenthalpie zweier Liganden an ein gegebenes Zielenzym. Die den horizontalen Transformationen zugehörigen  $\Delta G$ -Werte ( $\Delta G_A$  und  $\Delta G_B$ ) sind jene, die bei der Bindung des rot bzw. gelb dargestellten Liganden frei werden. Diese Werte sind experimentell zugänglich und ermöglichen somit einen direkten Vergleich ihrer Differenz, d.h. ihrer relativen Bindungsenthalpien, mit der theoretisch ermittelten aus den alchemischen Transformationen ( $\Delta G_C$  und  $\Delta G_D$ ).

Für diese wird die Transformation des rot dargestellten Liganden in den gelben jeweils in wässriger Lösung und in der Proteinumgebung simuliert.

Hintergrund ist die Tatsache, dass die Freie Enthalpie  $G$  eine Zustandsfunktion ist und ihr Wert somit derselbe ist, wenn Ausgangs- und Endzustand ident sind. Innerhalb des hier dargestellten Kreisprozesses bedeutet dies also

$$\Delta G_A + \Delta G_C - \Delta G_B - \Delta G_D = 0$$

Durch Umformen ergibt sich daraus:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_C - \Delta G_D = \Delta G_B - \Delta G_A$$

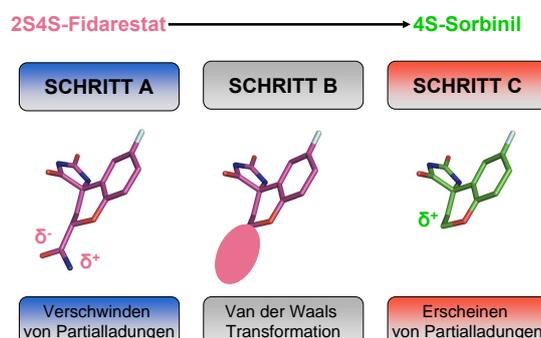
### 3.2.2 Methode der thermodynamischen Integration

Wie im vorangegangenen Kapitel 3.2.1 erklärt, ist die Berechnung relativer freier Bindungsenthalpien über die Ermittlung individueller  $\Delta G$ -Werte möglich. Diese besitzen für sich allein keinerlei physikalische Bedeutung, nur ihre Differenzen erlauben eine Abschätzung der relativen Enthalpien. Die Ermittlung eines solchen  $\Delta G$ -Wertes gliedert sich in drei Schritte, welche auch in Abb. 3.3 beispielhaft für die Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil dargestellt sind und in dieser Art in Kapitel 8 von Relevanz ist:

**Schritt A:** Entfernen der Partialladungen

**Schritt B:** Van der Waals Transformation

**Schritt C:** Hinzufügen der Partialladungen



**Abbildung 3.3:** Aufteilung der Transformation im Zuge der Thermodynamischen Integration in 3 Schritte am Beispiel der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil: *Schritt A:* Entfernen der Partialladungen an zu verändernden (verschwindenden) Atomen; *Schritt B:* Van der Waals Transformation; *Schritt C:* Hinzufügen der Partialladungen an den in Schritt B generierten Atomen.

**Schritt A** besteht somit in einer Beseitigung der Partialladungen an den zu verändernden bzw. verschwindenden Atomen (in diesem Falle der Transformation der exocyclischen Carboxamidgruppe). In **Schritt B** wird die van der Waals Transformation unter Verwendung von Soft-Core Potentials vorgenommen. Dabei werden die van der Waals Parameter der ineinander zu mutierenden Atome geändert. Der Gebrauch von Soft-Core Potentials stellt eine Möglichkeit dar, das bei TI-Berechnungen auftretende Endpunkt-Singularitätsproblem zu vermeiden. Dieses führt zu enormen abstoßenden Kräften (Term  $1/r^{12}$  im Lennard-Jones Potential), wenn im Zuge der zu vollziehenden Transformation das Erscheinen von Atomen zu sterischen Clashes mit ihrer Umgebung führt. Die Soft-Core Potentiale stellen demgemäß ein modifiziertes Lennard-Jones Potential (siehe Gleichung 3.37) dar, durch welches der  $1/r^{12}$ -Term als Funktion von  $\lambda$  langsam abgeschaltet wird: [48].

$$V_{Soft-Core} = 4\epsilon(1 - \lambda) \left[ \frac{1}{\left[ \alpha\lambda + \left(\frac{r_{ij}}{\sigma}\right)^6 \right]^2} - \frac{1}{\alpha\lambda + \left(\frac{r_{ij}}{\sigma}\right)^6} \right] \quad (3.37)$$

$\sigma$  ist darin der Abstand, an dem das Lennard-Jones-Potential eine Nullstelle besitzt, also  $V_{Soft-Core} = 0$  gilt. Dabei gilt folgender Zusammenhang mit dem in 3.1 beschriebenen Minimumsabstand  $r_m$  zweier Teilchen  $r_m = 2^{1/6}\sigma$ .  $\epsilon$  ist die Tiefe der Potentialmulde,  $r_{ij}$  der Abstand zweier Teilchen  $i$  und  $j$  und  $\lambda$  der in 3.2 beschriebene Wert zwischen 0 und 1 zur Potentialdefinition.  $\alpha$  ist eine variierbare Konstante und wird auf 0,5 gesetzt.

Im Zuge von **Schritt C** erscheinen die Partialladungen der nun neu erzeugten Atome. Durch die Aufteilung in diese drei Schritte werden Instabilitäten in der Simulation vermieden, die sich bei der Abnahme der van der Waals Interaktionen zwischen einem Atom mit

einer Ladung ungleich 0 und seiner Umgebung ergeben würden. Jeder dieser drei Schritte wird bei verschiedenen  $\lambda$ -Werten simuliert, die ein bestimmtes Potential definieren und welche nacheinander den Übergang vom Anfangs- in den Endzustand beschreiben. Die Transformation ist somit vollständig vollzogen und muss zum Erhalt eines Wertes von  $\Delta\Delta G$  sowohl in wässriger Lösung als auch in der Proteinumgebung durchgeführt werden.

# 4 Modellsysteme

## 4.1 Aldose Reduktase

### 4.1.1 Aldo-Keto-Reduktasen Superfamilie

Aldo-Keto-Reduktasen bilden eine der drei großen Enzym-Superfamilien, in welche die Vielzahl der Oxidoreduktasen unterteilt werden können [49]. Allgemein formuliert katalysieren sie Redoxreaktionen an Substraten, die in Biosynthese, Stoffwechsel und Detoxifikation eine Rolle spielen. Als erster beschrieb der belgische Biochemiker und Physiologe Henri-Géri Hers in seinem 1956 erschienenen Artikel „The mechanism of transformation of glucose to fructose by the seminal vesicles“ das Prinzip der Enthalpiegewinnung in Spermatozoen durch die Umwandlung von Blutglukose in Fruktose [50] durch das Enzym Aldose Reduktase ALR2 (zur Unterscheidung des in dieser Arbeit untersuchten Androgenrezeptors AR wird die Bezeichnung ALR2 verwendet). Diese Veröffentlichung war neben der Erstbeschreibung der ALR2 zugleich auch die erste Abhandlung über den sogenannten Polyol-Stoffwechselweg, welcher vom Organismus im Zuge des Abbaus überschüssiger Glukose beschritten wird und auf den in Unterkapitel (4.1.4.1) näher eingegangen wird.

In den letzten 50 Jahren wurden Studien einer Vielzahl weiterer Enzyme publiziert, die mit ihrer Aminosäuresequenz, genomischen Organisation und Substratspezifität [51] sehr große Ähnlichkeiten untereinander und mit der ALR2 aufweisen. Die Gesamtheit all dieser Enzyme umfasst die große Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen (AKR). Inzwischen werden in ihr 160 Mitglieder zusammengefasst [52], die in 14 Klassen unterteilt werden [53], AKR 1-14. Zudem gibt es noch eine Unterteilung in diverse Unterklassen je nach Sequenzidentität. Das Enzym ALR2 gehört zur Unterklasse AKR1B.

Die Enzymfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen weist ein ubiquitäres Verbreitungsmuster auf. So exprimieren nicht nur Vertebraten, sondern auch Pflanzen, Protozoen, Pilze, Eubakterien und Archebakterien einige ihrer Vertreter [54]. Aus diesem Grund liegt die Schlussfolgerung nahe, dass es sich um eine sehr früh in der Evolutionsgeschichte aufgekommene Genfamilie handelt [55].

Allen Aldo-Keto-Reduktasen gemeinsam ist ihre Existenz als monomere Proteine, die ca. 320 Aminosäuren lang sind und deren katalytische Aktivität von der Anwesenheit eines Nikotinamidkofaktors abhängig ist, der an einer charakteristischen Stelle bindet. Diese Bindestelle ist selbst dann noch zwischen verschiedenen Vertretern der Superfamilie ähnlich, wenn deren Sequenzidentität weniger als 30% beträgt [56]. Auch das aktive Zentrum ist bzgl. Struktur und Sequenz hochkonserviert. Allerdings kann über die gesamte Superfamilie ein breites Spektrum an verschiedenen Molekülklassen, wie z. B. Aldehyde, Monosacchari-

de, Steroide, Prostaglandine, polyzyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe sowie auch Isoflavonoide gebunden und umgesetzt werden [57, 58, 59, 60]. Die Substratspezifität wird vermutlich neben den Aminosäuren in unmittelbarer Nachbarschaft des aktiven Zentrums auch durch Aminosäuren in drei Loopbereichen am C-terminalen Ende erreicht [56]. Generell zeigt ein Vergleich der Aminosäurereste an der Substratbindestelle, dass es Bereiche gibt, die hochkonserviert sind, wie etwa die Aminosäuren im und nahe dem aktiven Zentrum, während größere Variationen in Loopabschnitten möglich sind.

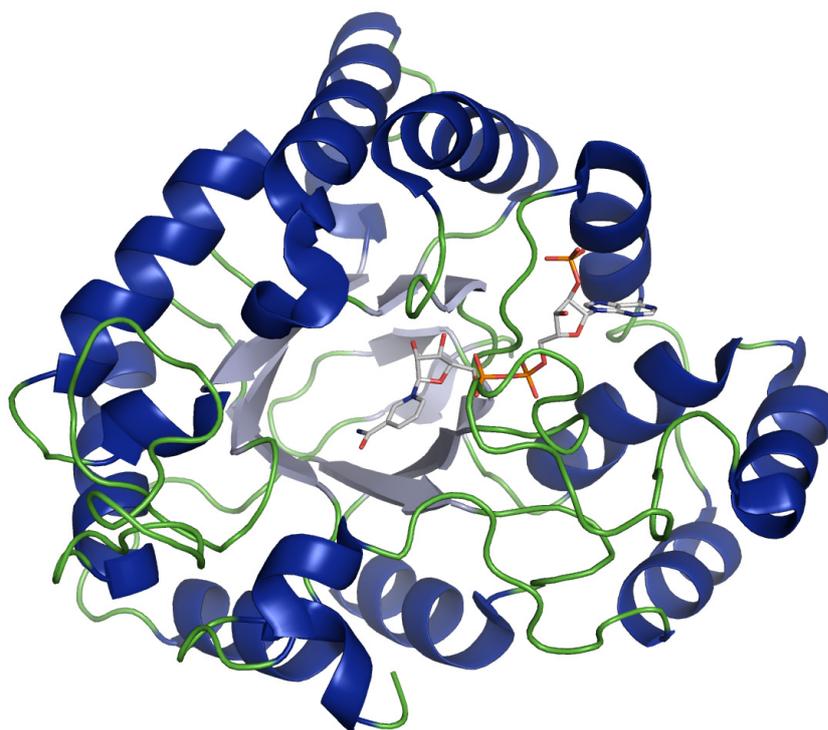
Allen AKRs gemeinsam ist aber eine typische Tertiärstruktur, die als TIM-Barrel Faltungsmuster bekannt ist. Dieser  $(\alpha/\beta)_8$  Fold ist charakterisiert durch 8 parallele  $\beta$ -Stränge, die sich mit  $\alpha$ -Helices abwechseln, welche allerdings antiparallel zu den  $\beta$ -Strängen verlaufen. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktion sind zahlreiche Säugetier-AKRs als potentielle Zielenzyme im pharmazeutischen Wirkstoffdesign interessant. Darüber hinaus spielt die Enzymfamilie wegen ihres breiten Spektrums an möglichen Substratklassen eine immer wichtigere Rolle in der Detoxifikationsphase II vieler Pharmazeutika und Xenobiotika. Ein fundiertes Verständnis des Zusammenhanges von Struktur und Funktion ist unabdinglich für ein gezieltes Design neuer Wirkstoffe mit gewünschter Spezifität und klinischer Effizienz.

#### 4.1.2 Struktur der Aldose Reduktase - Flexibilität der Bindetasche

Das Enzym ALR2 (EC-Nummer 1.1.1.21, AKR1B1, ALR2 oder AR) wurde, wie bereits erwähnt, erstmalig von Hers im Jahre 1956 beschrieben [50]. Seitdem erschienen viele weitere Studien zu dem Enzym, die zu dessen Charakterisierung beitrugen und auf eine Erklärung von Funktion und Inhibition abzielten. Es handelt sich um ein 315 Aminosäuren langes, cytoplasmatisches und monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa [61, 62]. Die Aufklärung der Primärstruktur erfolgte im Jahre 1987 aus Rattenlinsen [63, 64]. Die Sequenzierung aus weiteren Spezies [65] zeigte eine Sequenzidentität von 82-85% [66]. Ein weiterer und entscheidender Punkt hinsichtlich eines zunehmenden strukturellen und mechanistischen Verständnisses war dabei die Auflösung der Kristallstruktur im Jahre 1992 [67]. Aus Linsen des Schweineauges gelang es, das Apoenzym in Abwesenheit des Kofaktors NADPH zu kristallisieren. Dabei wurde allerdings das Kofaktor-Analogon ADPRP mitkomplexiert. Im selben Jahr erschien auch eine Veröffentlichung zur Kristallstruktur des humanen Holoenzym mit gebundenem Kofaktor [68]. Der Vergleich mit dieser sowie einer weiteren 1992 veröffentlichten humanen Mutanten-Struktur (Cys298Ser) [69] ließ erkennen, dass die An- bzw. Abwesenheit des Kofaktors NADPH zu einer starken konformativen Änderung in einem Loopbereich zwischen Ser 214 und Ser 226 führt. NADPH wird nämlich von den Aminosäureresten in diesem Loop-Bereich in seiner Position in der Bindestelle gehalten, weshalb dieser auch den treffenden Namen „safety-belt“ erhielt. Die Aufnahme und Freisetzung des Kofaktors im Zuge der Umsetzung des Substrates geht mit einer eindeutigen Bewegung des Loops zwischen einer geschlossenen und offenen Konformation des Enzyms einher. In Kapitel 6 wird darauf noch weiter eingegangen. Der Übergang des Loopbereiches von der kofaktorgebundenen in die kofaktorfremde Form wird mit SMD-Studien analysiert und stellt einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

Im Laufe der Jahre wurden viele weitere Strukturen gesammelt. Die RSCB Protein Daten-

bank PDB [70] zählt zur Zeit 99 Einträge zur ALR2 (Stand September 2010). Die Gesamtstruktur der ALR2 bleibt dabei immer gleich. Ihre Tertiärstruktur ist eine Faltung analog zur Triosephosphatisomerase, weshalb man auch bei ihr von einem  $\alpha/\beta$ -TIM-Barrel Strukturmotiv spricht. Das menschliche ALR2 Holoenzym ist in Abb. 4.1) im Cartoon-Modus dargestellt.

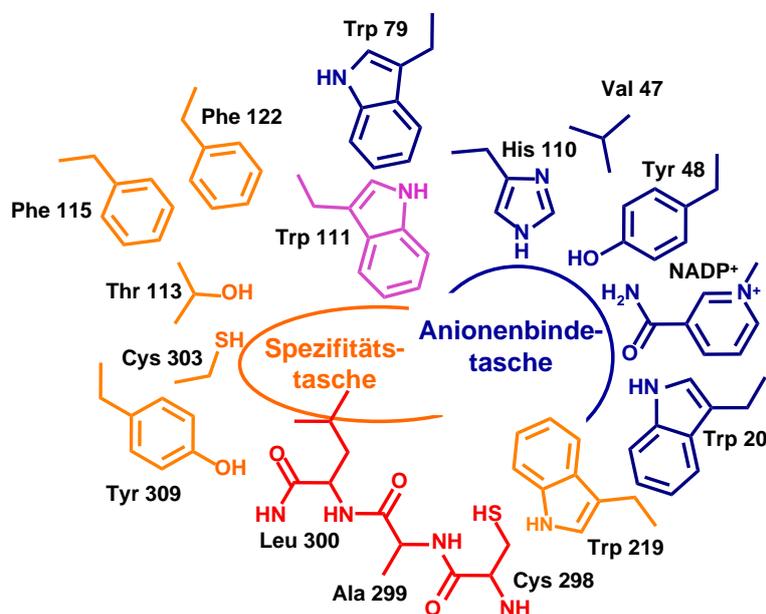


**Abbildung 4.1:** Cartoon Darstellung des  $(\alpha/\beta)_8$ -TIM-barrel Strukturmotivs der ALR2: Acht  $\alpha$ -Helices (dunkelblau) umgeben einen Kern von  $\beta$ -Faltblättern (grau) und sind durch Loopbereiche (grün) voneinander abgetrennt. Der Kofaktor NADPH ist als Stabmodell abgebildet.

Acht parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter (grau) bilden mit ihren Seitenketten einen dicht gepackten, hydrophoben, inneren Kern. Dieser wird von acht antiparallel dazu verlaufenden  $\alpha$ -Helices (dunkelblau) umschlossen. Wie bei den meisten Enzymen mit diesem Faltungsmuster wird das aktive Zentrum von den Resten aufgebaut, welche die  $\beta$ -Stränge mit den darauffolgenden  $\alpha$ -Helices verbinden [71]. Die Bindetasche ist somit von Aminosäuren der Loopregionen (grün in Abb. 4.1) aufgebaut, während das übergeordnete Faltnotiv die stabile Struktur für die katalytische Reaktion aufrecht erhält. Bei der ALR2 befindet sich das

aktive Zentrum am C-Terminus [72, 73, 74, 75, 76]. Zwei kurze, antiparallele  $\beta$ -Stränge nahe dem N-Terminus schließen das innere Fass ab, während auf der gegenüberliegenden Seite drei lange Loopbereiche die Bindetasche partiell bedecken. Außerhalb des Kerns liegen zwei zusätzliche  $\alpha$ -Helices. Der Kofaktor NADP<sup>+</sup> bindet in gestreckter Konformation am Boden des katalytischen Zentrums und begrenzt es somit auf einer Seite. Sein Nikotinamid-Teil kommt dabei zentral in der fassartigen Struktur zu liegen. Die Bindetasche an sich ist von 15 Aminosäuren aufgebaut, wovon 8 von aromatischer, 3 von unpolarer bzw. neutraler und 4 von polarer Natur sind. Wie bereits geschildert, existieren sehr viele sehr gut aufgelöste Röntgenkristallstrukturen zur ALR2. Eine vergleichende Analyse dieser [77] gab weitere Aufschlüsse über Besonderheiten der Bindetasche. Sie kann je nach Grad der Flexibilität der jeweiligen Reste in zwei Bereiche unterteilt werden, die als Anionen-Bindetasche und Spezifitätstasche bezeichnet werden.

Erstere umfasst die drei für die Katalyse unmittelbar wichtigen Reste Tyr 48, His 110 und Trp 111 sowie den Kofaktor [78]. Daneben gehören auch Trp 20, Val 47 und Trp 79 dazu, die sich als vergleichsweise starr in ihrer Position in der Bindetasche in verschiedenen Kristallstrukturen erwiesen haben. Dieser Teil der Bindetasche wird üblicherweise von hydrophilen und negativ geladenen Bausteinen der diversen Inhibitoren adressiert. Der gegenüberliegende Teil der Bindetasche (Spezifitätstasche) kann unterschiedliche Konformationen einnehmen, was durch die ausgesprochene Rezeptorflexibilität der ALR2 bedingt ist und von Größe und Eigenschaften der Liganden induziert wird [79, 80]. Es handelt sich also um eine induzierte Anpassung („induced-fit“), wobei die Spezifitätstasche entweder in der geschlossenen oder offenen Konformation vorliegen kann. Ein Bereich der Spezifitätstasche zeigt einen überaus hohen Grad an Flexibilität, weshalb er in Abbildung 4.2 rot dargestellt ist, während die anderen Reste dieser Untertasche in orange abgebildet sind. Bei den besonders flexiblen Resten dieser Untertasche handelt es sich um Cys 298, Ala 299 und Leu 300.



**Abbildung 4.2:** 2D-Darstellung der Bindetasche der ALR2: Die Farbkodierung richtet sich nach dem Maß der Flexibilität der einzelnen Aminosäuren; blau bedeutet wenig flexibel, rot stark flexibel.

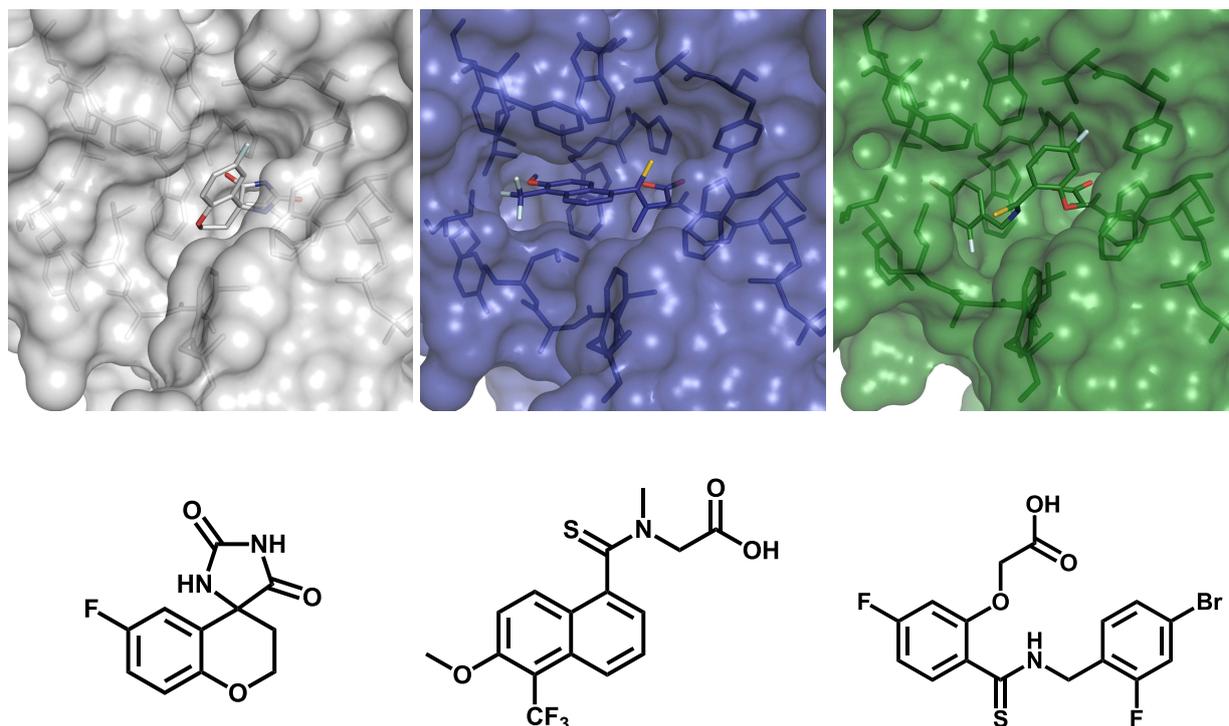
Ein Öffnen und Schließen der Spezifitätstasche wird dabei von Leu 300 bewerkstelligt, ein „gate-keeper“, dessen relative Position zu Trp 111 die Subtaschenkonformation bestimmt. Der Indol-Stickstoff wechselwirkt mit der polaren Kopfgruppe des Liganden über eine H-Brücke und hält so den Inhibitor in der Anionenbindetasche. Gleichzeitig werden hydrophobe Interaktionen zwischen dem aromatischen Ring von Trp 111 und dem hydrophoben Teil des Liganden ausgebildet, der in die Spezifitätstasche reicht. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang der stark hydrophobe Charakter der Bindetasche, der sich in einem aus mehreren Aromaten aufgebautem Grundgerüst der bekannten ALR2-Inhibitoren widerspiegelt. Auf die bisher entdeckten/entwickelten Inhibitoren wird in dem Unterkapitel 4.1.5 eingegangen.

Erste Spekulationen über verschiedene Formen der Spezifitätstasche ergaben bereits ein Vergleich der Kristallstrukturen der humanen ALR2 im Komplex mit Zopolrestat [80] (PDB-Eintrag 1mar) und Sorbinil [78] (PDB-Eintrag 1ah0). Der Inhibitor Sorbinil besetzte ausschließlich die Anionenbindetasche und führte nicht zu einer zusätzlichen Öffnung der Spezifitätstasche. Diese ersten Beobachtungen in den 1990er Jahren wiesen darauf hin, dass unterschiedliche chemische Strukturen mit dem Protein in unterschiedlichen Konformationen wechselwirken können. Der Rezeptor darf daher nicht als ein starres Gebilde angesehen werden, denn er besitzt ausgesprochene Flexibilität in seiner Tertiärstruktur [81].

Dass die bisher publizierten und kristallisierten Strukturen nur einen Teil des möglichen Konformationsraumes abdecken, ist sehr wahrscheinlich, und diese Hypothese wird auch durch die röntgenkristallografisch ermittelte Struktur eines Liganden einer beschriebenen

Reihe von Naphthoisthiazol-essigsäurederivaten [3] im Komplex mit der ALR2 bekräftigt. Dabei zeigte sich erstmalig eine noch nie beobachtete Erweiterung der Bindetasche im Bereich von Trp 20. Durch eine Rotation des Indolringes um den  $\chi_2$  Winkel entsteht eine völlig neue Untertasche [27] und führt zu weiteren Änderungen in unmittelbarer Umgebung der Bindetasche, die Lys 21 betreffen, welches im Gegensatz zu allen anderen Kristallstrukturen, um sterische Behinderungem mit dem rotierten Trp zu verhindern, keine H-Brücke zum Kofaktor NADP<sup>+</sup> ausbildet, sondern ins Solvens zeigt. Eine nähere Untersuchung dieser Struktur anhand von MD-Simulationen ist ein Ziel dieser Doktorarbeit und wird daher ab Unterkapitel 5.4 detaillierter beschrieben.

Aus dem Beschriebenen wird aber klar ersichtlich, dass es bei Bindung verschiedener Liganden an die ALR2 zu einer Anpassung der Geometrie der Bindetasche kommt (induced-fit). Der polare Molekülteil bindet dabei in die Anionen-Bindetasche, die aus Aminosäuren aufgebaut ist, welche räumlich konserviert sind, die Katalyse bewerkstelligen und somit in allen bekannten Kristallstrukturen nahezu ident ausgeprägt sind. Eine Ausnahme hiervon bildet nur das beschriebene Naphthoisthiazol-essigsäurederivat, bei dessen Bindung Trp 20 als Teil der Anionenbindetasche rotiert. Die Spezifitätstasche adaptiert sich in ihrer Geometrie an den hydrophoben Teil des Inhibitors, sodass drei Bindetaschen-Hauptkonformationen unterschieden werden können, die in Abb. 4.3 einander im Vergleich gegenübergestellt sind.



**Abbildung 4.3:** Vergleich der drei Hauptkonformationen der Bindetasche der ALR2 mit dem jeweiligen Liganden als Stabmodell und darunter als Strukturformel: **Links:** Komplex mit Sorbinil (1ah0); **Mitte:** Komplex mit Tolrestat (1ah3), **Rechts:** Komplex mit IDD594 (1us0); alle Darstellungen erfolgten aus derselben Perspektive.

Während durch die Positionierung von Leu 300 bei der Bindung von Sorbinil die Spezifitätstasche unzugänglich bleibt, führt ein Umklappen dieses Restes bei der Bindung von Tolrestat zu einer Öffnung derselben. Beide Inhibitoren zeigen aber ähnliche Bindungsmuster in der katalytischen Tasche auf. Das Hydantoin Sorbinil ist ein relativ kleiner, kompakter Inhibitor, wohingegen das größere Molekül Tolrestat bis in die Spezifitätstasche reicht und dort eine edge-to-face stacking-Wechselwirkung zwischen seinem Naphthylteil und dem Indolring von Trp 111 ausbildet. Dieser spezielle Bindemodus wurde bislang nur im Tolrestat-Fall beobachtet.

Die Kristallstruktur der ALR2 im Komplex mit IDD594 zeigt ebenfalls eine offene Spezifitätstasche, allerdings treten hier Unterschiede im Bindungsmodus des unpolaren aromatischen Molekülteils auf, weshalb dies die dritte Hauptkonformation darstellt. Hier kommt es nämlich zu einer face-to-face stacking-Wechselwirkung zwischen dem terminalen Halogensubstituierten aromatischen Ring und dem Indolteil von Trp 111, wobei der Phenylring des Liganden zwischen diesem letztgenannten und der Leu 300 Seitenkette zu liegen kommt. Diese dritte Hauptform der Bindetasche stellt mit kleineren Adaptionen in der Orientierung von Ala 299 und Leu 300 die am häufigsten auftretende dar. So binden auch Zopolrestat,

Minalrestat und Zenarestat an diese Konformation der Bindetasche. Die Ermittlung der Kristallstruktur mit IDD594 war darüber hinaus bei einer Auflösung von 0,66 Å möglich, wodurch Rückschlüsse über Protonierungszustände möglich waren [73].

Enzyme sind dynamische Systeme: ALR2 ist ein sehr gutes Beispiel für ein Enzym mit ausgesprochener Rezeptorflexibilität, welches verdeutlicht, wie wichtig es ist, diese inhärente Eigenschaft im rationalen Wirkstoffdesign miteinfließen zu lassen. Molekulardynamik-Simulationen bieten dabei eine Möglichkeit den Konformationsraum eines Proteins zu analysieren und seine Flexibilität näher zu untersuchen. Dabei wäre es sehr wünschenswert und hilfreich, aus dem Verhalten im Verlaufe einer Simulation und dabei auftretenden Konformationen auf weitere potentiell einnehmbare Bindemodi schließen zu können.

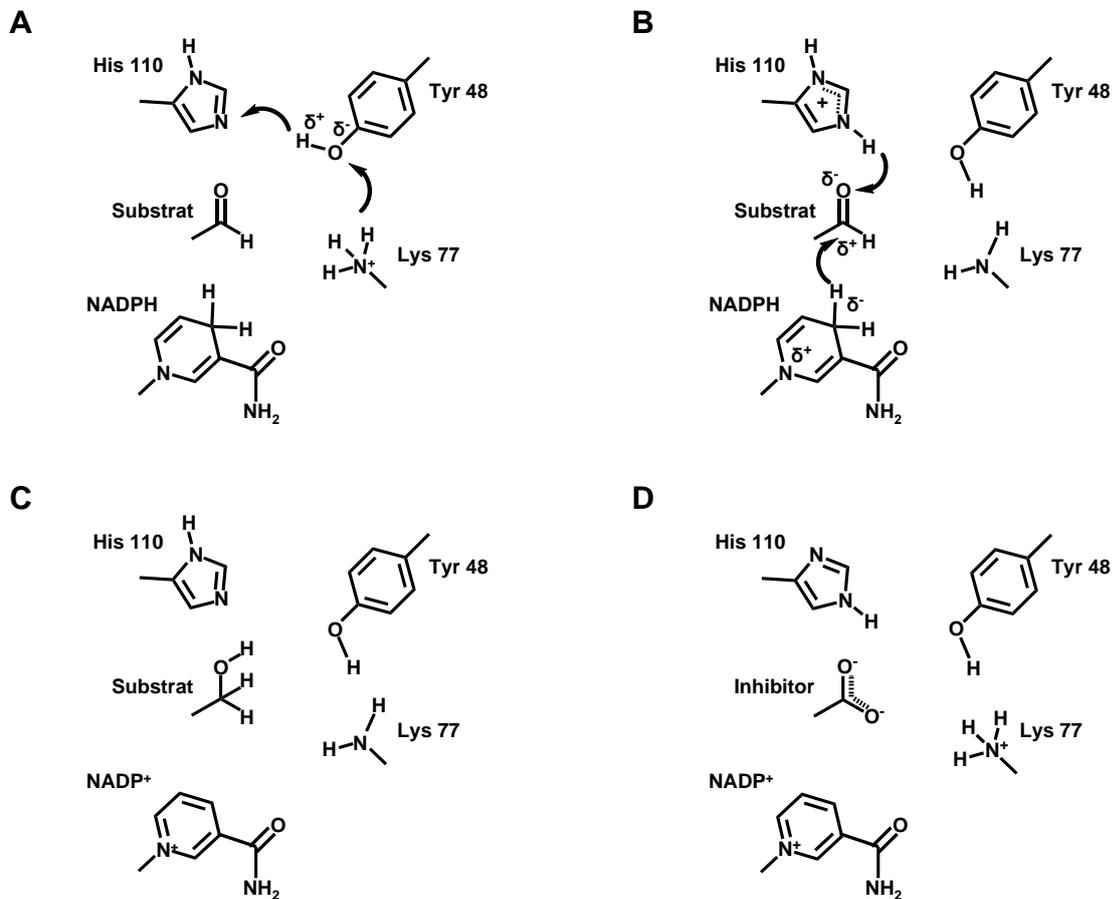
### 4.1.3 Kinetik und Mechanismus der Aldose Reduktase

Das Enzym ALR2 reduziert seiner Aufgabe nach verschiedenste Aldehyde zu den entsprechenden Alkoholen. Im sogenannten Polyolstoffwechselweg katalysiert das Enzym unter Mithilfe des Kofaktors NADPH die Umwandlung von Glukose zu Sorbitol, welches anschließend von der Sorbitol Dehydrogenase (SDH) zu Fruktose oxidiert wird. In der Reaktionsfolge ist die Oxidation zur Fruktose der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sodass sich Sorbitol akkumuliert [82, 83]. Für den Ablauf der Reaktion bindet dabei zunächst der Kofaktor NADPH an die ALR2. Ein binärer Komplex wird gebildet, wobei es zu einer größeren Bewegung im sogenannten „Sicherheitsgurt“ („safety-belt“) kommt, welcher von Aminosäure Ser 214 bis Ser 226 reicht und einen Übergang von einer offenen, Kofaktorungebundenen, zu einer geschlossenen, Kofaktor-gebundenen Tertiärstruktur beschreibt. Dieser als Kofaktoraustausch beschriebene Schritt ist dabei geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtkatalyse der ALR2 und geht mit einer Ausbildung von Wasserstoff- und Salzbrücken sowie Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen NADPH und dem Enzym einher [56, 67, 84]. Im Anschluss an die Bindung des Kofaktors tief im Inneren des ALR2-Fasses erfolgt die Aufnahme des Liganden unter Bildung eines ternären Komplexes. Zwischen dem Substrat und den Resten des katalytischen Zentrums, Tyr 48, His 110 und Trp 111, werden H-Brückenbindungen ausgebildet. Tyr 48 und His 110 wechselwirken mit dem Carbonylsauerstoffatom der Aldehydfunktion, während Trp 111 mit einer eventuell vorliegenden 2-Hydroxylfunktion (bei Zuckern) eine H-Brücke eingeht [85, 86]. Der hochaufgelöste IDD594-ALR2-NADP<sup>+</sup>-Komplex zeigt, dass Tyr 48, His 110 und Trp 111 neutral sind und die elektrostatische Wechselwirkung somit im Wesentlichen zwischen Inhibitor und oxidiertem Kofaktor stattfindet [87]. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass nach einer Mutation von His 110 zu Alanin Alrestatin immer noch an das Enzym bindet [88]. Im Gegensatz dazu kann Alrestatin, nachdem Tyr 48 zu His mutiert wurde, nicht mehr binden, was auf eine für die Ligandenbindung essentielle H-Brücke über das Sauerstoffatom von Tyr 48 schließen lässt.

Der Hydridtransfer erfolgt vom C4-Atom des Nikotinamidteils des Kofaktors NADPH zum Carbonyl-Kohlenstoff des Substrates, welches eine Reduktion vom Aldehyd in das entspre-

chende Alkoholat erfährt. Zur Vervollständigung der Reaktion muss noch ein Proton vom Alkoholat aufgenommen werden. Die Quelle dieses Protons ist noch umstritten. Drei Aminosäuren im aktiven Zentrum erscheinen aufgrund ihrer Distanz als mögliche Donoren: Tyr 48, His 110 und Trp 111. Kinetische sowie auch computergestützte Methoden lassen aber vermuten, dass Tyr 48 diese Aufgabe übernimmt und als erster Protonendonator fungiert, His 110 kommt eine Aufgabe als Protonenüberträger zu [89, 90]. Lys 77 ist indirekt an der Übertragung beteiligt, indem es die Hydroxygruppe von Tyr 48 polarisiert und nach erfolgter Protonenübertragung von Tyr 48 zu His 110 selbst Tyr 48 protoniert. Eine Mutation von Lys 77 zu einem ungeladenen Methionin führt zu einem starken Aktivitätsverlust des Enzyms [91]. Thermodynamische Untersuchungen der Inhibitorbindung ergaben eine starke Modulation des pKa Wertes von Tyr 48 durch den Oxidationszustand des Kofaktors und die Ligandenbindung. Daher wird vermutet, dass Tyr 48 eine Bedeutung als Säure-Base-Katalysator zukommt [87].

Nach erfolgter Reduktion wird  $\text{NADP}^+$  unter erneuter Konformationsänderung des Enzyms frei gegeben. Damit ein weiterer Katalysezyklus durchlaufen werden kann, muss ein Kofaktormolekül in seiner reduzierten Form erneut als NADPH aufgenommen werden. Eine schematische Darstellung des Ablaufs beim Reaktionsmechanismus zeigt Abb. 4.4.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus' der ALR2 [86]: **A:** Eine H-Brückenbindung zwischen Tyr 48 und His 110 liegt in dem nativen ALR2-NADPH-Komplex vor, ein Proton wandert von Lys 77 zu Tyr 48; **B:** Ein Alkoholat wird durch den Hydridtransfer ausgehend von NADPH gebildet, dieses stabilisiert das positiv geladene His 110, dann erfolgt ausgehend von dort der Protonentransfer; **C:** Die positive Ladung liegt nach Ablauf der Reaktion am Kofaktor vor; **D:** Darstellung der Bindung eines typischen Carbonsäure-Inhibitors, die geladene Carboxylat-Gruppe ahmt die Wechselwirkung zwischen Alkoholat und His 110 nach.

Dieser aufgeschlüsselte Katalysemechanismus wirft die Frage auf, welchen Einfluss ALR2-Inhibitoren darauf haben. Inhibitoren mit Carbonsäurefunktionalität hemmen die Reduktion nichtkompetitiv. Die Ursache dafür liegt aber nicht in einer Besetzung einer alternativen Bindestelle [92], sondern in der Tatsache, dass die Bindung der Inhibitoren im aktiven Zentrum erst nach der Katalyse erfolgt, d. h. nachdem das umgesetzte Substrat die Bindestelle verlassen hat. Daher erfolgt ihre Bindung an den ALR2-NADP<sup>+</sup>-Komplex, während Substrate an den ALR2-NADPH-Komplex binden. Die rückwärtsgerichtete Reaktion, welche in einer Oxidation von Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden ausgehend vom ALR2-

NADP<sup>+</sup>-Komplex besteht, wird tatsächlich kompetitiv durch solche Inhibitoren gehemmt [93, 94, 95].

#### 4.1.4 Physiologische Bedeutung der Aldose Reduktase

Wie bereits erwähnt, ist die ALR2 für die Reduktion eines Aldehydes zum entsprechenden Alkohol verantwortlich. Dabei dient NADPH als Kofaktor und Hydrid-Donor. Die Substrate des Enzyms sind von verschiedenartiger Struktur und in Tabelle 4.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.1:** Substrate der humanen ALR2, ihre  $K_m$ -Werte ( $[\mu\text{M}]/[\text{mM}]$ ) und Bedeutung im Stoffwechsel [96].

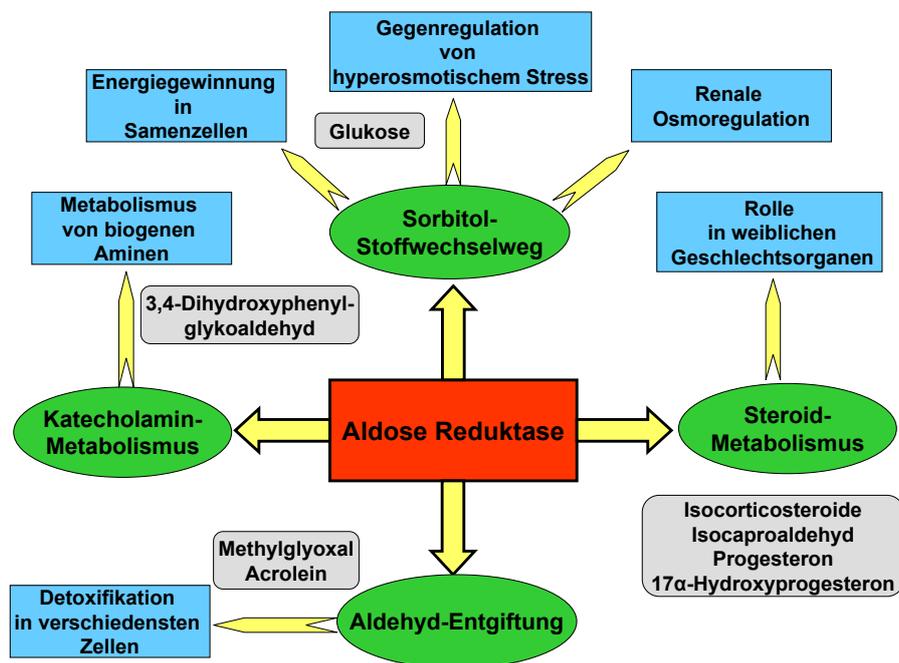
Substrat	$K_m$	Bedeutung
Isocapronaldehyd	$\leq 1\mu\text{M}$ [97]	Produkt der Seitenketten-Abspaltung von Cholesterol
Isocorticosteroide	$\leq 1\mu\text{M}$ [98]	Intermediate im Katabolismus von Corticosteroiden
Biogene Aldehyde	6,4-870 $\mu\text{M}$ [99]	Aus dem Metabolismus von Katecholaminen und Serotonin[100]
Methylglyoxal	7,9 $\mu\text{M}$ [101]	Toxisches Produkt: a) nicht-enzymatisch aus Triosephosphat, b) enzymatisch aus dem Aceton/Hydroxyaceton-Metabolismus
4-Hydroxynonenal	20-30 $\mu\text{M}$ [102]	Reaktives Aldehyd; aus dem oxidativen Abbau ungesättigter Fettsäuren
17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	20-30 $\mu\text{M}$ [103]	Vorstufe der Androgene, Estrogene und Glucocorticoide
Acrolein	40-80 $\mu\text{M}$ [104]	Aus Lipid-Peroxidation; metabolisches Nebenprodukt von Cyclophosphamid
3-Desoxyglucoson	40-80 $\mu\text{M}$ [105]	Abspaltungsprodukt von nicht-enzymatisch glykosylierten Proteinen; potenter Cross-Linker von Proteinen
Glukose	70 mM [106]	Energiestoffwechsel

Eine Verteilung der ALR2 in den verschiedenen humanen Gewebearten [107, 108, 109, 110] ist in Abb. 4.5 in einer Übersicht dargestellt. Die Niere weist die höchste Konzentration an dem Enzym auf [111].

Gewebetyp	Proteinkonzentration [µg/mg]
Inneres Nierenmark	29
Ischiasnerv	5
Linsen	3
Hoden, Herz	2
Kornea	1
Leber, Nierenrinde, Magen, Milz, Lunge, Darm	0,4 – 0,8
Nebenniere, Aorta, Gehirn, Muskulatur, Plazenta	> 0 (nachweisbar)

**Abbildung 4.5:** Konzentration der humanen ALR2 in den verschiedenen Geweben [107].

Die physiologische Funktion der ALR2 ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Ausgehend von ihren Substraten und ihrer Verteilung kann man aber auf diese schließen. Eine grafische Übersicht über die wichtigsten physiologischen Aufgaben der ALR2 gibt Abb. 4.6. Wichtig dabei erscheint ihre Rolle in der Elimination von Aldehyden, die unter Bedingungen von oxidativem Stress in Zellen gebildet werden, wie z. B. 4-Hydroxynonenal und Methylglyoxal. Darüber hinaus besitzt sie zweifelsohne immense Bedeutung im Sorbitol-Stoffwechselweg. Auf diesen wird daher auch in den folgenden Abschnitten näher eingegangen. Sorbitol ist ein organischer Osmolyt und beeinflusst als solcher den osmotischen Druck während der Antidiurese [112, 113, 114, 115]. Unter hyperosmotischem Stress wird ALR2 verstärkt exprimiert [116, 117, 118], weswegen man davon ausgehen kann, dass die ALR2 eine wichtige osmoregulatorische Funktion übernimmt. ALR2 nimmt aber auch an der Verstoffwechslung von Umweltgiften [104] und pharmazeutischer Wirkstoffe [119] teil.



**Abbildung 4.6:** Physiologische Funktion der ALR2 (hellblaue Kästen) und deren Substrate (graue Kästen).

Ein Verständnis der Komplexität in der physiologischen Bedeutung des Enzyms ist zur Abschätzung von Nebenwirkungen einer Inhibition sehr wünschenswert. Zu bedenken ist allerdings auch, dass verwandte Enzyme wie die Aldehyd-Reduktase oder die Aldehyd-Dehydrogenase beispielsweise an dem Aldehyd-Stoffwechselweg beteiligt sind und somit die Aufgabe der ALR2 teilweise übernehmen könnten.

#### 4.1.4.1 Sorbitol-Stoffwechselweg und metabolische Auswirkungen

Unter normoglykämischen Bedingungen wird die zelluläre Glukose normalerweise über das Enzym Hexokinase (EC 2.7.1.1) zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert, welches anschließend glykolytisch wird oder über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird.

Bei erhöhten Blutglukose-Werten, wie sie etwa bei an Diabetes mellitus erkrankten Menschen vorliegen, wird nun bis zu einem Drittel der Glukose in den Sorbitol-Stoffwechselweg eingeschleust [120, 121]. Die Hexokinase ist im Falle der Hyperglykämie in Zellen mit insulinunabhängiger Glukoseaufnahme nämlich abgesättigt und der Glukose-Umsatz erfolgt anderweitig. In diesem Sorbitol-Stoffwechselweg wird nun zunächst Glukose durch die ALR2 unter Verbrauch von NADPH zu Sorbitol reduziert und in einem zweiten Schritt durch die Sorbitol Dehydrogenase (SDH) unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  zur Fruktose reoxidiert. Somit wird über diesen Stoffwechselweg Glukose zu Fruktose und NADPH zu NADH umgesetzt. Abb. 4.7 stellt den normoglykämischen Glukoseabbau den beiden Schritten aus dem Sorbitol-Stoffwechselweg gegenüber.

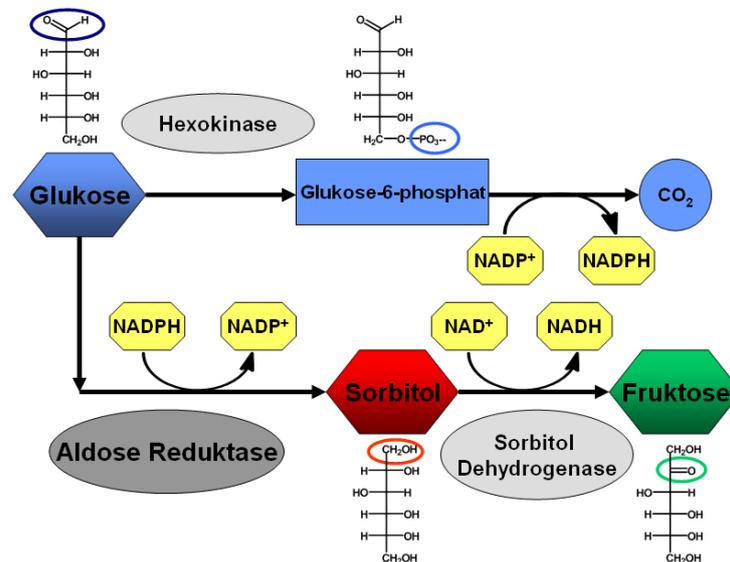


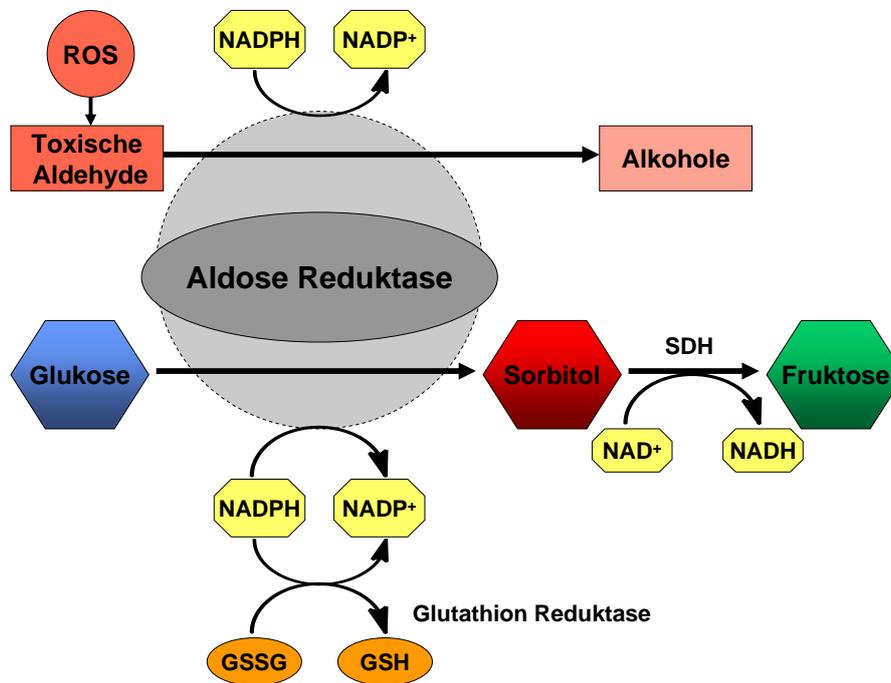
Abbildung 4.7: Glukose-Abbau und Sorbitol-Stoffwechselweg.

ALR2 besitzt an sich eine geringe Affinität zur Glukose ( $K_m=70\text{mM}$  [106]). Daher ist ihre Beteiligung am Glukose-Abbau unter Normoglykämie vernachlässigbar klein. Sobald die Glukosekonzentration aber erhöht ist, fließt diese vermehrt in den Sorbitol-Stoffwechselweg, was dazu führt, dass die daraus hervorgehenden Stoffwechselprodukte akkumuliert werden. Als Folge einer Akkumulation von Sorbitol in den Zellen steigt der osmotische Druck darin an. Das polare Abbauprodukt Sorbitol kann die Zellen nur schwer verlassen. Sein weiterer Abbau durch die SDH erfolgt langsamer als seine Neubildung, was zu einer vermehrten Konzentrationserhöhung führt. In der Folge nehmen die Zellen vermehrt Wasser auf und der osmotische Druck steigt. Dieser Vorgang gilt als primärer Grund bei der Schädigung der Augenlinsen als diabetische Folgeerscheinung [122, 123, 124]. Bei allen anderen Spätschäden sind in den Zellen mit insulinunabhängiger Glukoseaufnahme vielseitige Veränderungen metabolischer Natur als Ursache anzusehen.

Ein wesentlicher Punkt für das Auftreten von Diabetes-Spätschäden ist neben der genannten Entstehung von „osmotischem Stress“ die Auslösung von sogenanntem „oxidativem Stress“. Dieser ist darauf zurückzuführen, dass eine gesteigerte ALR2-Aktivität zu einer Verminderung der NADPH-Konzentration führt. NADPH wirkt in den Zellen allerdings auch als Kofaktor der Glutathion Reduktase (GRed), die für eine Elimination reaktiver Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) verantwortlich ist.

Im zweiten Schritt des Sorbitol-Stoffwechselweges entsteht durch Oxidation NADH aus NAD<sup>+</sup>. NADH ist seinerseits das Substrat der NADH Oxidase, welche wiederum ROS produziert [125].

Die folgende Abbildung 4.8 unterstreicht das Gesagte:



**Abbildung 4.8:** Schema zur Entstehung von oxidativem Stress.

Die im zweiten Schritt des behandelten Stoffwechselweges angehäufte Fruktose trägt über die nicht-enzymatische Glykosylierung und die daraus resultierenden Glykosylierungs-Produkte zum oxidativen Stress in Zellen bei.

Ein gesteigerter Glukose-Abbau über den Sorbitol-Stoffwechselweg aktiviert zudem die p38-MAP Kinase, was zu Einschränkungen in der Nervenreizleitung und damit zur Neuropathie führt [126].

Ein weiterer wesentlicher Punkt in der Entstehung der Folgeschäden des Diabetes mellitus ist die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC). Bei erhöhtem Blutzuckerspiegel steigt in vielen Geweben auch die Diacylglycerol-Konzentration. Diacylglycerol (DAG) aktiviert schließlich die PKC [127]. Vermutlich kann PKC aber auch durch oxidativen Stress aktiviert werden [132]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Inhibition der ALR2 eine erhöhte PKC-Aktivität vermeidet [128, 129, 130], vermutlich aus dem Grund, dass Fruktose-Metaboliten Vorstufen von DAG sind [132]. Die gesteigerte PKC-Aktivität führt zu vermehrter Zellproliferation in Blutgefäßen und damit zur Entstehung von Arteriosklerose. 74-80% der Erwachsenen mit Diabetes sterben an Komplikationen in Folge arteriosklerotischer Erkrankungen [133, 134].

Zielgewebe der Diabetes-Spätschäden sind entsprechend der Verteilung der ALR2 im menschlichen Körper (siehe Abb. 4.5): Augenlinsen [135], Retina [136], Arterienwände [137], periphere Nerven und Rückenmark [138].

In Abbildung 4.9 sind (ergänzend zur Übersicht in Tabelle 4.2) die Verknüpfungspunkte



Aktivierung des DAG/PKC-Stoffwechselweges	Aktivierung von PKC durch DAG → Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen mit vielfältigen Funktionen in Signaltransduktion → vaskuläre Dysfunktionen [144, 145, 146, 147, 148]
Nicht-enzymatische Glykosylierung	Verschiedene Makromoleküle im Gewebe → AGEs → Querverbindung von Matrixproteinen → Verdickung der Gefäß-Basalmembranen → Verfestigung des Kollagens [149, 150]
Oxidativer Stress	NADPH↓ Glutathion-Reduktase↓, NO-Synthase↓ [151, 152]

Zudem ist die Regulation der ALR2-Aktivität beeinflussbar durch posttranslationale Modifikationen [157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165]. Die wichtigsten sind dabei Nitrosylierung (durch Nitroverbindungen) und Glutathionylierung (durch Nitrosothiole). Modifikationen betreffen Cys 298 im aktiven Zentrum, das demgemäß als Modulator der Enzymaktivität gilt. Studien haben eine Abhängigkeit der kinetischen ALR2-Parameter bei Anwesenheit reduzierender/oxidierender Reagenzien gezeigt [166, 167]. In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen liegt das Enzym S-thioliert (inaktiv) oder S-nitrosyliert (aktiv) vor. Unter physiologischen Bedingungen wird in Zellen, in denen Glutathion vorliegt, der parakrine Effekt von NO durch Nitrosothiole vermittelt, weshalb die vorherrschende Form von Cys 298-Modifikation *in vivo* die Glutathionylierung ist, was zu einer Inaktivierung führt. Somit wurde gezeigt, dass Stickstoffmonoxid NO eine ALR2-Aktivierung inhibiert [168]. NO ist somit der physiologische Regulator der ALR2-Aktivität [169, 170]. Da Hyperglykämie mit einer verminderten NO-Entstehung einhergeht, ist der Verlust der NO-vermittelten Unterdrückung der ALR2-Aktivität ein bedeutender Faktor für die Aktivierung des Sorbitol-Stoffwechselweges.

Sobald NADPH gebunden ist, ist Cys 298 weniger für oxidative Modifikationen zugänglich. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität des Kofaktors zu dem Enzym liegt der Großteil komplexiert vor. Ein Kofaktoraustausch und damit eine Regulation der ALR2-Aktivität durch Seitenkettenmodifikation von Cys 298 ist aber folglich nur bei hoher Substratkonzentration möglich, wenn die katalysierte Reaktion tatsächlich stattfinden kann und die NO-Synthase-Aktivität geringer ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ALR2 in engem Zusammenhang mit der Entwicklung der Diabetes-Folgeschäden steht. Eine Inhibition der ALR2 stellt somit einen möglichen Therapieansatz zu deren Prävention dar, da dadurch eine Akkumulation von Sorbitol mit all den damit verbundenen negativen pathologischen Faktoren verhindert wird. Die Suche nach Inhibitoren ist daher Gegenstand aktueller Forschung. Tatsächlich weisen *in vivo* und *in vitro* Modellstudien zur Regulation der ALR2-Enzymaktivität unter erhöhten Glukosekonzentrationen einen positiven Effekt bzgl. Vermeidung von Folgeschäden auf [171, 172].

### 4.1.5 Inhibitoren der Aldose Reduktase

Nachdem die Bedeutung der ALR2 im Zusammenhang mit Spätfolgen des Diabetes mellitus bekannt wurde, wurde gezielt nach entsprechenden ALR2 Inhibitoren (ARIs) als potentielle pharmazeutische Wirkstoffe im Kampf gegen diabetische Folgeerscheinungen gesucht. Bereits 1965 wurden erste Inhibitoren vorgestellt. Die untersuchten C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>-Ketosäuren zeigten eine Hemmung der ALR2 in Kälberlinsen [173]. Seitdem wurden viele weitere strukturell unterschiedliche ARIs entwickelt, die *in vitro* Wirkung aufwiesen. Nach ihrer Struktur lassen sich diverse Klassen der Hemmstoffe unterscheiden [174, 175, 176]:

- Carbonäurederivate
- Zyklische Imide (Hydantoine)
- Phenolische Verbindungen
- Pyridazinone
- Phenylsulfonylnitromethan Derivate
- Strukturell unterschiedliche ARIs aus natürlichen Quellen.

In den folgenden Abschnitten werden die ersten drei Klassen näher erläutert, bevor Bemerkungen zur Entwicklung von Inhibitoren das Unterkapitel abschließen. Nummerierte und hervorgehobene Verbindungen sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

#### 4.1.5.1 Carbonsäurederivate

Einige Aldehyd-Substrate (z.B. Glykoaldehyd) können ALR2 hemmen. Der Austausch der Aldehyd-Funktion durch eine Carbonsäure-Funktion führte zu interessanten Resultaten in der Entwicklung von ARIs, da diese von dem Enzym nicht reduziert werden können. Wie bereits beschrieben, fielen 1965 erstmals aliphatische Fettsäuren als ALR2-Hemmstoffe auf [173]. Im Jahre 1968 fiel **Tetramethylenglutarsäure**<sup>1</sup> als ALR-Hemmer in Hasenlinsen auf [177]. Allerdings wies die Verbindung ein schlechtes Membran-Penetrationsverhalten auf. Daher wurde weitere fünf Jahre später **Alrestatin**<sup>2</sup> (AY-22,284) als Leitstruktur für Inhibitoren mit Carbonsäurefunktionalität entwickelt [178]. Alrestatin war der erste Inhibitor, der den Einzug in klinische Studien schaffte [179]. Alrestatin ist oral verfügbar und nachweislich präventiv bei diabetes-assoziierten Symptomen in Galaktose-Ratten sowie bei Neuropathie gezeichneten Diabetes-Patienten wirksam [180]. Viele weitere Carbonsäure-Derivate wurden in den darauffolgenden Jahren entwickelt, welche zu einem Großteil ein Arylessigsäure-Strukturelement besitzen und über einen Linker mit einem lipophilen Molekülteil verbunden sind, was kongruent ist mit den Verhältnissen in der ALR2-Bindetasche. Hervorzuheben sind dabei die folgenden kurz einzeln beschriebenen Inhibitoren: **Tolrestat**<sup>3</sup>, **Ponalrestat**<sup>4</sup>, **Zenarestat**<sup>5</sup>, **Zopolrestat**<sup>6</sup> und **Epalrestat**<sup>7</sup>. **Tolrestat**<sup>3</sup> schaffte es 1989 auf den Arzneimittelmarkt in mehreren Länder, darunter Italien [181], da es in klinischen Studien in der Prävention und der Verbesserung von Symptomen der diabetischen autonomen Neuropathie sich als wirksam erwies [182]. Sieben Jahre

später erfolgte aber bereits wieder die Rücknahme, da Tolrestat in der Bestätigung seiner Effizienz versagte [183] und zu Schädigungen der Leber führte [184].

Durch den Einsatz von **Ponalrestat**<sup>4</sup> in Diabetes-Ratten konnte ein Anstieg der Sorbitolkonzentration und ein Abfall des Myoinositol-Spiegels verhindert werden [185]. Daneben zeigte eine 18-monatige Studie an 259 Diabetes-Patienten eine Verlangsamung im Fortschreiten der diabetischen autonomen, aber nicht der peripheren Neuropathie [186]. Die klinischen Nebenwirkungen waren nicht signifikant. In einer 12-monatigen randomisierten Kontrollstudie schlug die Ponalrestat-Wirkung an Patienten mit chronisch symptomatischer Neuropathie allerdings fehl. Ponalrestat vermag nicht in ausreichender Menge in die menschlichen Nervenzellen zu gelangen [187].

Bei Verabreichung von **Zenarestat**<sup>5</sup> zeigte sich in einer 52-wöchigen klinischen Studie eine Verbesserung der Leitungsgeschwindigkeit in Nerven mit gleichzeitiger Senkung der Sorbitol-Konzentration um mindestens 80% [188]. Die Verbindung wurde im Jahre 2001 aber aus Phase III der klinischen Studien zurückgezogen wegen toxischer Nebenwirkungen, die nicht akzeptabel waren [188].

**Zopolrestat**<sup>6</sup> wies in Diabetes-Ratten eine Verminderung der Proteinurie sowie Albuminurie auf. Außerdem wurde eine Verminderung der Tendenz zur Kataraktentstehung festgestellt [189]. Es erreichte Phase II klinischer Studien [190]. Allerdings wurden die Ergebnisse niemals veröffentlicht und weitere Untersuchungen wurden gestoppt.

1992 schaffte es das von Ono entwickelte **Epalrestat**<sup>7</sup> als Kinedak<sup>®</sup> zur Behandlung von diabetischen peripheren Neuropathien auf den japanischen Markt. Mittlerweile ist es auch auf dem bangladesischen (Aldorin<sup>®</sup>) und indischen Markt (Aldonil<sup>®</sup>) erhältlich. Es handelt sich um ein Molekül mit 2-Thioxo-4-thiazolidinon- (oder Rhodanin-) Gerüst. Mehrere Studien untermauerten die Nützlichkeit von Epalrestat im Kampf gegen Spätfolgen des Diabetes [191, 192, 193, 194]. Es wird auch vermutet, dass Epalrestat die endotheliale Proteinkinase C hemmt und die endotheliale NO-Produktion stimuliert und somit den glukose-vermittelten vaskulären Diabeteskomplikationen entgegenwirkt [195].

### 4.1.5.2 Zyklische Imide

Im Jahre 1978 wurde von Pfizer **Sorbinil**<sup>8</sup> entdeckt, ein Inhibitor mit Spirohydantoin Grundgerüst [196]. Sein C4-S-Enantiomer ist für seine Aktivität nahezu ausschließlich verantwortlich. Dies zeigten Struktur-Wirkungsbeziehungen und eine theoretische Studie mit dem nachfolgend synthetisierten und vielversprechenden Ranirestat (AS-3210) [197]. Viele Studien mit Sorbinil zeigten bei Patienten mit Komplikationen, die auf ihre Diabetes-Erkrankung zurückzuführen waren, keine signifikanten Besserungen [198]. Außerdem traten in den ersten Wochen der Verabreichung von Sorbinil vermehrt hypersensible Reaktionen auf, welche durch ein toxisches Zwischenprodukt, das beim Metabolismus von Sorbinil entsteht, ausgelöst werden. Sorbinil erreichte daher nie den Pharmamarkt [199, 200]. Der Chromanbestandteil von Sorbinil sowie seine Hydantointeilstruktur erfuhren weitere Strukturvariationen. So versuchte man den Chromanrest durch Isochinolinon (**Minalrestat**<sup>9</sup>, in Phase III in den USA) [201, 202], Fluoren (**Imirestat**<sup>10</sup>) [203], Indol oder Benzofuryl-

sulfonyl (**M16209**, **M16287**<sup>11</sup>) [204] zu ersetzen. Der Hydantointeil wurde in ein Thiazolidindion, Succinimid (**ADN-138**<sup>12</sup>, **Ranirestat**<sup>13</sup>) [205] oder Thiohydantoin abgewandelt, wobei zum Teil die Spirostruktur beibehalten wurde. Diese als Bioisostere konzipierten Moleküle sollten das Problem der bei Sorbinil-Zufuhr festgestellten Hypersensibilität umgehen. 2,4-Thiazolidindione (Glitazone) wie z.B. **Risarestat**<sup>14</sup> zeigen neben ihrer Inhibition der ALR2 auch eine antioxidative [206] und antihyperglykämische Wirkung [207]. Die zuletzt genannte ist darauf zurückzuführen, dass sie auf einen Zellkern-Rezeptor (PPAR, Peroxisome Proliferator Activated Receptor) wirken, der die Transkription von Genen reguliert, welche an Glukose- und Fettstoffwechsel beteiligt sind. Die Empfindlichkeit gegenüber Insulin wird gesteigert, da sich in Leber-, Fett- und Muskelzellen die Anzahl der Insulinrezeptoren erhöht [208, 209]. Als „Insulin-Sensitizer“ (**Pioglitazon**, Actos® & **Rosiglitazon**, Avandia®) sind sie auf dem deutschen Markt erhältlich.

**Fidarestat**<sup>15</sup> ist ebenfalls ein Vertreter der zyklischen Imide. Strukturell besitzt es gegenüber Sorbinil nur eine zusätzliche Carboxamidgruppe an der 2-Position des Chromanringes. Allerdings ist es zehnmal wirksamer. Präklinische Studien wiesen positive Effekte für die Sorbitolanreicherung auf (auch in Erythrocyten) [210, 211, 212]. Daneben wurde einem Fortschreiten der diabetischen Neuropathie [213] und der diabetischen Retinopathie entgegengewirkt [214]. Neuere Studien erkannten im renalen Kortex von Streptococin-Diabetes-Ratten und in humanen mesangialen Zellen, die hohen Glukose-Konzentrationen ausgesetzt waren, bei Behandlung mit Fidarestat eine Hemmung der Bildung von nitrosativem Stress und der PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase)-Aktivierung [215, 216]. Bedeutende Nebenwirkungen sind nicht bekannt, was vermutlich auf eine hohe Selektivität für die ALR2 zurückzuführen ist [217, 218]. Fidarestat befindet sich in Phase III (Japan) bzw. Phase II (USA) klinischer Studien.

**Ranirestat**<sup>13</sup> befindet sich in Phase IIb in Japan und in Phase III in Kanada, EU und den USA. Eine kanadische, 52-wöchige Doppelblindstudie mit 549 Patienten, die diabetische sensorimotorische Polyneuropathie (DSP) zeigten, erreichte eine Besserung dieser, aber keine statistisch signifikante Änderung der sensorischen Nervenfunktion [219].

### 4.1.5.3 Phenolische Verbindungen

Unter den phenolischen Verbindungen haben sich bestimmte Flavonoide, **Quercetin**<sup>16</sup>, Quercitrin und Myricitrin, als potente Inhibitoren der ALR2 erwiesen. Erstmals wurde 1975 davon berichtet [220]. Synthetisch hergestellte Polyphenole (von Quercetin abgeleitet als Benzopyrane [221], Chalcone [222, 223] und Isoflavone [224]) wurden neben natürlichen Flavonoiden in den weiteren Jahren getestet. Ergänzend wurden Überlegungen zu den strukturellen Anforderungen an Flavonoide zur Inhibition aufgestellt, die zeigen, dass eine Hydroxygruppe in der 7-Position des A-Ringes bzw. eine Katecholeinheit am B-Ring des Grundgerüsts für eine erhöhte Aktivität sorgen [225]. Struktur-Wirkungs-Beziehungen bewerten die Anwesenheit hydrophober Substituenten am A-Ring und hydrophiler Substituenten am B-Ring des Flavonoid-Grundgerüsts insgesamt als günstig [226]. Diese *in silico* gewonnenen Erkenntnisse werden in Zukunft zum Design neuer ALR2-Inhibitoren herangezogen werden.

### 4.1.5.4 Bemerkungen

Das Enzym ALR2 ist aufgrund seiner pathologischen Aktivität ein Schlüsselenzym in der Entwicklung diabetischer Spätfolgen und stellt daher ein interessantes Zielenzym der Wirkstoffentwicklung dar [227, 228].

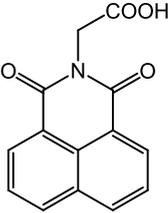
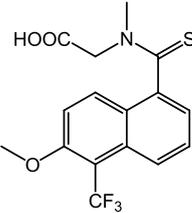
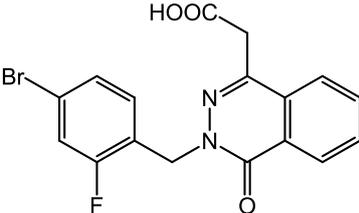
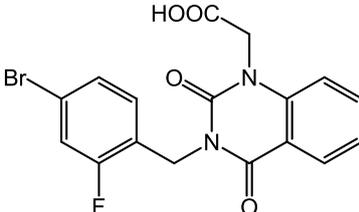
Wie geschildert inkludieren aber einige zur ALR2-Inhibitoren konzipierte Verbindungen toxische Nebenwirkungen. Diese sind wahrscheinlich auf Wechselwirkungen mit anderen Enzymen zurückzuführen. Eine Möglichkeit, diese zu minimieren, stellt eine höhere Spezifität für die Aldose Reduktase im Vergleich zur verwandten Aldehyd Reduktase (ALR1) dar, die eine 65%ige Sequenzidentität besitzt [229, 230, 26]. Die Aldehyd Reduktase reduziert Aldehyde, die ihren Ursprung in oxidativem Stress haben (z.B. 3-Deoxyglukoson, Methylglyoxal), in die entsprechenden, nicht-reaktiven Alkohole [231]. Ihre Aktivität ist daher bei Bedingungen besonders wichtig, wie sie bei Diabetes-Erkrankungen auftreten. Die Aminosäuren der Spezifitätstasche sind zwischen ALR1 und ALR2 nicht konserviert und daher Anhaltspunkt zur Entwicklung von Inhibitoren mit geringeren Nebenwirkungen. Der Großteil der Inhibitoren wird eingeteilt in Carbonsäuren oder Hydantoine. Daneben gibt es die beschriebenen phenolischen Verbindungen, aber auch nitromethylsulfonierte Aryle [232, 233] Aminosäuren [234, 235] und weitere Inhibitoren isoliert aus natürlichen Quellen [236, 237, 238, 239].

Neben der Vermeidung von Nebenwirkungen ist für den Erfolg eines Inhibitors auch sein pharmakokinetisches Verhalten ausschlaggebend. Carbonsäuren und Hydantoine zeigen eine vergleichbare *in vitro* Aktivität, während erstere aufgrund ihres niedrigeren pKa-Wertes eine kleinere *in vivo* Aktivität besitzen. Carbonsäuren liegen bei physiologischem pH-Wert nämlich deprotoniert vor, weshalb die Durchdringung biologischer Membranen erschwert ist [240, 241].

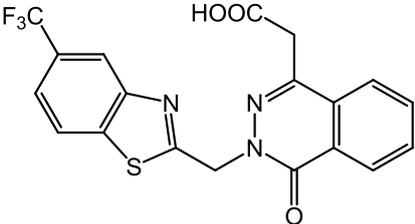
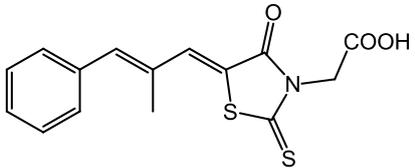
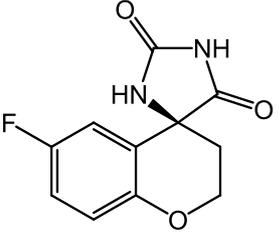
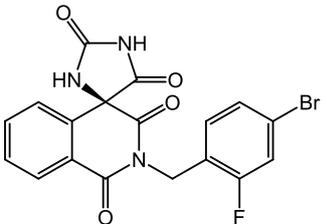
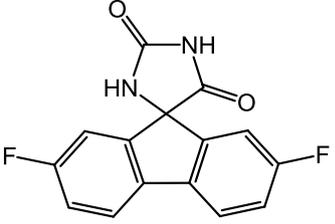
Die meisten bekannten ALR2-Inhibitoren besitzen ein Grundgerüst aus mehrere Aromaten, das auf den hydrophoben Aufbau der ALR2-Spezifitätstasche zurückzuführen ist. Allerdings führt das zu einer schlechteren Wasserlöslichkeit, die für optimale ADME-Eigenschaften angepasst werden muss. Das Institute for Diabetes Discovery (IDD) entwickelte Phenoxyessigsäure-Derivate wie **IDD594**<sup>17</sup> und **IDD384**<sup>18</sup> [242]. Diese Verbindungen zeigen neben einer verbesserten Löslichkeit eine hohe Selektivität für Aldose Reduktase gegenüber Aldehyd Reduktase.

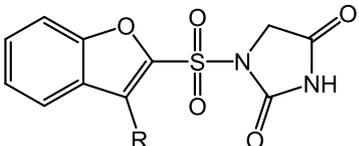
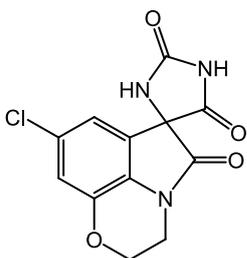
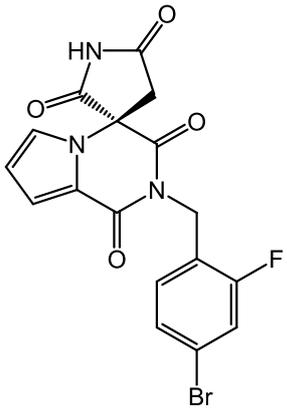
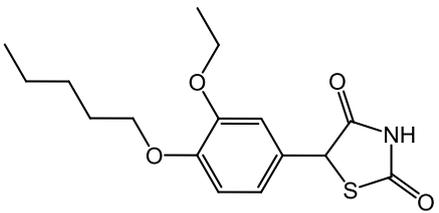
Während Substanzen wie Tolrestat und Epalrestat durchwegs vielversprechende Resultate zeigten, versagte eine Vielzahl anderer. Es ist daher unabdingbar, weiter nach potentiellen Inhibitoren mit besseren pharmakologischen Eigenschaften zu suchen.

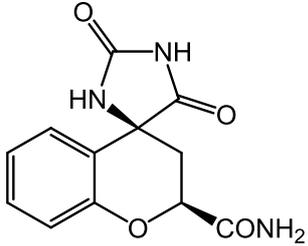
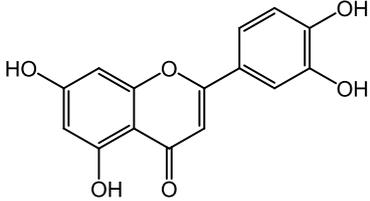
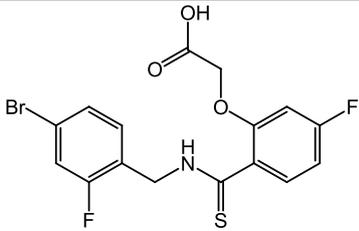
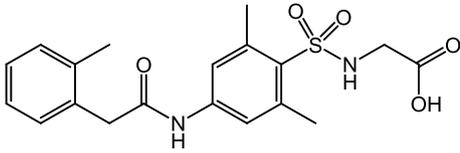
**Tabelle 4.3:** Auswahl von Aldose Reduktase Inhibitoren mit Trivialnamen, Strukturformel, IC<sub>50</sub>-Wert [ $\mu$ M] und (falls vorhanden) zugehörigem PDB-Code der Kristallstruktur.

Nr.	Trivialname	Strukturformel	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	PDB-Code
1	Tetramethylen-glutarsäure		-	-
2	Alrestatin		15 [178]	1az1
3	Tolrestat		0,03-0,1 [243]	1ah3
4	Ponalrestat		0,007-0,11 [244]	-
5	Zenarestat		0,04-0,06 [246]	1iei

4 Modellsysteme

6	Zopolrestat		0,003-0.04 [245]	1mar
7	Epalrestat		0,01-15 [247]	-
8	Sorbiniil		0,15-3,5 [248]	1ah0
9	Minalrestat		k.A. [201]	1pwl
10	Imirestat		-	-

11	M16209 M16287	 <p>R= Br: M16209 R= Cl: M16287</p>	-	-
12	ADN-138		-	-
13	Ranirestat		0,15 [249]	-
14	Risarestat		k.A. [251]	-

15	Fidarestat		0,009-0,02 [250]	1pwm
16	Quercetin		-	-
17	IDD594		0,03 [252]	1us0
18	IDD384		k.A. [253]	1e13

## 4.2 Nukleäre Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren (NR) umfassen ligandaktivierte Transkriptionsfaktoren, welche eine große Anzahl essenzieller Prozesse beeinflussen. So sind sie an der genregulierten embryonalen Entwicklung beteiligt, dem Erhalt und der Differenzierung des Phenotyps, an Stoffwechsel und Zelltod. Störungen in ihrer primären Funktion der Steuerung der Transkription in den Zielzellen führen daher zu proliferativen, reproduktiven und metabolischen Erkrankungen wie Krebs, Unfruchtbarkeit und Übergewicht [254, 255]. In diesem Zusammenhang ist die ligandeninduzierte Natur der Aktivität dieser Rezeptoren ein wichtiger Ansatzpunkt des Wirkstoffdesigns.

Alle NRs zeigen eine gemeinsame strukturelle Organisation in sechs unabhängigen Domänen (A-F), welche auf Regionen konservierter Funktion und Struktur basiert [256] 4.10:

**A-B** N-terminale Modulationsdomäne (NTD)

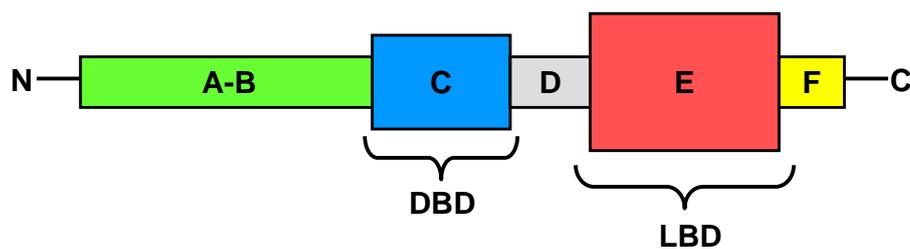
**C** DNA-Bindungsdomäne (DBD)

**D** kurze Hinge-Region (H)

**E** Ligand-Bindungsdomäne (LBD)

**F** variable C-terminale Domäne (CTD)

Die variable Region F hat eine großteils unbekannte Struktur und Funktion.



**Abbildung 4.10:** Gemeinsamer Aufbau der Nukleären Rezeptoren: A-B: N-terminale Modulationsdomäne (NTD), C: DNA-Bindungsdomäne (DBD), D: kurze Hinge-Region (H), E: Ligand-Bindungsdomäne (LBD), F: C-terminale Domäne (CTD)

Die **N-terminale Domäne (A-B)** wird in der Literatur als relativ unstrukturiert beschrieben. Dennoch gibt es Studien, welche eine minimale Faltung in N-terminalen Regionen der Steroidrezeptoren beweisen [257, 258, 259]. Die Steroidrezeptoren umfassen den Progesteronrezeptor (PR), den Glucocorticoidrezeptor (GR), den Estrogenrezeptor (ER), den Androgenrezeptor (AR) und den Mineralocorticoidrezeptor (MR). Die Länge der Domäne ist variabel und kann sowohl weniger als 50 als auch mehr als 500 Aminosäuren umfassen. Ihre 3D-Struktur wurde allerdings nicht bestimmt. Diese Domäne enthält darüber hinaus mindestens eine aktive Transaktivierungsregion (AF-1). Diese AF-1 Sequenz zeigt im Gegensatz zu der in der Ligand-Bindungsdomäne enthaltenen Transaktivierungsregion AF-2 eine relativ kleine Konservierungsrate von weniger als 15% innerhalb derselben Untergruppe der NRs. Kurze und ähnliche Regionen wurden aber trotzdem zwischen verschiedenen NRs entdeckt [260]. So zeigt eine 26 Aminosäuren lange Sequenz eine 46%-ige Identität zwischen dem Androgenrezeptor AR (Aminosäure 237-262) und dem Glucocorticoidrezeptor GR (Aminosäure 47-103).

Die **DNA-Bindungsdomäne (C)** enthält zwei Zinkfinger und ist der am höchsten konservierte Bereich aller NR Domänen. Diese Domäne besteht aus etwa 80 Aminosäuren und war in der Form der GR-DBD eine der ersten Rezeptoruntereinheiten, deren Kristallisation gelang [261]. In allen bislang kristallografisch ermittelten DBDs wird sie als globulär erkannt. Helix Nummer 1 ist N-terminal und interagiert mit je einem DNA-Strang. Aminosäuren, welche mit spezifischen DNA-Basenpaaren wechselwirken, bilden die P-Box, einen hochkonservierten Bereich des ersten Zinkfingers. Helix Nummer 2 ist C-terminal und liegt orthogonal über Helix Nummer 1, was zu einer Stabilisierung der Rezeptorstruktur führt. Zudem ist diese Helix an der Dimerisierung zweier Steroidrezeptormonomere beteiligt. Verantwortlich dafür ist die sogenannte D-Box, eine konservierte Region innerhalb des zweiten Zinkfingers. Sobald der eine DNA-Strang mit der P-Box wechselwirkt, kommt es zu konformationellen Änderungen in der D-Box, welche für die Bindung des zweiten Monomers notwendig sind [262]. Die DBD bildet auf diese Weise ein Dimer, bindet an ein sich wiederholendes, hexameres DNA-Basenpaar (DNA response element) [263] und führt zur Transaktivierung. In den beiden Zinkfingern ist jedes Zinkatom koordinativ von 4 Cysteinresten umgeben, die für die Stabilität und Funktionalität benötigt werden. Ihre Entfernung führt zu einer Entfaltung des Proteins und einem Verlust des Vermögens an die DNA zu binden [257].

Die **Hinge-Region (H)** verknüpft die DNA- und Ligand-Bindungsdomäne. Sie ist relativ kurz und wenig konserviert. Sie enthält ein sogenanntes NLS (Nukleäres Lokalisierungssignal) und ist dadurch für die nukleäre Lokalisation des Rezeptors verantwortlich. NLS ist eine spezifische Sequenz, welche einen hohen Anteil basischer Aminosäuren besitzt und von einem Kerntransportsystem erkannt wird. Mutationen darin führen zu einer verringerten Importin-Bindungsaffinität und damit zu einem verringertem Import in den Nukleus [264].

Die **Ligand-Bindungsdomäne (E)** zeigt ein allen Nukleären Rezeptoren gemeinsames Faltungsmuster, welches konservierter als die Primärsequenz ist. Die Apo-Form von

RXR- $\alpha$  (Retinoid X Rezeptor  $\alpha$ ) war im Jahre 1995 die erste LBD-Struktur, die durch Röntgenkristallografie in ihrer 3D-Struktur aufgeklärt wurde. Sie zeigt 12  $\alpha$ -Helices und einen kurzen  $\beta$ -Turn, die in einem dreischichtigen antiparallelen Sandwich [265] angeordnet sind. Seither wurden viele weitere LBDs kristallografisch bestimmt, sowohl in ihrer Apo-Form, als auch mit gebundenem Agonisten oder Antagonisten. Alle zeigen eine globuläre Domäne mit 11 oder 12  $\alpha$ -Helices. Auch die LBD liegt als Dimer vor und zeigt zu einem gewissen Grad Variabilität im Bereich der Ligandenbindetasche. Darüber hinaus enthält sie eine ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion AF-2, welche in Helix 12 lokalisiert ist.

Seit ihrer ersten Beschreibung im Jahr 1988 [266] werden die NRs bzgl. der chemischen Struktur ihrer Liganden in drei Klassen unterteilt [267]. Im humanen Genom sind 48 NRs identifiziert, welche aufgrund von Ähnlichkeiten miteinander in 28 LBDs resultieren [268]. Die erste Klasse (Klasse I) umfasst die Steroidrezeptoren, dazu gehören der PR, der GR, der ER, der AR und der MR. Die zweite Klasse (Klasse II) ist definiert als Thyroid-/Retinoidrezeptorfamilie. Primäre Vertreter sind hier der Thyroid-Rezeptor (TR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der Retinoidrezeptor (RAR) und der Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptor (PPAR). Klasse III beinhaltet die Rezeptorfamilie der Orphanen Rezeptoren, deren Liganden nicht bekannt sind und deren Aktivierung möglicherweise auf eine Rezeptoracetylierung oder kovalente Modifizierung von Cysteinresten zurückführbar ist.

NRs verbleiben bis zur Ligandenbindung im Zytosol und wandern dann in den Zellkern, wo sie ihre Transkriptionsaufgabe ausüben. Die Liganden sind kleine lipophile Moleküle: Retinoide, Steroide, Thyroxine und Vitamin D.

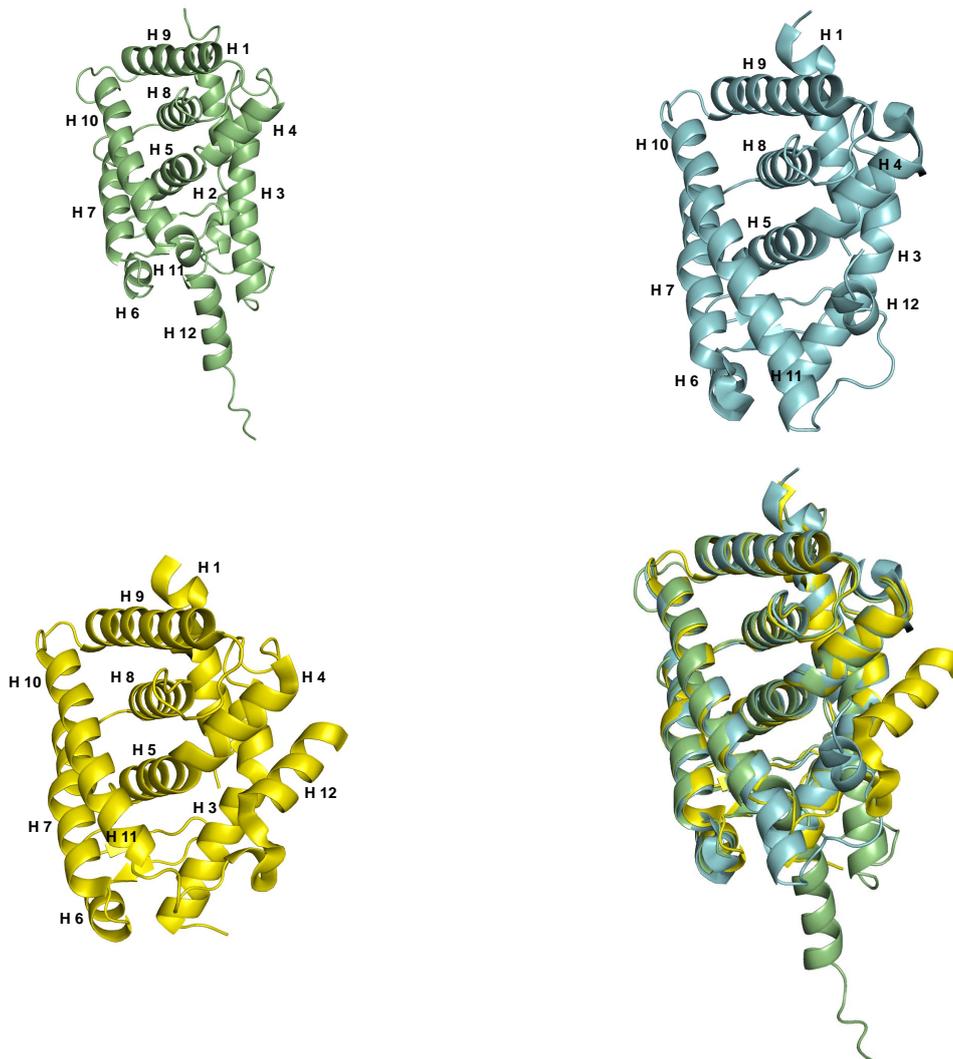
### 4.2.1 Mechanismus und inhärente Flexibilität der NRs

**Mechanismus** Die Aktivierung der NRs erfolgt über die Ligandenbindung. Der Ligand wird entweder in einem endokrinen Organ synthetisiert und gelangt durch ein Transportsystem in seine Zielzelle, wird direkt in der Zielzelle ausgehend von einer Vorstufe synthetisiert oder ist ein Metabolit darin. Gemäß ihrer zellulären Verteilung können die NRs in vier Klassen unterteilt werden. Klasse I Rezeptoren, dazu gehören die Steroidrezeptoren, sind im Zytoplasma lokalisiert und werden nach der Ligandenbindung in den Nukleus transportiert. Dort bilden sie ein Homodimer aus und binden in der Folge an spezifische DNA-Sequenzen. Klasse II Rezeptoren, wie der Thyroidrezeptor befinden sich im Zellkern und bilden ein Heterodimer mit dem RXR Rezeptor, sobald der Ligand in die Tasche bindet. Klasse III Rezeptoren sind analog zu Vertretern der Klasse I, binden aber als Homodimere in einer anderen Art und Weise an die DNA. Klasse IV Rezeptoren binden als Monomere oder Dimere an die DNA.

Liganden, welche ein Dekodieren einer Gensequenz induzieren, führen durch ihre Bindung zu einer aktiven Konformation des Rezeptors und werden *Agonisten* genannt, während Liganden, die eine Gentranskription verhindern als *Antagonisten* bezeichnet werden und eine inaktive Konformation bewirken. Diese zeichnet sich durch eine veränderte Orientierung

von Helix 12 aus, die so erfolgt, dass kein Koaktivator binden kann und die Transkription somit nicht eingeleitet wird. Die weitere Ligandenklasse der Selektiven NR Modulatoren (SnuRMs) haben gewebsspezifisch agonistische oder antagonistische Eigenschaften.

**Inhärente Flexibilität und Bedeutung von Helix 12** Die Flexibilität der NRs ist stark ausgeprägt und spielt sich auf zweierlei Ebenen ab: Auf mikromolekularer Ebene treten bei Ligandenbindung leichte Anpassungen der Seitenketten der NR-Bindetasche auf, während signifikantere Veränderungen eine Verschiebung von Helix 12 auf makromolekularer Ebene betreffen. Diese  $\alpha$ -Helix kann eine Art Deckel über der Ligandenbindetasche ausbilden und enthält Aminosäuren, die für die AF-2 Funktion wichtig sind. Die in der PDB abgelegten LBD Kristallstrukturen können in drei Rezeptortypen eingeteilt werden: eine Apo-, eine Holo-Agonist-gebundene und eine Holo-Antagonist-gebundene Rezeptorform. Der Unterschied zwischen allen dreien liegt in einer unterschiedlichen Orientierung von Helix 12 [269]: In der Apo-Form ist sie solvensexponiert. Bei einer Agonistenbindung legt sie sich als Deckel über die Tasche und bildet dabei gemeinsam mit Helix 3 und 4 eine Rezeptoroberfläche, eine hydrophobe Grube, an welche ein Koaktivator binden kann. Im Antagonist-gebundenen Zustand nimmt Helix 12 eine vollkommen andere Orientierung ein und macht die Ausbildung der hydrophoben Grube und damit die Koaktivatorbindung unmöglich. Es wird angenommen, dass der Antagonist durch seine besondere Struktur eine Helix 12 Annäherung an den Kern der LBD unmöglich macht und Helix 12 selbst die Bindung eines Koaktivators nachahmt [270, 271, 272]. Die folgende Abb. 4.11 zeigt die verschiedenen NR-Formen vergleichend.



**Abbildung 4.11:** Cartoondarstellung der drei unterschiedlichen Konformationen der NR LBD: *Links oben:* Apo-Form (RXR $\alpha$  LBD, 1lbd); *Rechts oben:* Agonistische Holo-Form (RXR $\alpha$ , 1fby); *Links unten:* Antagonistische Holo-Form (RXR- $\alpha$ , 1dkf); *Rechts unten:* Alle drei Konformationen im Vergleich.

Im Agonist-gebundenen Zustand können Koaktivatoren mit LxxL-Motiv an die NRs binden und zur Transkription führen [273]. Dieses Motiv ist  $\alpha$ -helical und bildet amphipatische Wechselwirkungen aus. Die Stärke dieser wird durch benachbarte Aminosäuren zusätzlich moduliert. Für den Fall des ARs ist bekannt, dass durch induced-fit Effekte des Rezeptors Koaktivatoren mit FxxLF-Motiv, d.h. mit sperrigen, aromatischen Seitenketten binden können [274].

Die Bindung des Liganden führt zu konformationellen Änderungen und Anpassungen in der Bindetasche. Studien am Thyroid-Rezeptor ergaben ein Taschenvolumen von 600 sowie ein Ligandenvolumen von 530 Å<sup>3</sup>, was zur Annahme führt, dass Agonisten sehr eng

in die Tasche passen [275]. Im Gegensatz dazu ergab sich für den Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor (PPAR), dass Liganden nur einen kleinen Teil der Tasche besetzen können [276, 277]. Dies war ein erster Hinweis auf die signifikante Flexibilität der LBD Bindetasche.

Aufgrund der Existenz von Mikro- und Makroflexibilität der NRs wird klar, dass eine gute Beschreibung für diese Art von Rezeptoren eine Studie aller konformationell zugänglichen Zustände im Ensemble erfordert. Die gängige experimentelle Methode der Röntgenkristallographie liefert nur statische Ergebnisse der energetisch günstigsten Konformation. MD-Studien sind dagegen ein guter Ansatz zur Sammlung auch weniger günstiger Konformationen, die zum besseren Verständnis des Systems nicht außer Acht zu lassen sind. Die dabei resultierenden Konformationen können in einem zweiten Schritt zu Docking-Studien in der Wirkstoffsuche herangezogen werden, um mögliche NR-Agonisten und Antagonisten zu identifizieren. Allerdings sollte in dem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der großen Plastizität der NRs unerwartete Veränderungen im Bindemodus des Liganden sowie der Rezeptorkonformation auftreten können.

Die Orientierung von Helix 12 beeinflusst, wie bereits erwähnt, die biologische Aktivität der NRs. Da eine Feinabstimmung der ligandeninduzierten Helix 12 Orientierung eine Strategie im Design neuer Ago- und Antagonisten darstellt, ist eine Betrachtung der auftretenden Konformationen in Hinblick auf die Mikro- und Makroflexibilität von immenser Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden zwei Rezeptoren aus der Klasse der Steroidrezeptoren mit Hilfe der SMD-Methode näher untersucht. Diese (AR und ER) sind in ihrer Bedeutung in den folgenden beiden Unterkapiteln (4.2.2, 4.2.3) vorgestellt. In den durchgeführten Simulationsstudien sollen wichtige Effektoren der Rezeptorflexibilität identifiziert und eine strukturelle Erklärung für den Übergang zwischen den möglichen Konformationen gefunden werden. Für beide Typen an Rezeptoren war es bislang nicht möglich, experimentelle Apo-Strukturen zu gewinnen. Die in dieser Arbeit in Kapitel 7 durchgeführten Studien mit Hilfe erzwungener MD-Simulationen sollen strukturelle Einblicke in den erfolgenden Ligandenaustritt liefern und ein möglicher Übergang zwischen der agonistischen Konformation dieser NRs und einer antagonistischen oder Apo-Konformation nachvollzogen werden. Diese Studien werden dabei nicht nur am AR, sondern auch am ER vollzogen, um zu bewerten, ob die für den einen Rezeptor gewonnenen Informationen auf den strukturell ähnlichen ER übertragbar sind.

### 4.2.2 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) ist 919 Aminosäuren lang und ein Mitglied der Überfamilie der NRs. Seine beiden endogenen Agonisten, Testosteron (T) und dessen aktiverer Metabolit  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) regulieren die sexuelle Differentiation und Reifung. Defekte im AR, vor allem Mutationen in seiner Sequenz, führen zu einer Verringerung der AR Ligandenspezifität und tragen wahrscheinlich zur Entwicklung und dem Fortschreiten des Prostatakarzinoms bei. Außerdem stehen die Mutationen im Zusammenhang mit einem Scheitern der endokrinen Therapie dieses Karzinoms, indem die AR-Transkriptionsaktivität auch durch Antiandrogene oder andere endogene Hormone ausgelöst wird [279]. Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten auftretende Krebsart unter amerikanischen Männern und die dritthäufigste Todesursache, welche auf ein Krebsleiden zurückgeht [280, 281]. Aktuelle Behandlungstherapien des Prostatakarzinoms bestehen in einer Orchiectomie oder chemischen Kastration, bei welcher AR Antagonisten (z. B. Cyproteronacetat) dem Patienten verabreicht werden [282, 283, 284], die als Antiandrogene die biologischen Effekte von Testosteron und Dihydrotestosteron verhindern, die als Androgene das Tumorwachstum begünstigen würden. In diesem Zusammenhang besteht großes Interesse an der Entwicklung neuer AR-Antagonisten mit sowohl steroidalem als aus nicht-steroidalem Grundgerüst. Der ungebundene AR ist inaktiv und bildet im Zytoplasma einen Komplex mit HSPs (Heat Shock Proteins) [285, 286]. Sobald Androgene an den AR binden, wird eine Konformationsänderung des Rezeptors induziert, welche zu einer Dissoziation von den HSPs und einer folgenden Rezeptordimerisierung nach der Translokation in den Nukleus führt. Hier bindet AR an seine Androgen Response Elements (AREs) in den Zielgenen [287, 288].

Eine große Anzahl strukturell sehr unterschiedlicher Moleküle bindet an den AR. Dazu gehören neben Vertretern der Klasse der Steroide auch Industrie- und Umweltchemikalien wie Phytoestrogene, Phenole, Diethylstilbestrol, Organochlorine und Diphenylmethane [289]. DHT bindet mit einem  $K_d$ -Wert von 0,28 nM [290]. Studien haben gezeigt, dass seine Substitution mit einer sperrigen Benzoateinheit an der 17  $\beta$ -Position dennoch zu einer bedeutenden Affinität von  $K_d=260$  nM führt. Zusätzliche MD-Studien dieser Verbindung in Komplex mit dem AR zeigen eine Verschiebung von Phe 891 um 3 Å, weswegen der sperrige Benzoatsubstituent in der Tasche vergraben werden kann [291]. Daneben reorientieren auch Ile 899 und Asn 705 ihre Seitenketten. Dies führt zu der Annahme, dass der AR an der 17  $\beta$ -Position des Steroidgrundgerüsts auch größere Substituenten duldet und durch „induced-fit“ Effekte in die Tasche aufnimmt.

Die Aminosäuren, welche die Bindetasche aufbauen, gehören zu Helices 3, 5/6, 8, 11 und 12 und zu einem  $\beta$ -Strang zwischen den Helices 5/6 und 7. Helix 12 erfährt dabei, wie bereits im vorangegangenen Kapitel 4.2 beschrieben und durch Proteolyse-Studien bestätigt [292, 293, 294], strukturelle Änderung in ihrer Konformation in Abhängigkeit davon, ob ein Agonist, Antagonist oder ein SnuRM bindet. Bislang ist es allerdings noch nicht gelungen, eine kristallografisch ermittelte Struktur zu erfassen, welche den AR-Wildtyp in Komplex mit einem Antagonisten zeigt. Alle bisher in der PDB abgelegten Strukturen zeigen Helix 12 in der agonistischen, geschlossenen Konformation. Computergestützte Methoden stellen hier einen möglichen Ansatz zur theoretischen Ermittlung einer Apo- bzw. offenen und

Antagonist-gebundenen Struktur im Zuge einer Molekulardynamikstudie dar.

### 4.2.3 Estrogenrezeptor

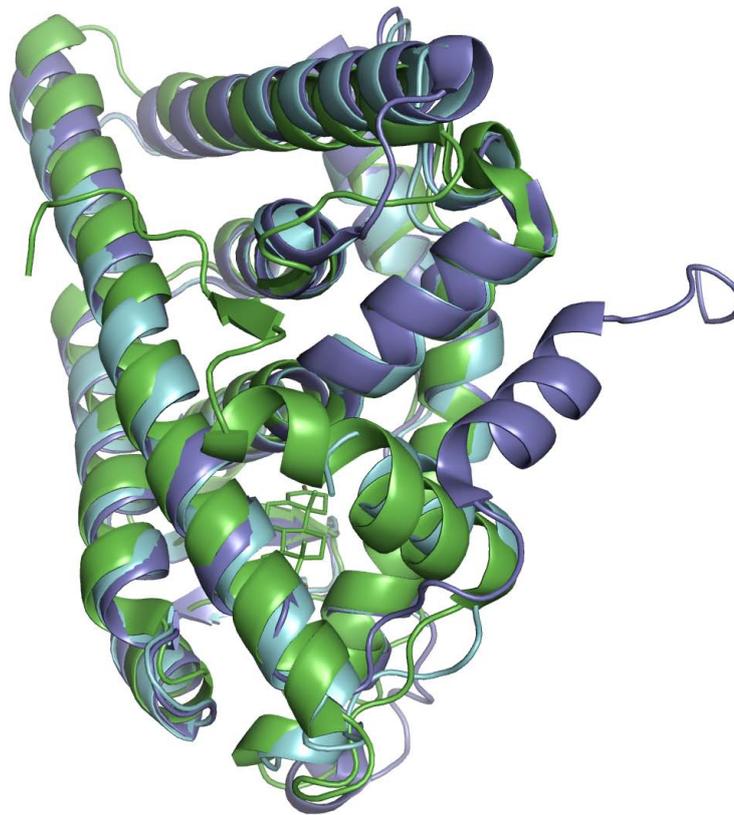
Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde erkannt, dass eine Entfernung der Eierstöcke bei an Brustkrebs leidenden, prämenopausalen Frauen zu einer Regression der Krankheit führen kann [295]. Nachdem 1962 nachgewiesen wurde, dass sich Estradiol zwar im Uterus, der Vagina und der Hypophyse, jedoch nicht im Muskelgewebe und der Lunge anreichert [296], wurde die Hypothese geäußert, dass in den Estradiol-Zielgeweben Rezeptoren für das Steroid vorhanden sein müssten. 1966 wurde dieser Rezeptor von Toft isoliert [297, 298]. In der Folge wurde postuliert, dass Brustkrebs auf eine endokrine Therapie ansprechen sollte, falls Estrogenrezeptoren im Karzinom nachweisbar sind [299].

1996 konnte ein weiterer Estrogenrezeptor aus der Prostata von Ratten isoliert werden, der später auch aus menschlichem Gewebe isoliert werden konnte [301, 302, 303], der Estrogenrezeptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ). Der bisher bekannte ER wurde in Estrogenrezeptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) umbenannt. Im Jahr 2000 wurde die Identifizierung eines weiteren ERs in Reproduktionsorganen und Zentralnervensystem ZNS des Fisches *Micropogonias undulatus* veröffentlicht: Der Estrogenrezeptor- $\gamma$  (ER- $\gamma$ ) [300].

Die beiden humanen Isoformen ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  zeigen eine unterschiedliche Verteilung in diversen Geweben. Hohe Konzentrationen an ER- $\alpha$  weisen Nieren, Nebenhoden und Nebennieren auf. ER- $\beta$  ist in Prostata, Lunge und Blase angereichert. Uterus, Ovar und Hoden zeigen sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  in großen Mengen. Der menschliche ER- $\alpha$  besteht aus 595 und ER- $\beta$  aus 530 Aminosäuren [304, 305].

Die erste Kristallstruktur dieses Vertreters der NRs wurde im Jahre 1998 publiziert [306, 307]. Diese enthielt den Liganden 17- $\beta$ -Estradiol (E2) gebunden. 17- $\beta$ -Estradiol ist der primäre natürliche Ligand des Estrogenrezeptors und für die sexuelle Entwicklung, reproduktive Funktion, Proliferation und Differentiation verantwortlich. Beide bekannten Subtypen, ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  sind daher für die pharmazeutischen Industrie als Zielrezeptoren von Interesse.

So enthalten orale Kontrazeptiva Estradiol und zur Behandlung von estrogenresponsivem Brustkrebs und Osteoporose werden verschiedene SERMS (Selektive Estrogenrezeptormodulatoren), die einen gewebsspezifischen agonistischen und antagonistischen Effekt zeigen, herangezogen [308, 309]. Eine große Anzahl sehr diverser Liganden, Agonisten sowie Antagonisten, binden an den ER, was für eine große inhärente Flexibilität dieses Rezeptors spricht. Die nachfolgende Abb. 4.12 zeigt den AR mit gebundenem Testosteron im Vergleich mit den kristallografisch aufgelösten Strukturen des ERs in offener und geschlossener Konformation und verdeutlicht die unterschiedliche Orientierung von Helix 12.



**Abbildung 4.12:** Existenz zweier verschiedener Helix 12 Orientierungen: Vergleich der Kristallstrukturen von AR mit gebundenem Testosteron (2am9, grün) in geschlossener Konformation mit der offenen (1xpc, violett) und geschlossenen Konformation (1ere, cyan) des ER.

# **Teil II**

## **Untersuchungen, Auswertungen und Ergebnisse**

# 5 Proteinflexibilität und unerwartete Bindemodi: MD-Simulationen zur Untersuchung der Aldose-Reduktase-Komplexe mit Naphthoisothiazolesigsäurederivaten

## 5.1 Vorstellung der Systeme und Fragestellung

Proteine sind dynamische Gebilde und zeigen als solche thermische Fluktuationen, Rotationen um Torsionswinkel, Bewegungen von einzelnen Aminosäuren, Sekundärstrukturelementen oder ganzer Proteindomänen. Die Berücksichtigung dieser Ereignisse ist für das Verständnis der biologischen Funktion eines Enzyms von essentieller Bedeutung genauso wie im strukturbasierten Design von Wirkstoffen.

Wie in Kapitel 2 beschrieben, stellen MD-Simulationen eine Möglichkeit dar, Proteine als Systeme mit inhärenter Flexibilität zu studieren und Erkenntnisse über das Ausmaß dieser zu gewinnen. In diesem Kapitel werden nun MD-Simulationen zur ALR2 vorgestellt. Wie bereits erwähnt, zeichnet sich diese durch eine ausgesprochene Ligandenpromiskuität aus, welche in einer sehr flexiblen Bindetasche begründet liegt. Diese wird in eine Anionen- und Spezifitätstasche unterteilt, wobei sich im Besonderen letztere an die Charakteristika der Liganden anpasst. Auf diese Weise zeigt die ALR2 Bindetasche einen „induced-fit“ Binde-mechanismus.

Ein als Tolrestatanalogon von da Settimo et al. [3] synthetisierter Ligand aus einer Reihe von Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurederivaten zeigt einen neuen, niemals zuvor beobachteten Bindemodus. Aus der Kristallstruktur ist eine Rotation um den  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 ersichtlich, welche eine neue Subtasche öffnet. In Abschnitt 5.4 wird im Detail auf die Charakteristika dieses neuen Bindemodus eingegangen.

Trotz der ursprünglichen Designstrategie zeigt der Ligand ITB, so wie auch ein weiterer Vertreter ITA dieser Ligandenreihe, im Komplex mit ALR2 eine geschlossene Spezifitätstasche, während diese im Tolrestatfall geöffnet vorliegt. ITA unterscheidet sich von ITB nur in der Länge der Seitenkette in der 4-Position des Naphthylringsystems. Während ITB dort einzig mit einer Carbonsäurefunktionalität substituiert ist, liegt diese im Falle von ITA verestert vor. Beide Liganden adressieren mit ihren Carbonsäurefunktionalitäten an unterschiedlichen Positionen ihres Ringgerüsts die katalytische Einheit: ITA mit jener in

2-Position und ITB mit jener in seiner 4-Position (siehe Kapitel 2 und die Ausführungen in den nachfolgenden Abschnitten).

Ausgangspunkt für die in diesem Kapitel vorgestellten Simulationen sind jene Kristallstrukturen, welche die soeben vorgestellten Liganden ITA und ITB aus der von da Settimo et al. [3] synthetisierten Inhibitorreihe der Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurederivate in Komplex mit ALR2 zeigen. Diese röntgenkristallografisch ermittelten Strukturen tragen den PDB-Code 2nvc (ITA) und 2nvd (ITB) und sind in der Protein Data Bank [70] hinterlegt. Die reine Betrachtung der PDB-Strukturen eines Protein-Liganden-Komplexes liefert den falschen Eindruck, dass die exakte Position eines jeden Atoms genau bekannt und das System starr ist. Unter physiologischen Bedingungen ist dies, wie schon mehrfach erwähnt, keineswegs der Fall. In den durchgeführten MD-Studien war daher das Verhalten der die Bindetasche aufbauenden Aminosäuren von besonderem Interesse. Aus vorhergehenden MD-Studien [323] ist bekannt, welche Aminosäuren besonders flexibel sind. Für die beiden vorliegenden Kristallstrukturen sollte dies nun anhand von MD-Studien ebenfalls bewertet werden. Zudem zeigt sich bei ITB-Bindung eine neuartige Konformation der Bindetasche durch Öffnung einer bisher nie zugänglichen Untertasche. In der vorgestellten Studie sollte besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, eine mögliche Ursache für die beobachtete Trp 20 Rotation zu finden. In diesem Zusammenhang sind Simulationen von Interesse, in welchen der Ligand aus der ursprünglichen experimentell ermittelten Komplexstruktur entfernt wird, um Aufschlüsse über einen durch den Liganden induzierten Bindemodus zu erhalten. Darüber hinaus sollten auch weitere Konsequenzen des neuen Bindemodus, die nicht unmittelbar die Bindetasche betreffen, untersucht werden. So ist die Ausbildung zweier Salzbrücken zwischen Lys 21, Asp 216 und dem Kofaktor nicht mehr möglich bzw. liegen sie in der ermittelten Kristallstruktur nicht mehr vor (siehe Abschnitt 5.4). Ist dies über den gesamten Simulationsverlauf der Fall? Auch hier interessiert vor allem die Frage, ob eine Ligandenentfernung dazu führt, dass sie sofort wieder ausgebildet werden.

## 5.2 Methodisches

Für beide Liganden-ALR2-Strukturen wurden MD-Simulationen mit und ohne gebundenen Liganden durchgeführt. In den Ligand-freien Ansätzen wurden ebenfalls die erwähnten Kristallstrukturen als Startstruktur verwendet, allerdings wurde aus ihnen der Ligand entfernt. Für die 2nvd-Komplexstruktur werden für die ligandgebundene und -freie Simulation je drei Varianten diskutiert. Diese unterscheiden sich in der Modellierung von Trp 219, welches in der vorliegenden Kristallstruktur nicht aufgelöst ist.

Die MD-Simulationen wurden mit den Versionen 9 und 10 des AMBER Programmpaketes [310, 311] und dem Cornell et al. Kraftfeld [313] in der Variante des parm99 Parametersets [30, 31] durchgeführt. Für Liganden und Kofaktor wurde zu deren RESP-Ladungsbestimmung quantenmechanisch das elektrostatische Potential mittels HF/6-31G\* mit dem Programmpaket GAUSSIAN03 [314] berechnet. ANTECHAMBER [315] weist die entsprechenden RESP-Ladungen anschließend zu. Fehlende Kraftfeldparameter des Liganden wurden mit dem Programm PARMCHK [315] aus dem GAFF Kraftfeld [316] entnom-

men. Fehlende Wasserstoffatome wurden mit dem Programm LEaP hinzugefügt. Alle zum Simulationsstart notwendigen Dateien wurden ebenfalls damit generiert.

Nach der Parametrisierung erfolgte eine 200-Schritt „steepest descent“ Minimierung mit dem Programmmodul SANDER. Hierfür wurde ein implizites Solvens-Modell gewählt [317]. Um Neutralität des Systems zu sichern, wurden anschließend 3 Na<sup>+</sup>-Ionen ins Minimum des elektrostatischen Potentials gesetzt. Mit LEaP wurde der Komplex daraufhin in einer Box aus TIP3P-Wassermolekülen [318] solvatisiert, so dass die Seitenflächen der Wasserbox mindestens 8 Å Abstand zum Protein aufweisen. Für die behandelten Systeme ergab sich auf diese Weise ein Volumen der Box von  $\sim 70 \times 75 \times 80 \text{ Å}^3$  mit ungefähr 9100 Wassermolekülen.

Nach der Solvatisierung und vor Beginn der eigentlichen Simulation wurde das System von 100 K auf 300 K innerhalb von 20 ps aufgeheizt und in den folgenden 5 ps auf 100 K in einem NVT-Ensemble abgekühlt. In diesem Prozess war nur den Wassermolekülen und Gegenionen eine Bewegung erlaubt, alle anderen Atome waren in ihrer Position festgefroren. Nach diesen 25 ps erfolgte innerhalb der nächsten 25 ps eine Erwärmung der Systems auf 300 K, wobei sich in diesem Schritt nun alle Atome bewegen durften.

Anschließend erfolgte der eigentliche Simulationsstart. Unter periodischen Randbedingungen, konstantem Druck (1atm) und konstanter Temperatur (300 K) wurde jeweils eine 6 ns Trajektorie mit einem Zeitschritt von 2 fs gesammelt. Auf alle Bindungen zu Wasserstoffatomen wurde der SHAKE Algorithmus [33] angewandt und die „Particle Mesh Ewald“ Methode [319] für die Berücksichtigung der elektrostatischen Wechselwirkungen verwendet. Das Distanz-Ausschlusskriterium für andere nichtkovalente Wechselwirkungen lag bei 8 Å. Die Koordinaten der Trajektorien wurden alle 1 ps und Energie-Werte alle zehn Zeitschritte abgespeichert.

Mit dem Programm PTRAJ wurden die Trajektorien anschließend auf das Protein zentriert und in ihre ursprüngliche Solvensbox zurück projiziert. Zugleich erfolgte auch ein Großteil der strukturellen Auswertungen mit diesem Programm sowie mit den diversen Plug-ins von VMD [320]. VMD wurde auch zur Visualisierung der Trajektorie benutzt. Die Visualisierung einzelner snapshots erfolgte mit PyMOL [321].

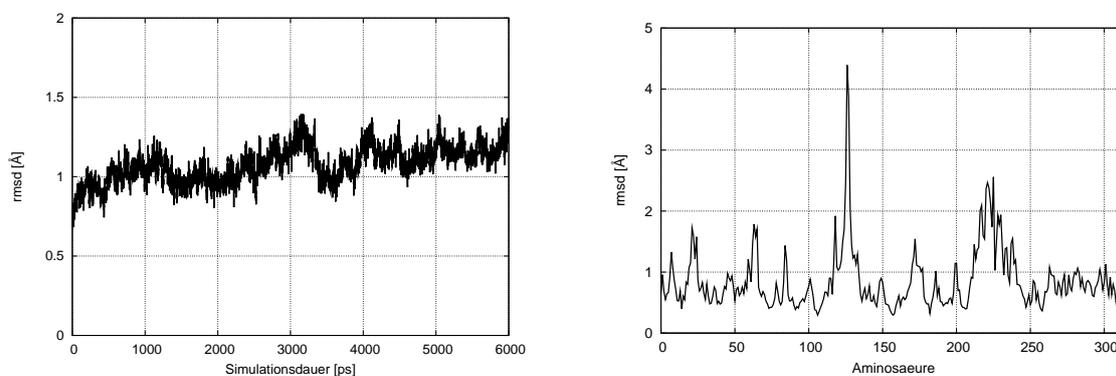
Das PTRAJ Modul erlaubt es, eine paarweise RMSD-Matrix bzgl. der Atome der Bindeta-sche zwischen individuellen Snapshots zu berechnen. In den in den folgenden Unterkapiteln gezeigten 2D-RMS Plots werden Snapshots in einem Intervall von 10 ps der Trajektorie entnommen und auf die Startstruktur gefittet. Daraus resultiert eine Matrix, die insgesamt 600 Snapshots enthält und mittels PLOTMTV [322] dargestellt werden kann. Ein Farbcode charakterisiert die paarweisen RMSD-Werte zwischen den einzelnen Snapshots und dokumentiert auf diese Weise die Ähnlichkeit zwischen den Konformationen, die entlang der MD-Simulation eingenommen werden.

### 5.3 MD-Simulationen der ITA-Komplexstruktur

Die Kristallstruktur des Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäure-Liganden ITA (Strukturformel siehe Abb. 2.2) wurde mit einer Auflösung von 1,65 Å ermittelt. Die Bindetaschen-Aminosäuren inklusive des gebundenen Inhibitors sind als Stabmodell in Abb. 2.3 (links) veranschaulicht. Im Vergleich zu dem ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten Liganden ITB derselben Syntheserie, verankert bei dem hier beschriebenen ITA die Carboxylatgruppe in Position 2 den Inhibitor in der katalytischen Tasche. Die Spezifitätstasche ist geschlossen. In den beiden nachfolgenden Unterkapiteln werden MD-Simulationen detailliert analysiert, die den von der ALR2-ITA-Komplexsimulation (Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurederivat ITA gebunden an ALR2) abgedeckten Konformationsraum mit dem der ALR2-ITA-freien-Komplexsimulation (Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurederivat ITA aus ALR2-Komplex entfernt) vergleichen.

#### 5.3.1 MD-Simulation der ALR2-ITA-Komplexstruktur

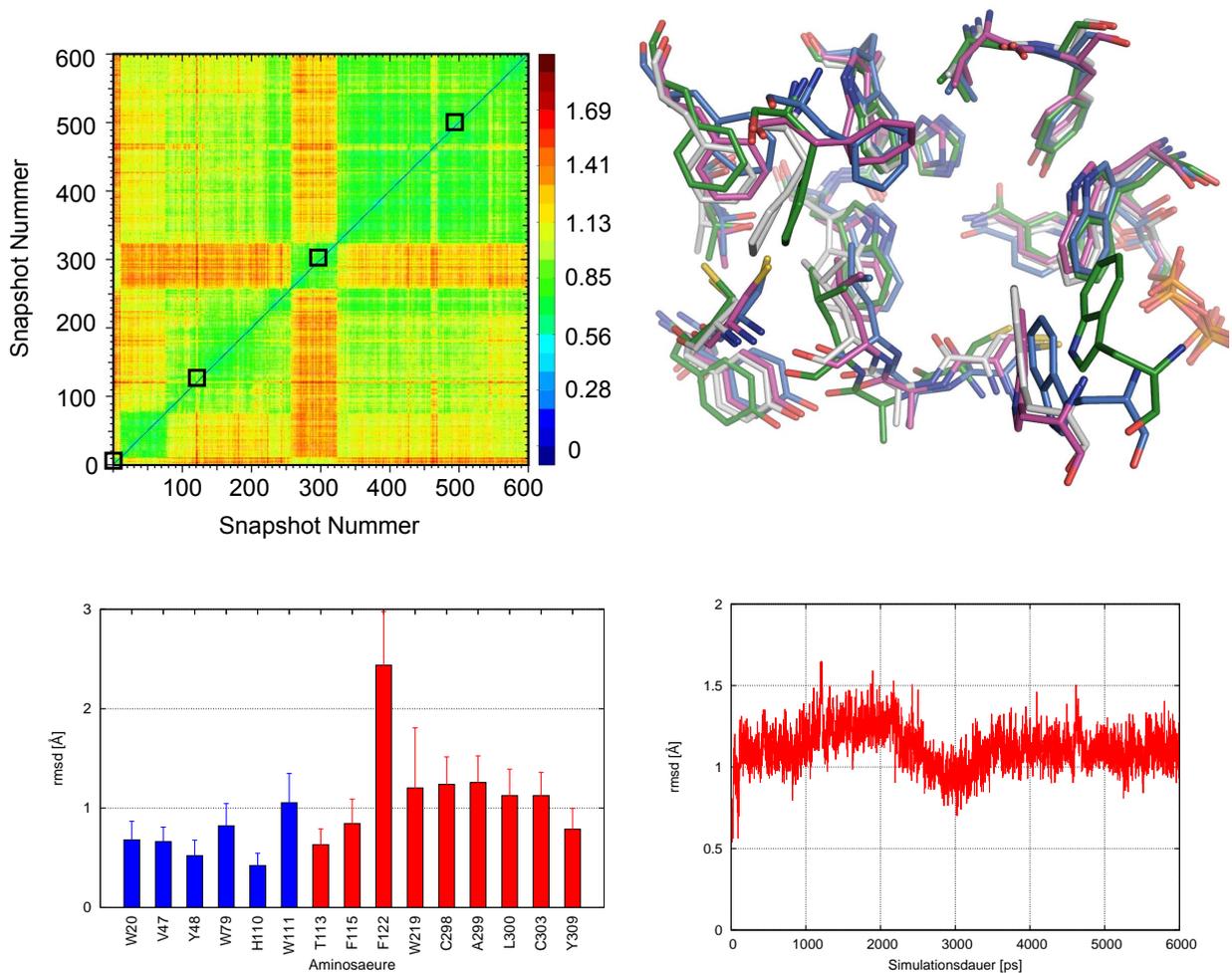
Der durchschnittliche  $C\alpha$ -RMSD-Wert über die simulierten 6 ns beträgt 1,07 ( $\pm 0,113$ ) Å relativ zur Kristallstruktur mit PDB-Code 2nvc. Der entsprechende Wert für die Aminosäuren der Bindetasche beläuft sich auf 0,656 ( $\pm 0,108$ ) Å. Dieser relativ niedrige RMSD-Wert über die gesamte Trajektorie deutet auf nur geringe Änderungen im Bereich der Bindetasche hin. Unter Berücksichtigung aller Atome der Bindetaschen-Aminosäuren wächst er auf 1,12 ( $\pm 0,127$ ) Å an. Die geringen auftretenden Orientierungsänderungen betreffen somit die Seitenketten. Die grafische Auftragung der RMSD-Werte erfolgt in Abb. 5.1 und 5.2.



**Abbildung 5.1:** *Links:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns MD-Simulation; *Rechts:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte der einzelnen Aminosäuren gemittelt über die 6 ns MD-Simulation.

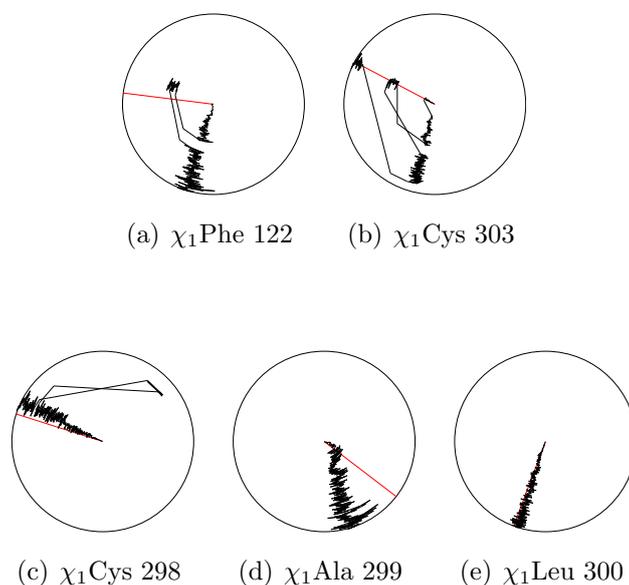
Abb. 5.1 gibt darüber hinaus auf der rechten Seite Aufschlüsse darüber, in welchem Bereich des Proteins die strukturellen Anpassungen erfolgen. Auffallend ist ein besonders großer  $C\alpha$ -RMSD-Wert für den Loopbereich um den Bindetaschen-Rest Phe 122. Das bei Ser 127 liegende Maximum beträgt 4,39 Å, was auf größere Fluktuationen auch in diesem Bereich hindeutet. Phe 122 ist auch eindeutig jener Rest der Bindetasche, der mit 2,44

Ä den höchsten Wert in dem Balkendiagramm in Abb. 5.2 aufweist. In der Darstellung werden dabei die Reste der (rigiden) Anionenbindetasche in blau, jene der (flexiblen) Spezifitätstasche in rot hervorgehoben. Die RMSD-Werte sind unter Berücksichtigung aller Aminosäureatome bezogen auf die Kristallstruktur 2nvc ermittelt worden.



**Abbildung 5.2:** Überblick über die ALR2-ITA-Komplexsimulation: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITA-Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 51 (blau), 1201 (grün), 3001 (pink) und 5001 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* „all-atom“-RMSD-Werte der Bindetasche im Verlauf der 6 ns MD-Simulation.

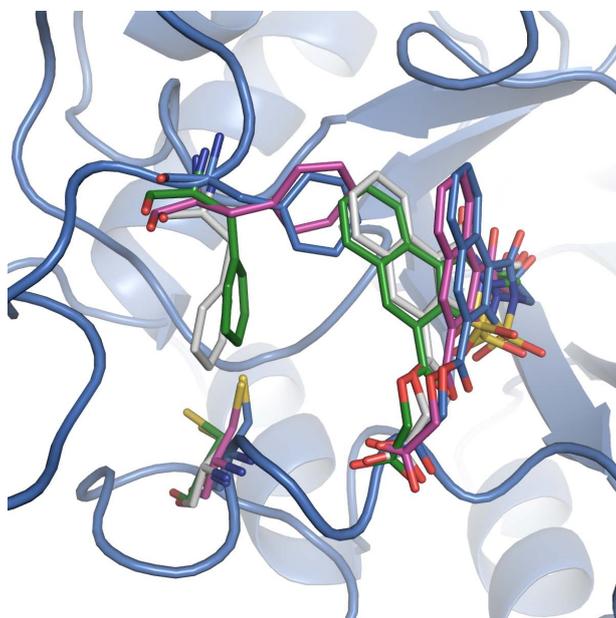
Eine nähere Betrachtung der Bindetasche spiegelt die größeren Veränderungen in der Position von Phe 122 wider. Dabei wurden gemäß des links davon abgebildeten 2D-RMS Plots Snapshots aus der Trajektorie entnommen, die den 4 unterscheidbaren Clustern entsprechen. Cluster Nummer 1 umfasst die Snapshots der ersten 100 ps der MD-Simulation, Cluster Nummer 2 jene von 100-2600 ps der Simulation, Cluster Nummer 3 jene von 2600-3200 ps und Cluster Nummer 4 jene der letzten 2800 ps Simulation. Aufgrund der farblichen Unterscheidung der RMSD-Werte im 2D-RMS-Plot ergibt sich eine Ähnlichkeit zwischen Cluster 1 und 3 sowie zwischen 2 und 4. Diesen Clustern wurde jeweils ein Snapshot entnommen und die jeweilige Bindetaschenkonformation verglichen (Abb. 5.2, rechts oben). Die Snapshots wurden der MD nach 51 (blau), 1201 (grün), 3001 (pink) und 5001 ps (silber) Simulation entnommen. Zwei dominierende Konformationen sind in Übereinstimmung mit dem 2D-RMS-Plot ersichtlich, welche durch die Position von Phe 122 bestimmt werden. Dieses weist entweder in die Bindetasche hinein (nach 51 ps und 3001 ps) oder aus dieser hinaus (nach 1201 und 5001 ps) und rotiert somit um  $\sim 70^\circ$  ausgehend von einem anfänglichen Wert von  $-82,8^\circ$ . Dieses Verhalten zeigt auch die Auftragung in Abb. 5.3. Der Dialplot für den  $\chi_1$ -Winkel von Phe 122 zeigt im Laufe der MD dann Änderungen, wenn der Übergang in die nächste Konformation erfolgt. Insgesamt sind somit auch hier die 4 Cluster erkennbar.



**Abbildung 5.3:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITA-Komplexsimulation, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvc-Kristallstruktur.

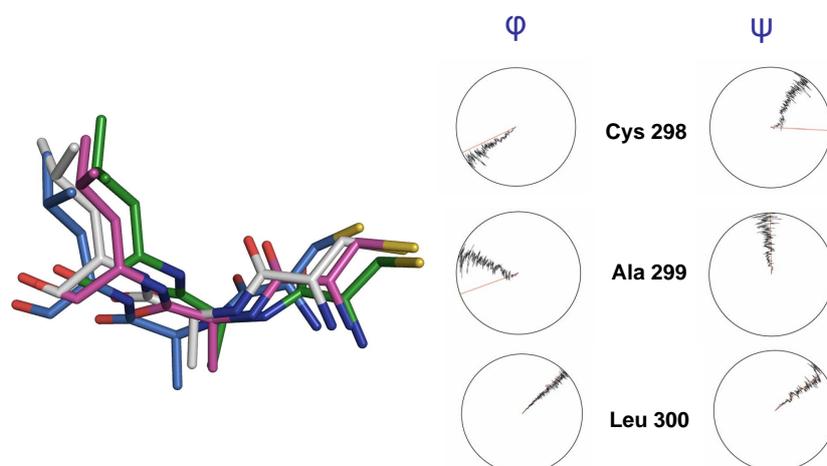
Ein interessanter Aspekt, der sich bei Vergleich der den einzelnen Clustern entnommenen Strukturen unter gleichzeitiger Betrachtung der  $\chi_1$ -Winkel ergibt, ist eine Kopplung der Seitenkettenorientierung von Phe 122 und Cys 303 miteinander. Sobald Phe 122 von

seiner initialen Orientierung hin zur Bindetasche abweicht, weist auch das Schwefelatom der Cysteinseitenkette eine andere Positionierung auf, um sterische Hinderungen mit der Phenylseitenkette zu vermeiden. Die Dialsplots untermauern (abgesehen von einer von dieser Annahme abweichenden Orientierung von Cys 303 in den letzten 500 ps der MD) diese Beobachtung. Wird auch der gebundene Ligand ITA berücksichtigt, so ergibt sich auch für diesen eine Änderung der Orientierung des Naphthylgerüsts in Abstimmung mit der Seitenkettenkonformation von Phe 122. Nur der aromatische Teil des Liganden nahe der Spezifitätstasche weist Veränderungen auf, während die Verankerung über die Carboxylatgruppe ins katalytische Zentrum davon nicht beeinflusst wird. Die relative Orientierung von Leu 300 und Trp 111 zueinander bleibt während der gesamten Simulation unverändert und die Spezifitätstasche damit geschlossen. Die nachfolgende Abbildung dient einer Verdeutlichung der Kopplung der Orientierungen von Phe 122, Cys 303 und dem Liganden ITA miteinander (Abb. 5.4).



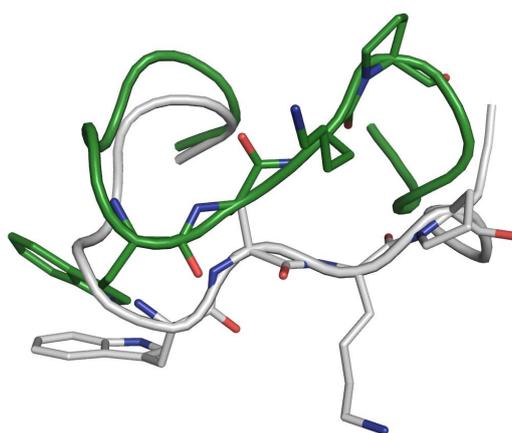
**Abbildung 5.4:** Kopplung der Seitenkettenorientierungen von Phe 122, Cys 303 und Inhibitor ITA in der ITA-Komplexsimulation; repräsentative Snapshots nach 51 (blau), 1201 (grün) 3001 (pink) und 5001 (silber) ps MD-Simulation.

Während der Bereich um Phe 122 sehr flexibles Verhalten zeigt, ist der Bereich von Cys 298-Leu 300, der sich in anderen Simulationsstudien [323, 77] als hoch flexibel erwies, eher rigide. Nur eine anfänglich starke Änderung des  $\psi$ -Winkels von Cys 298, und als Konsequenz davon auch des  $\phi$ -Winkels von Ala 299, bildet die Ausnahme. Abb. 5.5 zeigt dieses Verhalten. Die  $\chi_1$ -Winkel dieser drei Aminosäuren in Abb. 5.3 zeigen auch nur geringe Änderungen in der Seitenkettenorientierung.



**Abbildung 5.5:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITA-Komplexsimulation: Snapshots nach 51 (blau), 1201 (grün) 3001 (pink) und 5001 (silber) ps MD-Simulation.

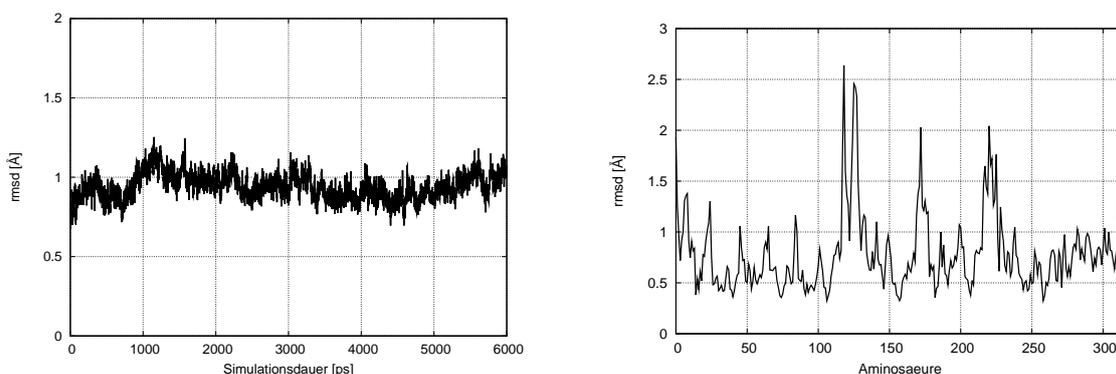
Neben dem Bereich um Phe 122 erfährt auch die „safety-belt“-Region um Trp 219 Fluktuationen. Demgemäß sind auch die  $C\alpha$ -RMSD-Werte der Aminosäuren in diesem Bereich erhöht. So ergibt sich für den Abstand zwischen dem N-Atom von Pro 222 nach 1201 und 5001 ps MD-Simulation ein Abstand von 5,75 Å, siehe Abb. 5.6.



**Abbildung 5.6:** Safety-belt-Region in der ALR2-ITA-Komplexsimulation nach 1201 (grün) und 5001 (silber) ps der ALR2-ITA-Komplexsimulation.

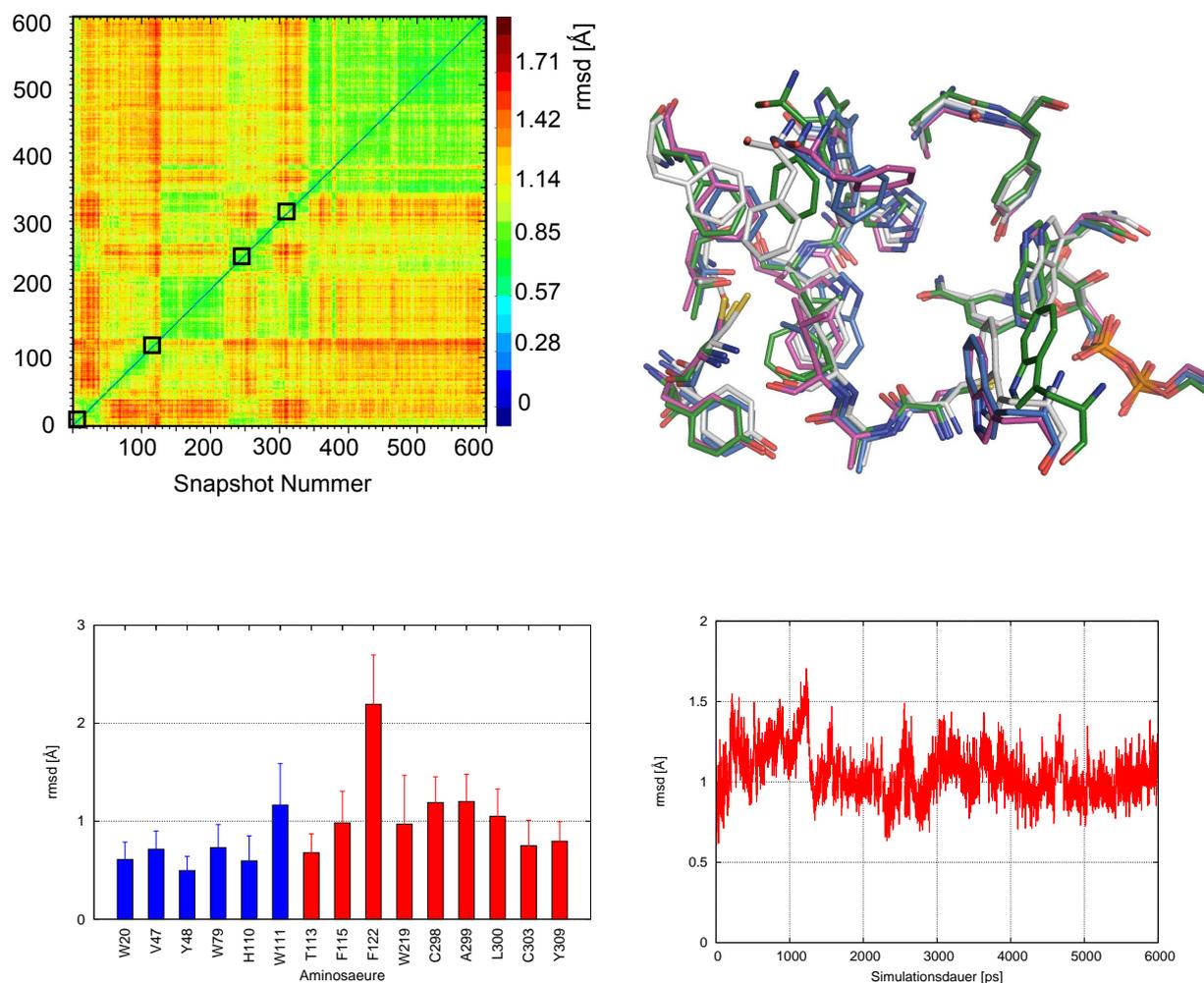
### 5.3.2 MD-Simulation der ALR2-ITA-freien-Komplexstruktur

Analog zu der bereits beschriebenen ITA-Komplexsimulation erfolgte auch diese Simulation ausgehend von der 2nvc-Kristallstruktur, aus welcher der Ligand ITA vor Beginn der MD-Simulation entfernt wurde. Der durchschnittliche  $C\alpha$ -RMSD-Wert über die 6 ns MD-Simulation bezogen auf die Röntgenkristallstruktur 2nvc beträgt  $0,94 (\pm 0,082)$  Å. Werden nur die Aminosäuren der Bindetasche berücksichtigt, ergibt sich der Wert zu  $0,68 (\pm 0,131)$  Å. Unter Miteinbeziehung aller Atome der Bindetaschen-Aminosäuren steigt der RMSD-Wert auf  $1,05 (\pm 0,152)$  Å an und ist damit aber erstaunlicherweise geringer als jener für die Simulation, die von der ITA-gebundenen Struktur ausgeht. Eine grafische Auftragung der RMSD-Werte erfolgt in Abb. 5.7 und 5.8. Verglichen mit der vorher beschriebenen ALR2-ITA-Komplexstruktur sind die Bereiche, wo sich größere Veränderungen in der  $C\alpha$ -Position der Aminosäuren ergeben, dieselben: Die  $C\alpha$ -RMSD-Werte sind im Bereich um Phe 122 und Trp 219 erhöht. Zusätzlich ergeben sich erhöhte Werte im Loopbereich nach Helix Nummer 5 (Aminosäuren 171-180) mit einem Maximalwert von  $2,03$  Å für Pro 173.



**Abbildung 5.7:** *Links:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns MD-Simulation; *Rechts:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte der einzelnen Aminosäuren gemittelt über die 6 ns MD-Simulation.

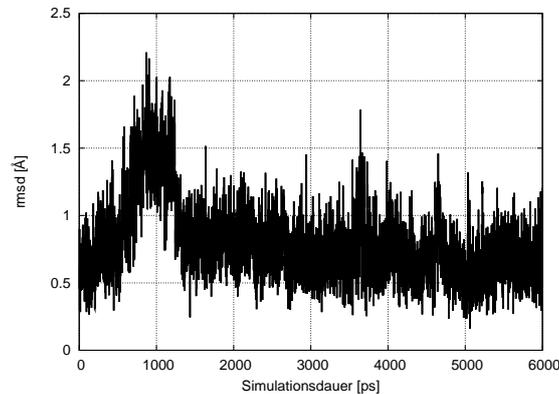
Der in Abb. 5.8 dargestellte 2D-RMS-Plot deutet auf keine klar ersichtliche Clusterung der auftretenden Konformationen hin. Die vergleichende Auftragung der Bindetasche zu verschiedenen Zeitpunkten der MD-Simulation, die den voneinander nicht scharf abgegrenzten Clustern entsprechen, zeigt eine erhöhte Flexibilität im Bereich um Phe 122, was auch durch die Histogramm-Darstellung bestätigt wird.



**Abbildung 5.8:** Überblick über die ALR2-ITA-freie-Komplexsimulation: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITA-freien-Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 101 (blau), 1201 (grün) 2451 (pink) und 3101 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* „all-atom“-RMSD-Werte der Bindetasche im Verlauf der 6 ns MD-Simulation.

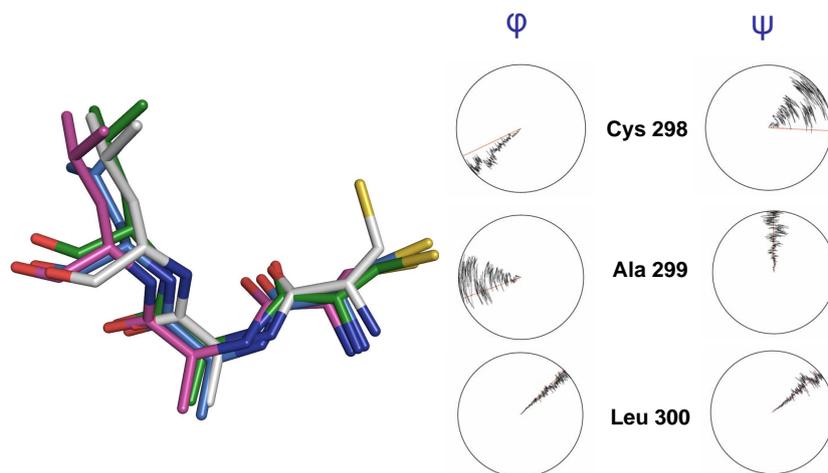
Auffallend ist aber auch eine Veränderung der Orientierung von Trp 111 (Abb. 5.8, (rechts oben)). Der gemittelte RMSD-Wert über die MD-Simulation beträgt für diesen Rest  $1,17 \pm 0,42$  Å. Ein anfänglicher Anstieg der RMSD-Werte der Bindetasche ist vor allem auf eine Neuorientierung dieses Aminosäurerestes zurückzuführen (siehe Abb. 5.9).

Die auffallenden Veränderungen im Bereich von 800 bis 1200 ps korrelieren mit dem abgebildeten Anstieg des „all-atom“-RMSD Graphen für diesen Aminosäurerest in diesem Zeitintervall.



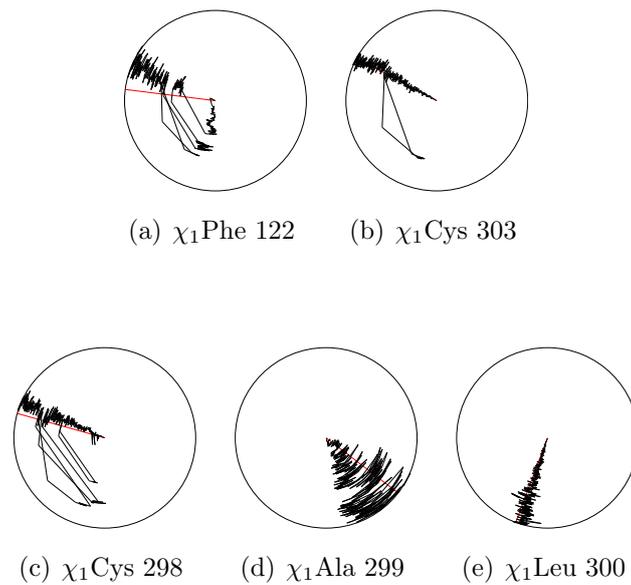
**Abbildung 5.9:** Verhalten von Trp 111 in der ALR2-ITA-freien-Komplexsimulation: „all-atom“-RMSD-Werte von Trp 111 im Verlauf der 6 ns MD-Simulation.

Daneben erscheinen auch die Reste Cys 298, Ala 299 und Leu 300 mit erhöhten RMSD-Werten ( $1,19 \pm 0,27$ ,  $1,20 \pm 0,28$  und  $1,05 \pm 0,28$  Å). Die Analyse der Backbone-Torsionswinkel (Abb. 5.10) in diesem Bereich ergibt Variationen im  $\psi$ -Winkel von Cys 298 und im  $\phi$ -Winkel von Ala 299, was für eine stärkere Fluktuation im Verlauf der MD in diesem Bereich spricht.



**Abbildung 5.10:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITA-freien-Komplexsimulation: Snapshots nach 101 (blau), 1201 (grün) 2451 (pink) und 3101 (silber) ps MD-Simulation.

Die ebenfalls ermittelten  $\chi_1$ -Winkel von diesen Resten bestätigen dies, während der entsprechende Winkel von Leu 300 nahezu unverändert bleibt. Genausowenig ändert sich  $\chi_1$  von Cys 303, das in diesem Fall nicht mit den Bewegungen von Phe 122 gekoppelt zu sein scheint, sondern bis auf einen sehr kurzen Bereich immer dieselbe Seitenkettenorientierung aufzeigt 5.11.



**Abbildung 5.11:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITA-freien-Komplexsimulation, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvc-Kristallstruktur.

### 5.3.3 Diskussion

Die in den beiden vorangegangenen Unterkapiteln 5.3.1 und 5.3.2 geschilderten ALR2-Simulationen mit und ohne gebundenen Liganden ITA bestätigen für die Bindetasche eindeutig die bereits bekannte Unterteilung in eine rigide Anionenbindetasche und eine flexible Spezifitätstasche. Diese Unterteilung ist von der Präsenz des Liganden unabhängig, allerdings ergeben sich Unterschiede im Verhalten der Spezifitätstasche bzw. der die beiden Subtaschen verbindenden Aminosäure Trp 111. Diese Aminosäure trägt eine Schlüsselfunktion innerhalb der Bindetasche, insofern als dass sie eine H-Brücke zur polaren Kopfgruppe des Liganden ITA ausbildet und diesen auf diese Weise stabilisiert. Sobald Trp 111 diese Interaktion, wie im Falle der ITA-freien Simulation, nicht eingehen kann, ist vor allem zu Simulationsbeginn eine erhöhte Flexibilität dieser Aminosäure erkennbar, bis sie eine neue Gleichgewichtsposition erreicht.

Insgesamt ergibt sich bzgl. der RMSD-Werte der ligandengebundenen und -freien Simulation kein großer Unterschied, obwohl *a priori* davon ausgegangen werden kann, dass eine Entfernung von ITA aus der Kristallstruktur vor Simulationsstart größere Auswirkungen auf die Bindetasche haben sollte. Fließen alle Atome der Bindetaschenaminoacids in die RMSD-Berechnung mit ein, ergibt sich hier aber für die ITA-freie Simulation ein kleinerer Wert als für die Simulation, in welcher ITA vorliegt ( $1,05 (\pm 0,152) \text{ \AA}$  vs.  $1,12 (\pm 0,127) \text{ \AA}$ ), allerdings liegt der Unterschied innerhalb der Standardabweichung und ist daher kaum signifikant.

Der Grund für die in der ligandfreien Simulation ähnlich großen RMSD-Werte wie in der ligandengebundenen Simulation liegt in einer weitläufigen Bewegung von Phe 122, welches zwischen zwei möglichen Zuständen seiner Seitenkettenkonformation hin und her oszilliert und in dieser Bewegung mit der Orientierung von ITA und Cys 303 gekoppelt ist. Der erste Zustand von Phe 122 entspricht der Position in der Kristallstruktur 2nvc, während der zweite einer geflippten Seitenkettenkonformation entspricht und während eines Großteils der Simulationszeit vorliegt. In der ITA-freien Simulation existiert Phe 122 ebenfalls in diesen beiden möglichen Konformationen, wobei hier aber die aus der Kristallstruktur bekannte im Simulationsverlauf bei weitem dominiert. Im Falle der ITA-freien Simulation konnte die Kopplung in der Bewegung von Phe 122 mit Cys 303 nicht beobachtet werden, weswegen die Vermutung nahe liegt, dass die Bewegung von ITA die eigentliche Ursache für diese gekoppelten Orientierungsänderungen ist.

Auch die Veränderungen im Backbonebereich von Cys 298 bis Leu 300 und der entsprechenden Seitenketten sind für die ITA-Simulation stärker ausgeprägt. Diese werden ebenfalls von der beobachteten ITA-Orientierungsänderung (Abb. 5.4) induziert. ITA liegt mit Ausnahme der Simulationszeit zwischen ca. 2800 und 3200 ps immer in einer von der Kristallstruktur abweichenden Orientierung seines aromatischen Grundgerüsts vor. Aus diesem Grund wird ausgehend von den Beobachtungen bei der MD-Simulation vermutet, dass die in der Kristallstruktur 2nvc vorliegende ITA-Orientierung nicht die günstigste ist.

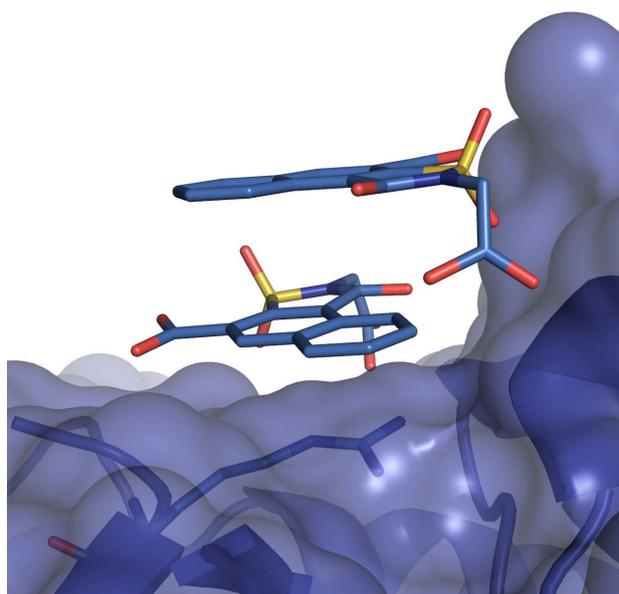
Es stellt sich die Frage, weshalb die experimentell beobachtete Orientierung des Liganden in der Simulation nicht die langlebige ist. Kristallstrukturen stellen räumliche und

zeitliche Mittelungen dar, welche bei niedrigen Temperaturen gemessen werden. Zudem können sogenannte Packungseffekte im Kristall auftreten. Ein Proteinkristall besteht aus einer dichten, sich periodisch wiederholenden Aneinanderreihung asymmetrischer Einheiten (Proteineinheiten). Zwischen einzelnen Molekülen zweier aneinandergrenzenden Proteineinheiten im Kristall können Wechselwirkungen auftreten. Diese können die auftretenden Konformationen und Orientierungen von Aminosäuren und Liganden beeinflussen. In der simulierten Lösung sind diese Kontakte unter physiologischen Bedingungen nicht möglich. Im Laufe von MD-Simulationen können daher durchwegs von der Kristallstruktur stark unterschiedliche Konformationen auftreten, die auch über einen längeren Zeitraum bestehen bleiben. Die Bedingungen, unter welchen diese ermittelt werden, sind nämlich gänzlich anders als jene bei experimentellen Beugungsexperimenten. Allerdings gibt es für diesen Fall bei Betrachtung der Kristallpackung keine unmittelbaren Hinweise auf Kontakte bzw. Wechselwirkungen zwischen Proteineinheiten.

Aufgrund der Tatsache, dass für die hier vorgestellte MD-Studie ein etabliertes Kraftfeld und eine literaturbewährte Simulationsprozedur angewandt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die im Simulationsverlauf auftretende Orientierung von Relevanz sind. Zudem liegt die von der Kristallstruktur abweichende ITA-Orientierung über den Großteil der Simulationszeit vor. Die ermittelten RMSD-Werte bleiben ebenfalls innerhalb vernünftiger Grenzen und bestätigen eine während der Simulationsdauer stabile Proteinstruktur.

## 5.4 MD-Simulationen der ITB-Komplexstruktur

Die Kristallstruktur dieses in Abb. 2.2 in seiner Strukturformel dargestellten Liganden ITB besitzt eine Auflösung von 1,55 Å und weist insgesamt drei Liganden auf: Einer besetzt das aktive Zentrum, während die beiden anderen in der Region um Arg 3 lokalisiert sind. Ein ITB-Molekül bildet eine Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung mit der Guanidiniumgruppe des erwähnten Restes aus, sowie eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit dem dritten ITB-Molekül (siehe Abb 5.12).



**Abbildung 5.12:**  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung der beiden ITB-Ligandenmoleküle in unmittelbarer Nachbarschaft zu Arg 3: Ausbildung einer Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung.

Die Spezifitätstasche liegt entgegen der Designhypothese dieses Tolrestat-Analogons im geschlossenen Zustand vor. Nichtsdestotrotz induziert die Bindung des Liganden Modifikationen in der Orientierung von Trp 20, einem Rest der sonst rigiden Anionenbindetasche. Diese Aminosäure erscheint im Vergleich zu anderen ALR2-Komplexen nämlich in ihrem  $\chi_2$ -Winkel ca.  $35^\circ$  rotiert, wodurch eine neue Untertasche geöffnet wird, die in keiner bisher verfügbaren Kristallstruktur beobachtet wurde. Diese Untertasche beherbergt den Naphthylteil des Liganden, der eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit dem Indolrest von Trp 20 ausbildet. Die neue Tasche ist zudem durch eine  $90^\circ$  Rotation des  $\chi_1$ -Winkels von Cys 298 erweitert, welches seine Seitenkette zur Spezifitätstasche hindreht. In den meisten Kristallstrukturen weist die Thiol-Gruppe von Cys 298 direkt auf Trp 20 hin.

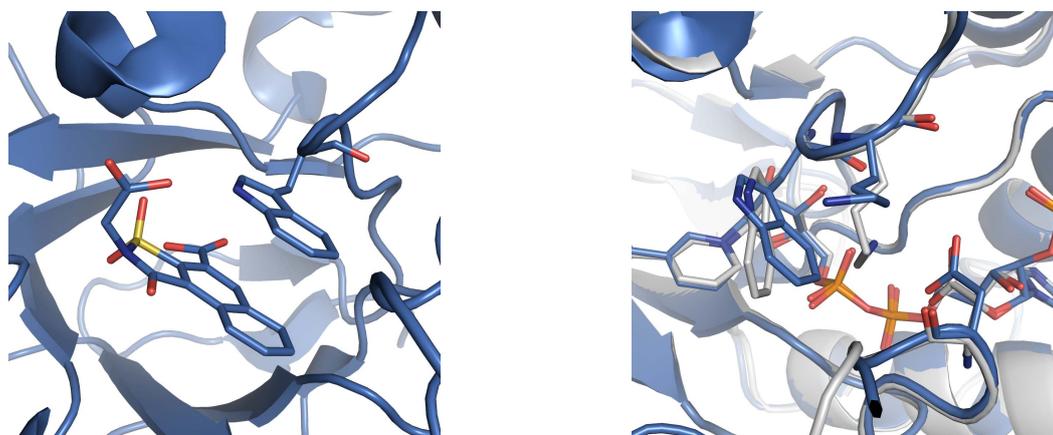
Betrachtet man den Bindemodus, so fällt auf, dass dieses Naphthoisthiazol-essigsäurederivat ITB, im Gegensatz zu dem in Unterkapitel 5.3 beschriebenen ITA, nicht mit der Carboxylatgruppe an der 2-Position ins katalytische Zentrum reicht, sondern mit jener, die direkt an der Naphthyleinheit in der 4-Position hängt. Ein Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe an der 2-Position befindet sich in einem Abstand von 3 Å zum Indol-Stickstoffatom von Trp 20 und könnte somit eine H-Brücke zu diesem ausbilden. Dafür ist eine abgewinkelte Geometrie am Sulfonamidstickstoff des Grundgerüsts notwendig, die zudem eine

sterische Abstoßung mit Phe 122 verhindert. Die pyramidale Geometrie von ITB ist in Abb. 5.13 dargestellt und sollte für einen Stickstoff vom Imid-Typ gegenüber einer planaren zwar benachteiligt sein, jedoch führen vermutlich Interaktionen mit dem umgebenden Protein zu einer Stabilisierung. Die beiden zusätzlich gebundenen ITB Moleküle weisen tatsächlich die bevorzugte planare Geometrie auf.

Die Öffnung der neuen Untertasche führt zu weiteren Änderungen im Bereich der Bindetasche. In allen bisher bekannten Kristallstrukturen der ALR2 bildet Lys 21 zwei Salzbrücken zu einer der Phosphatgruppen des Kofaktors NADP<sup>+</sup> sowie zur Carboxylatseitenkette von Asp 216 aus. In dem Falle der hier vorgestellten Kristallstruktur 2nvd führt die Rotation von Trp 20 um seinen  $\chi_2$ -Winkel zu einem Verlust dieser Kontakte zur Vermeidung sterischer Behinderungen mit Lys 21, welches hier solvensexponiert ist.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Kristallstruktur ist, dass Trp 219, eine Aminosäure der Spezifitätstasche, als nicht aufgelöst erscheint.

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden durchgeführte MD-Simulationen ausgehend von der 2nvd-Kristallstruktur mit und ohne gebundenem Liganden ITB beschrieben. Ein wichtiges Kriterium ist dabei auch die Modellierung von Trp 219. Dazu werden hier drei Varianten beschrieben (siehe nachfolgendes Unterkapitel 5.4.1) und für jede eine MD-Simulation gestartet.



**Abbildung 5.13:** *Links:* Pyramidale Geometrie des Sulfonamidstickstoffs im Liganden ITB; *Rechts:* Vergleich der Orientierungen von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 in den Komplexstrukturen von ITB (blau) und Tolrestat (grau): Rotation von Trp 20 um  $\chi_2$  Winkel ( $\sim 35^\circ$ ) und Solvensexponierung von Lys 21.

### 5.4.1 Modellierung von Trp 219

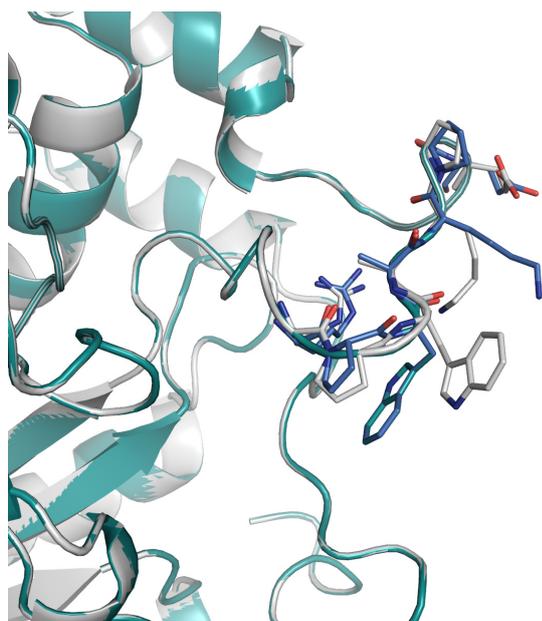
Wie bereits erwähnt, erscheint Trp 219, ein Rest der Spezifitätstasche von ALR2, in der ITB-gebundenen Kristallstruktur nicht aufgelöst. Vor dem Beginn einer MD-Simulation ist daher seine Einfügung entscheidend. In dieser Arbeit wurden drei Varianten der Modellie-

rung dieser Aminosäure ausgeführt.

Die erste **Variante A** besteht in einer Mutation des sichtbaren  $C\beta$ -Atoms von Trp 219 in ein Alanin und Rückmutation in ein Trp 219 durch das Programm MOE [324]. Auf diese Weise ist Trp 219 solvensexponiert wie in Abb. 5.14 in grau dargestellt.

Die zweite **Variante B** besteht in einer Einfügung des Loopbereichs von Arg 217 bis Glu 223 aus der Kristallstruktur 2nvc. Eine nachfolgende Minimierung vermindert Spannungen im Makromolekül. Diese Möglichkeit ist in der erwähnten Abbildung in blau eingefärbt. Durch die Einfügung eines sieben Aminosäuren umfassenden Loopbereiches sollten Spannungen an der interessierenden Aminosäure Trp 219 vermindert und an die Enden des eingefügten Loops verschoben werden. Trp 219 sollte sich in seiner näheren Loopumgebung bereits in einer stabilen Orientierung befinden.

Die dritte **Variante C** besteht schließlich darin, Trp 219 aus der 2nvc-Kristallstruktur zu entnehmen und in der darin vorliegenden Geometrie der Struktur 2nvd einzugliedern. Diese Variante ist in Abb. 5.14 in blaugrün dargestellt. Interessant ist es nun zu ermitteln, welchen Einfluss die drei Möglichkeiten der Trp 219 Modellierung in der MD-Simulation auf die Bindetasche ausüben.

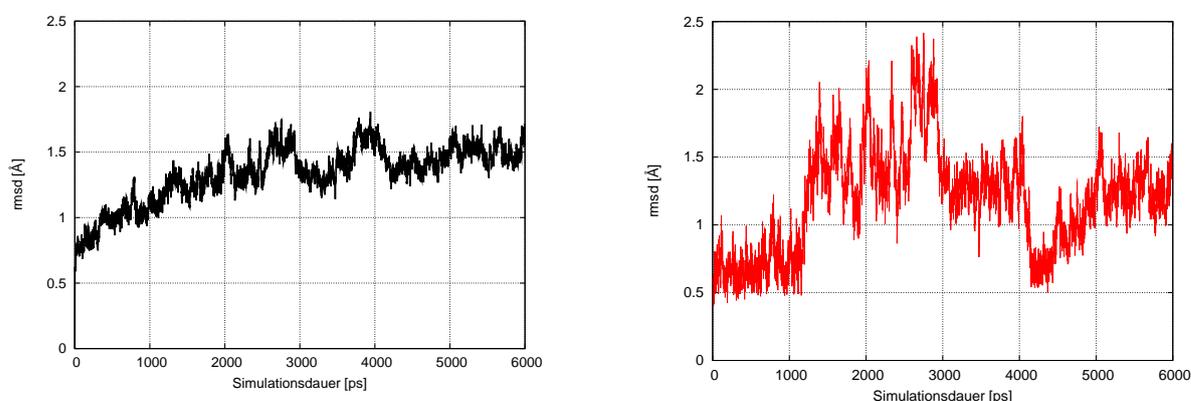


**Abbildung 5.14:** Vergleich der drei Varianten der Modellierung von Trp 219: **Variante A:** „Mutation“ zu Trp 219 (grau); **Variante B:** Einfügung des Loopbereichs Arg 217-Glu 223 aus 2nvc (blau); **Variante C:** Einfügung von Trp 219 aus 2nvc (blaugrün).

## 5.4.2 MD-Simulationen der ALR2-ITB-Komplexstruktur

### 5.4.2.1 Variante A

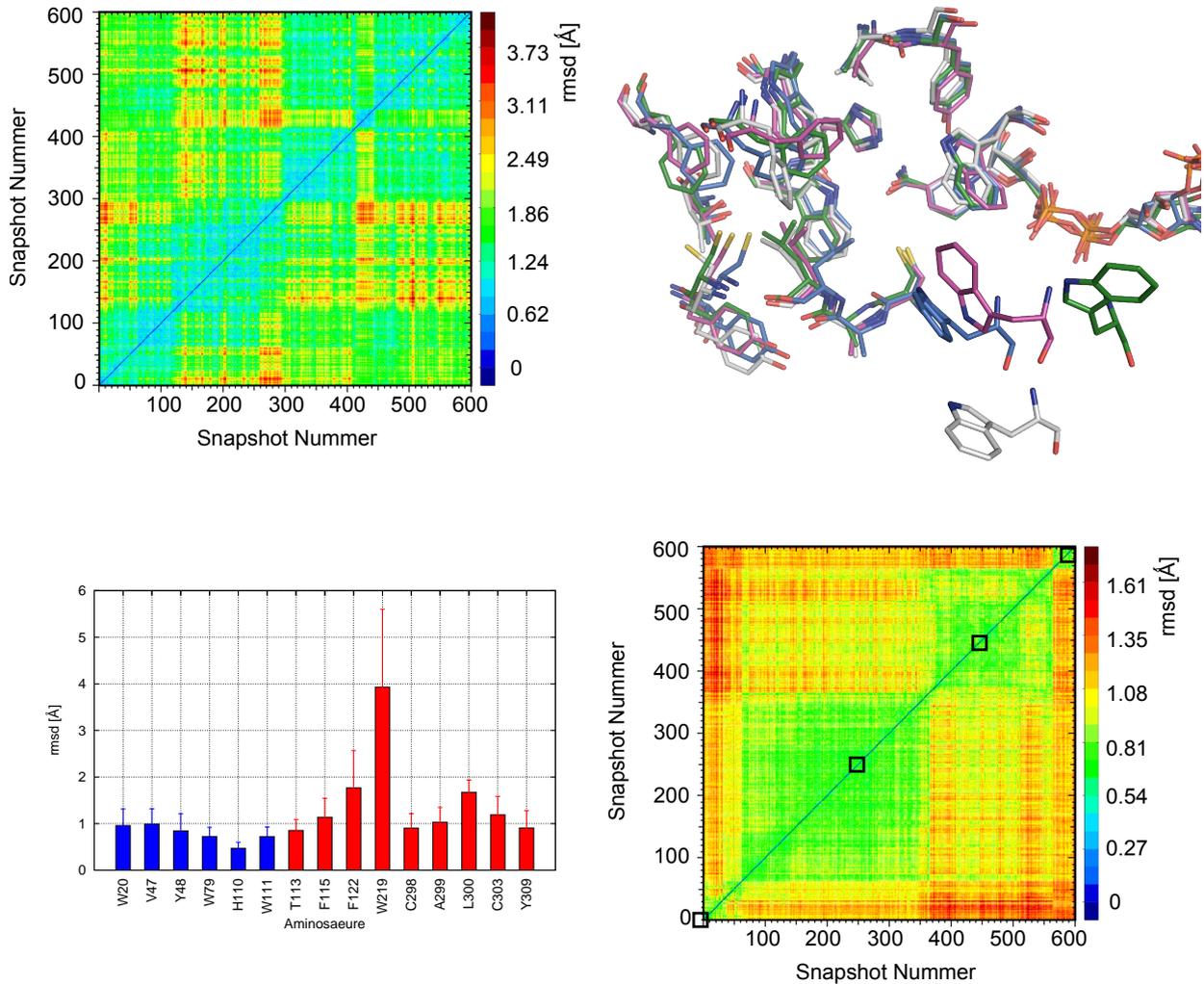
Für diese von der Kristallstruktur 2nvd ausgehende MD-Simulation, in welcher Trp 219 gemäß der in Unterkapitel 5.4.1 beschriebenen Methode eingefügt wurde, ergibt sich der Mittelwert der RMSD-Werte der  $C\alpha$ -Atome zu  $1,32 \pm 0,211$  Å. Werden nur die  $C\alpha$ -Atome der Aminosäuren der Bindetasche berücksichtigt, beträgt der Wert  $1,19 \pm 0,380$  Å. Bei Erweiterung auf alle Bindetaschenatome wächst der Wert auf  $1,59 \pm 0,469$  Å an. In Abb. 5.15 ist der Verlauf der  $C\alpha$ -RMSD-Werte dargestellt. Auffallend für die Reste der Bindetasche ist eine Schwankung zwischen anfänglichen 0,5 hin bis zu 2,5 Å.



**Abbildung 5.15:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns MD-Simulation nach Variante A: *Links:* Über gesamtes Protein; *Rechts:* über ALR2-Bindetasche.

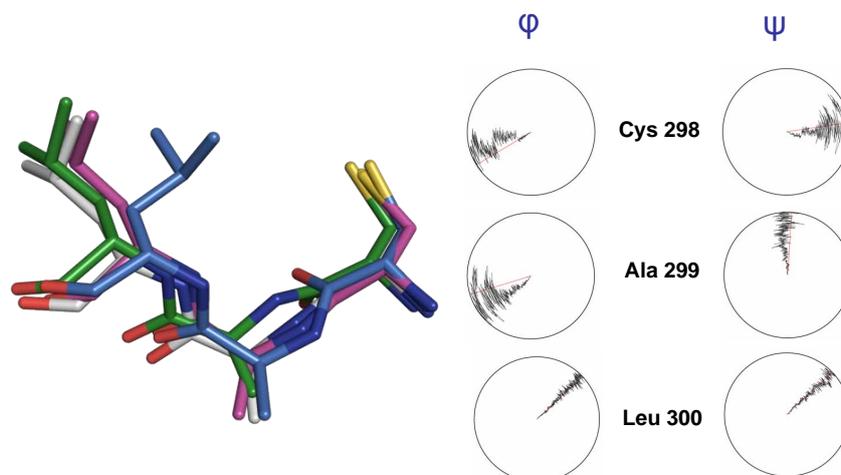
Der 2D-RMS Plot ergibt sowohl bei Berücksichtigung von Trp 219 als auch bei dessen Vernachlässigung keine eindeutige Einteilung in klar unterscheidbare Konformationen (Abb. 5.16). Näherungsweise lassen sich in dem 2D-RMS Plot ohne Berücksichtigung von Trp 219 aber 4 Cluster unterschiedlicher Konformation voneinander abgrenzen: Der erste betrifft die Strukturen unmittelbar am Simulationsbeginn (bis ca. 400 ps), der zweite den Bereich zwischen 400 und 3600 ps, der dritte den darauffolgenden Bereich bis 5600 ps und der vierte Cluster schließlich noch den verbleibenden Bereich bis zum Ende der 6 ns Simulation. Jedem dieser vier Bereiche wird ein Snapshot zur nachfolgenden Untersuchung entnommen. Eindeutig erkennbar ist eine Neuorientierung des eingeführten Trp 219 in dem Vergleich von Snapshots der Bindetaschen der Equilibrierungsendstruktur (blau) und aus der MD-Simulation nach 2501 (grün), 4401 (pink) und 5951 (silber) ps. Diese Neuorientierung erstreckt sich über die gesamte MD und ist für die sukzessive Erhöhung des Bindetaschen- $C\alpha$ -RMSD-Wertes verantwortlich. Klarerweise ist auch im Histogramm der „all-atom“-Bindetaschen-RMSDs Trp 219 die Aminosäure mit dem größten Beitrag. Trp 219 scheint sein Minimum im Proteinensemble zu suchen und von seiner anfänglichen

Position, in welcher es eingefügt wurde, wegzudriften.

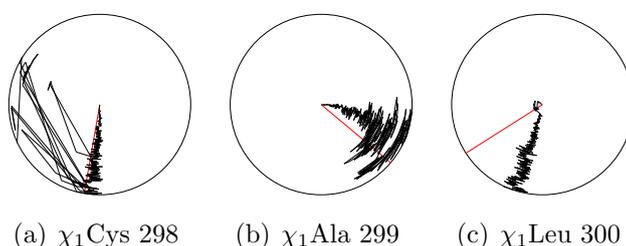


**Abbildung 5.16:** Überblick über die ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante A: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITB- Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach der Equilibrierung (blau), 2501 (grün), 4401 (pink) und 5951 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* 2D-RMS Plot ohne Berücksichtigung von Trp 219.

Bei Betrachtung der Bindetasche sind auch Veränderungen im Backbone-Bereich von Cys 298, Ala 299 und Leu 300 ersichtlich. Sowohl die  $\phi$ -,  $\psi$ - als auch die  $\chi_1$ -Werte zeigen diese Fluktuationen (Abb. 5.17 und 5.18).



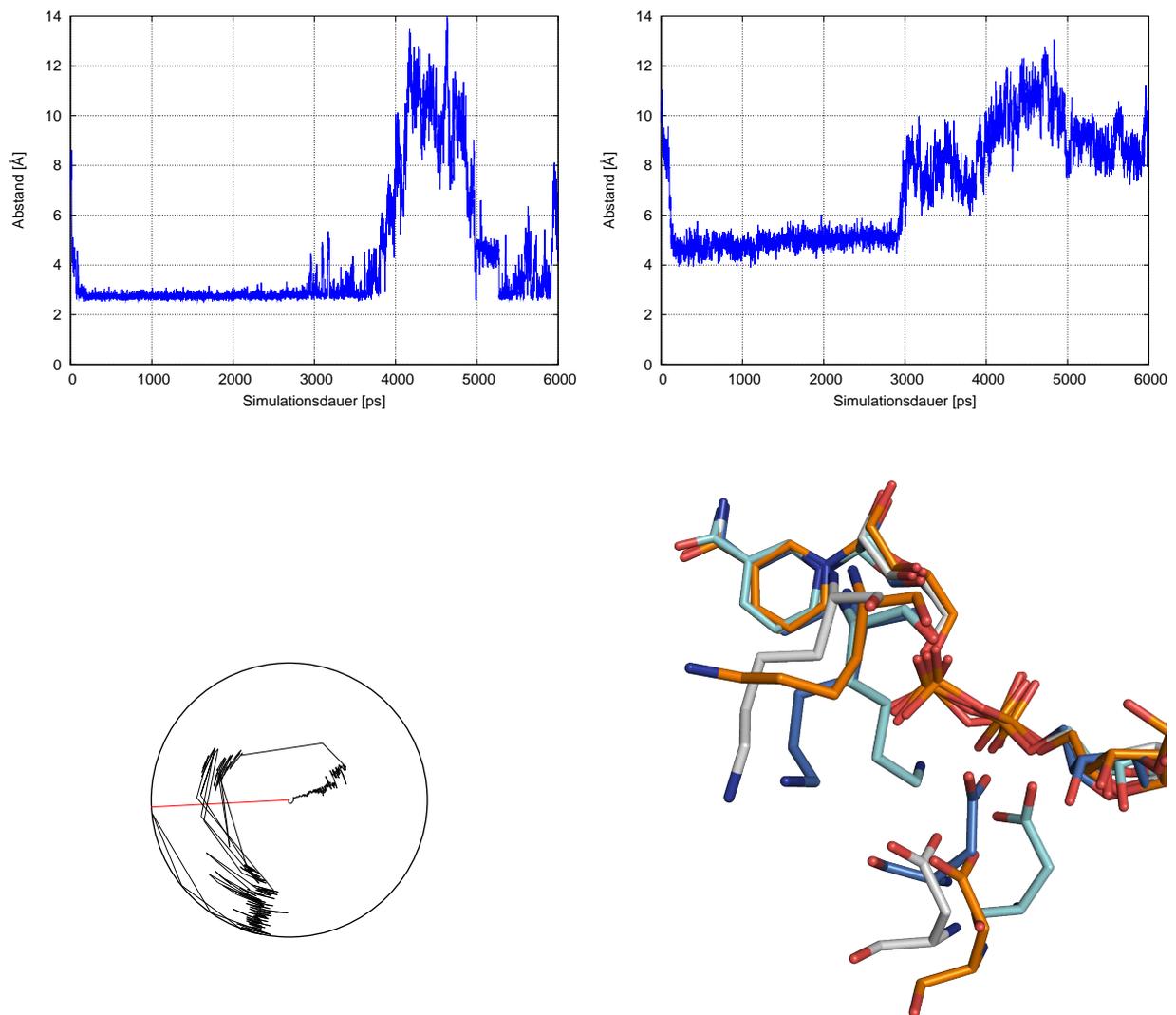
**Abbildung 5.17:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante A: Snapshots nach der Equilibrierung (blau), nach 2501 (grün), 4401 (pink) und 5951 (silber) ps MD-Simulation.



**Abbildung 5.18:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante A, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvd-Kristallstruktur.

In diesem Fall wurde das Verhalten von Lys 21 untersucht, das zu Beginn der Simulation ins Solvens weist und keine H-Brücke mit Asp 216 eingeht. Bereits sehr kurze Zeit nach Simulationsbeginn orientiert sich Lys 21 um und kommt mit seinem  $N\epsilon$ -Atom dem Carboxylat-O der Asp 216 Seitenkette nahe, so dass der Abstand auf 2,7 Å sinkt und eine Wechselwirkung zwischen beiden Partnern möglich ist. Diese bleibt bis ca. 3750 ps bestehen, ehe der Abstand plötzlich auf einen Wert von 14 Å durch Bewegungen sowohl der Lys 21 Seitenkette also auch der „safety-belt“-Region um Asp 216 anwächst. Gegen Ende der Simulation sinkt der Abstand dann aber wieder auf ca. 3 Å. Der Abstand zum Phosphatsauerstoff sinkt ebenfalls kurz nach Simulationsbeginn und bleibt bis 3000 ps auf einem nahezu konstanten Wert von 4,5 Å. Für die Ausbildung der Salzbrücke ist dieser Wert dennoch zu hoch, aber Lys 21 ist in dieser Orientierung stabilisiert und erst sobald die

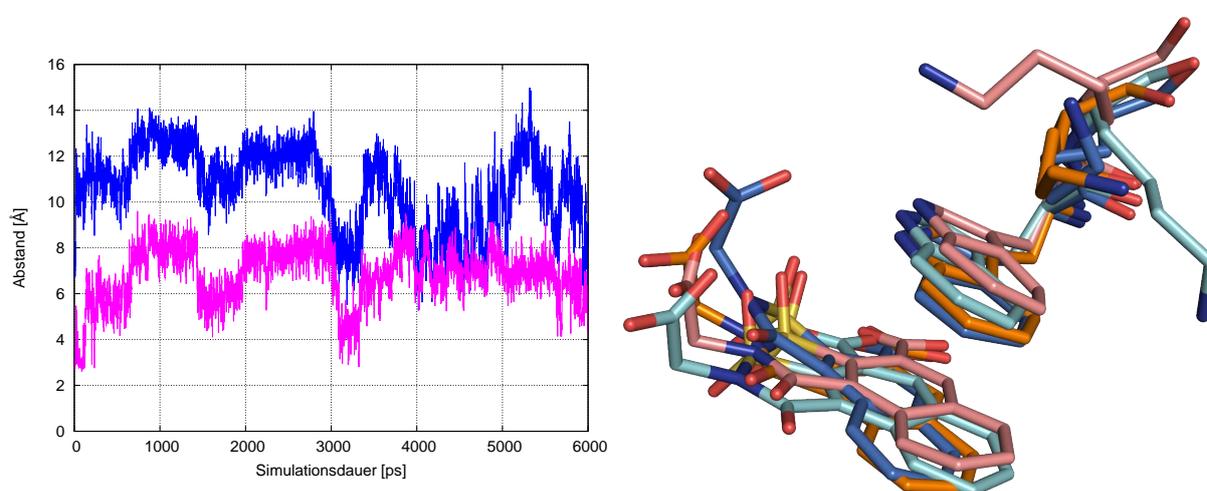
Salzbrücke zu Asp 216 gebrochen wird, steigt auch der Abstand zur Phosphatgruppe des Kofaktors nochmals an. Verdeutlicht wird dies auch durch die Änderungen des  $\chi_1$ -Winkels der Lys 21 Seitenkette, deren zeitliche Änderung besonders gut mit dem Phosphatabstand übereinstimmt (Abb. 5.19).



**Abbildung 5.19:** Verhalten von Lys 21 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante A: *Links oben:* Abstand zwischen N $\epsilon$  von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts oben:* Abstand zwischen N $\epsilon$  von Lys 21 und NADP<sup>+</sup>-Phosphatsauerstoff; *Links unten:*  $\chi_1$ -Winkel von Lys 21; *Rechts unten:* Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (blau), 1001 (cyan), 4501 (orange) und 5951 (silber) ps MD-Simulation.

Eine weitere Besonderheit der analysierten Komplexstruktur ist die in Unterkapitel 5.4 beschriebene pyramidale Geometrie des Sulfonamidstickstoffs im Liganden ITB. Es ist da-

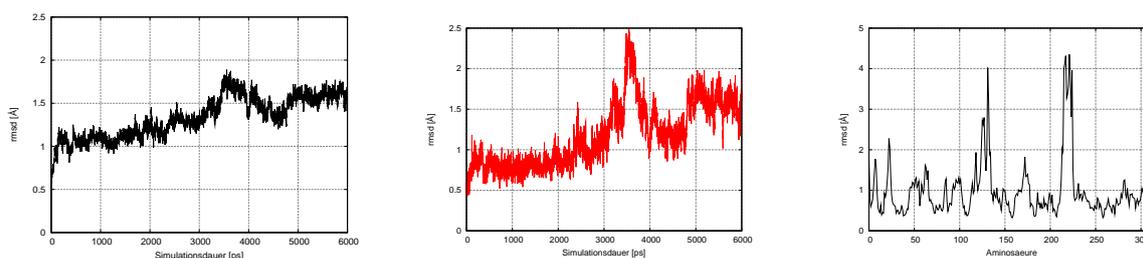
her von Interesse, das Verhalten dieses im Verlauf der Simulation zu beobachten. In Abb. 5.20 sind neben dem Liganden auch Trp 20 und Lys 21 als Stabmodell abgebildet. Trp 20 bleibt im Verlaufe der gesamten MD in der Orientierung der Kristallstruktur, Lys 21 dreht am Simulationsbeginn und -ende sehr stark. Der Ligand weicht von seiner ursprünglichen pyramidalen Geometrie im weiteren Simulationsverlauf ab. Demgemäß steigt auch der Abstand zwischen dem Carboxylat-O der Carbonsäurefunktion in 2-Position von ITB und dem Indol-N von Trp 20 in Abb. 5.20 (lila). Ab ca. 4000 ps bleibt der gemessene Abstand zwischen ITB und Trp 20 in etwa auf einem konstanten Wert. Die Vergrößerung des Abstandes zwischen Carboxylat-O der Carbonsäurefunktion in 2-Position von ITB und dem N $\epsilon$  von Lys 21 rührt hier von einer Verschiebung der Position von Lys 21 her (lachs- bzw. orangefarbener Snapshot in Abb. 5.20).



**Abbildung 5.20:** Verhalten des Liganden ITB im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante A: *Links:* Abstand zwischen dem Carboxylat-O der Carbonsäurefunktion in 2-Position von ITB und dem N $\epsilon$  von Lys 21 (blau) und Abstand zwischen dem Carboxylat-O der Carbonsäurefunktion in 2-Position von ITB und dem Indol-N von Trp 20 (lila); *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (blau), 1001 (cyan), 4501 (lachs) und 5201 (orange) ps MD-Simulation.

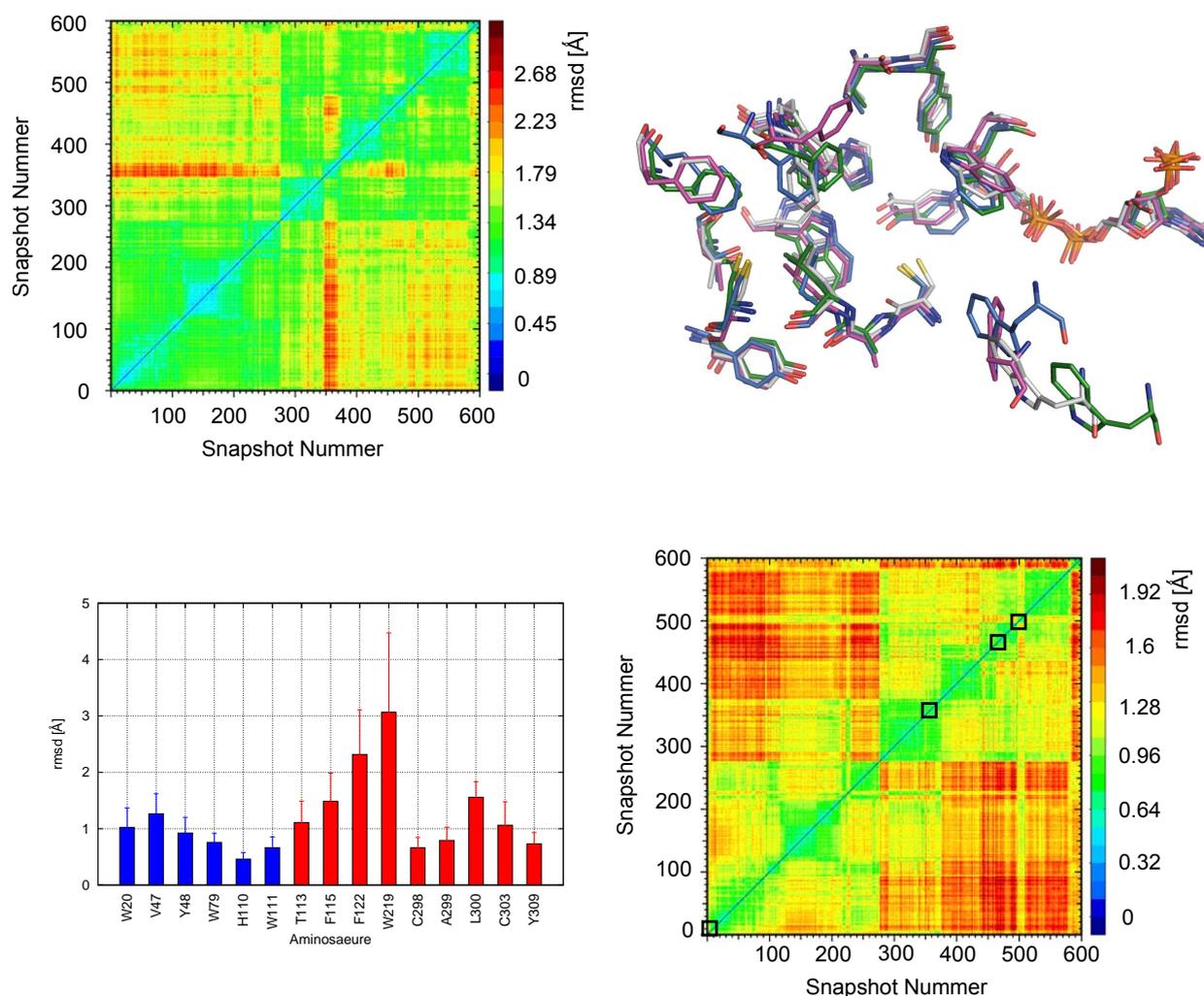
### 5.4.2.2 Variante B

In dieser Variante der Modellierung von Trp 219 wurde der Loopbereich von Arg 217 bis Glu 223 in die röntgenkristallografisch ermittelte Komplexstruktur eingeführt. Der durchschnittliche  $C\alpha$ -Wert gemittelt über die gesamte Simulationsdauer von 6 ns beträgt  $1,29 \pm 0,19$  Å. Für die  $C\alpha$ -Atome sowie alle Atome der Bindetaschenreste ergeben sich in diesem Fall die Werte von  $1,17 \pm 0,39$  und  $1,47 \pm 0,35$  Å. Die Auftragung der  $C\alpha$ -RMSD-Werte über das Gesamtprotein ergibt einen Drift in Richtung größerer Abweichungen, der sich über die Gesamtsimulationsdauer von 6 ns erstreckt und bei etwa 3500 ps ein Maximum aufweist. Dieses Maximum fällt in der Auftragung der entsprechenden Werte der Bindetaschenreste (Abb 5.21, Mitte) besonders auf. Innerhalb von 500 ps steigt der RMSD-Wert von ca. 1 Å bei 3000 ps auf 2.5 Å bei 3500 ps Simulation an. Die grafische Auftragung der zeitlich gemittelten  $C\alpha$ -RMSD-Werte jeder Aminosäure lässt eine Lokalisierung der größten Fluktuationen zu. Da der Loopbereich um den in der Kristallstruktur nicht aufgelösten Aminosäurenrest Trp 219 hier manuell eingefügt wurde, weist dieser Bereich auch die größten Abweichungen von der Ausgangsstruktur auf. Daneben sind auch die Werte im Loopbereich um Phe 122 erhöht (Abb 5.21, rechts).



**Abbildung 5.21:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B: *Links:* Über gesamtes Protein; *Mitte:* über ALR2-Bindetasche; *Rechts:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte der einzelnen Aminosäuren.

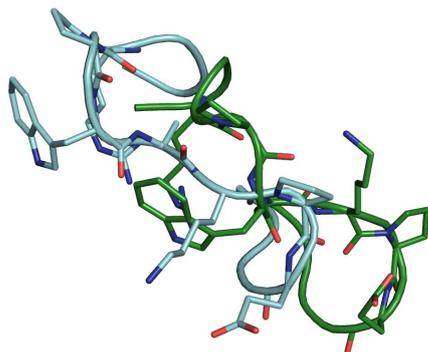
Diese beiden Reste zeigen auch mit Werten von  $2,32 \pm 0,79$  und  $3,07 \pm 1,41$  Å in dem Histogramm der „all-atom“-RMSD-Werte der Bindetaschenreste den höchsten Balken (Abb. 5.22, links unten). Die große Standardabweichung für Trp 219 deutet noch zusätzlich auf sein besonders flexibles Verhalten hin.



**Abbildung 5.22:** Überblick über die ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITB-Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 51 (blau), 3551 (grün) 4651 (pink) und 5001 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* 2D-RMS Plot ohne Trp 219.

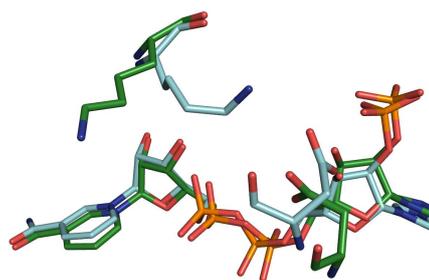
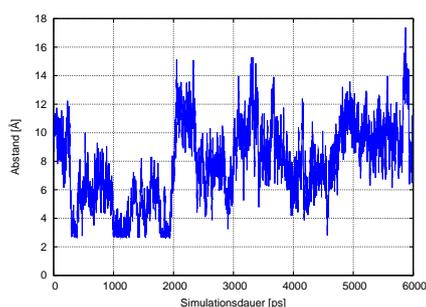
Diese starken Fluktuationen um Aminosäure Trp 219 sind auch der Grund, weshalb in dem ermittelten 2D-RMS Plot keine eindeutigen konformativen Cluster zu erkennen sind (Abb. 5.22, links oben). Wird Trp 219 vernachlässigt, werden Unterschiede deutlicher. Vier Snapshots wurden der Simulation entnommen und ihre Bindetaschen miteinander verglichen. Es handelt sich dabei um die Snapshots nach 51 (blau), 3551 (grün), 4651 (pink) und 5001 (silber) ps. Die Bindetasche nach 3551 ps zeigt besonders deutlich eine

starke Abweichung in der Position von Trp 219. Diese ist auch der Grund für den Anstieg der RMSD-Werte im Bereich von 3000-3500 ps und für den einzig erkennbaren Cluster im 2D-RMS Plot, welcher alle Aminosäuren der Bindetasche berücksichtigt. Folgerichtig verschwindet dieser auch, wenn Trp 219 nicht in die 2D-RMS Auftragung miteinfließt. Abbildung 5.23 zeigt die großen Bewegungen im eingefügten Loopbereich. Der  $C\alpha$ -Atom Abstand von Trp 219 beträgt zwischen dem Snapshot nach 1501 und 3551 ps 8,49 Å.



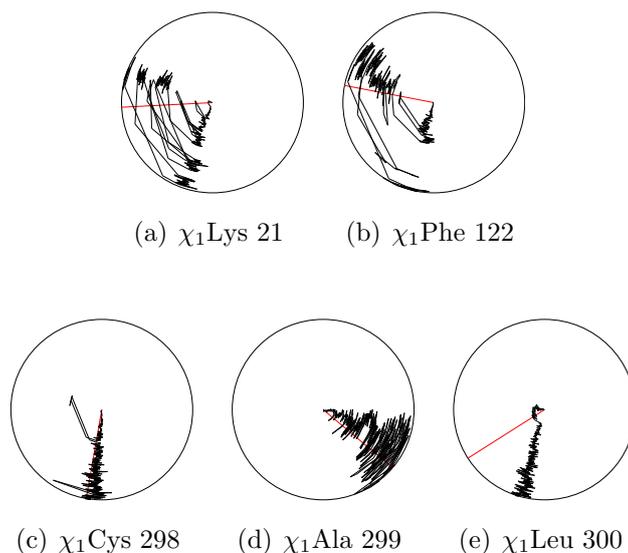
**Abbildung 5.23:** Safety-belt-Region in der ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B: Repräsentative Snapshots nach 1501 (cyan) und 3551 (grün) ps MD-Simulation.

Ein weiterer eindeutiger Hinweis für enorme Veränderungen in dem Loopbereich ergibt sich aus Abb. 5.24. Kurzfristig bildet sich die H-Brücke zwischen dem  $N\epsilon$ -Atom von Lys 21 und dem Carboxylat-O von Asp 216 aus, jedoch verhindern die großen Bewegungen in dem „safety-belt“-Bereich, zu dem auch Asp 216 gehört, dass diese längerfristig bestehen bleibt. Der gemessene Abstand variiert demgemäß stark.

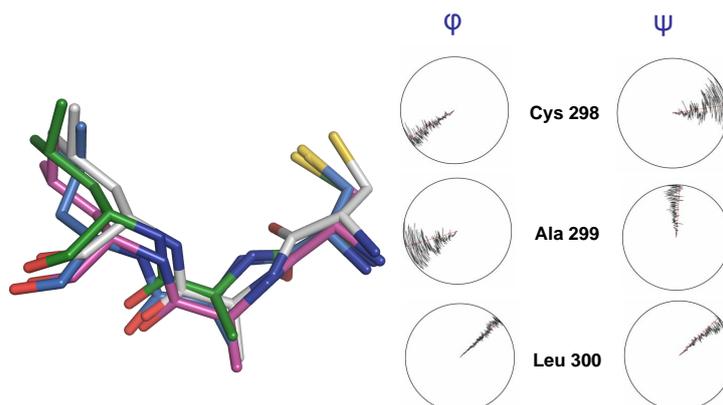


**Abbildung 5.24:** Verhalten von Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B: *Links:* Abstand zwischen  $N\epsilon$  von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach 1501 (cyan) und 3551 (grün) ps MD-Simulation.

Als Konsequenz fluktuiert auch Lys 21 relativ stark. Dies spiegelt sich vor allem auch in seinem  $\chi_1$ -Winkel wider, der in seinem Wert zwischen  $-70$  und  $-160^\circ$  hin- und herschwingt. Wie aus der Darstellung der Bindetasche hervorgeht, erfährt auch der  $\chi_1$ -Winkel von Phe 122 starke Änderungen im Verlauf der MD-Simulation, genauso wie das Backbone von Cys 298 bis Leu 300 mit seinen Seitenketten (Abb. 5.25 und Abb. 5.26).

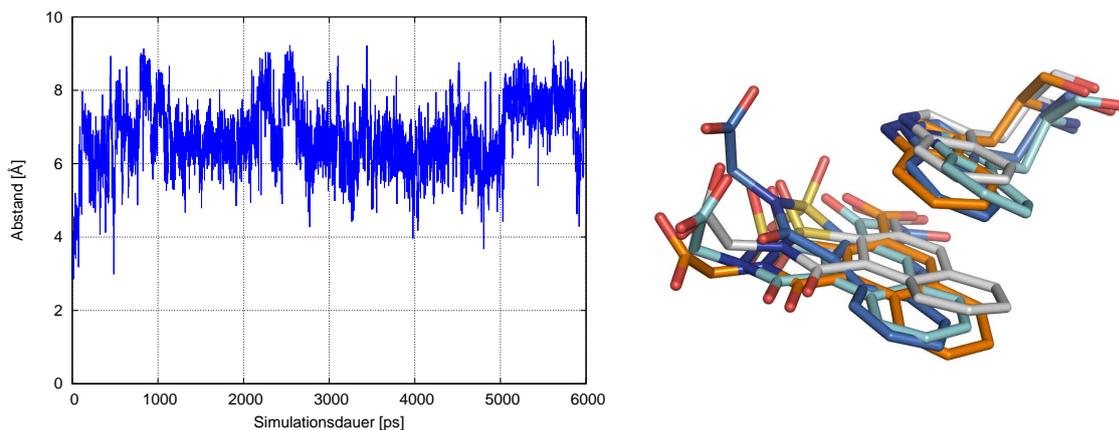


**Abbildung 5.25:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvd-Kristallstruktur.



**Abbildung 5.26:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B: Snapshots nach 51 (blau), 3551 (grün) 4651 (pink) und 5001 (silber) ps MD-Simulation.

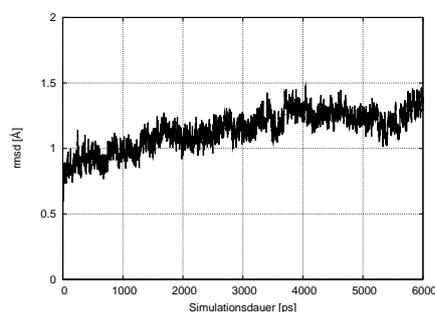
Was die pyramidale Geometrie des Liganden mit seinem Sulfonamidstickstoff betrifft, so geht dieser auch in dieser Variante B analog zu Variante A der Simulation in eine planare über (Abb. 5.27).



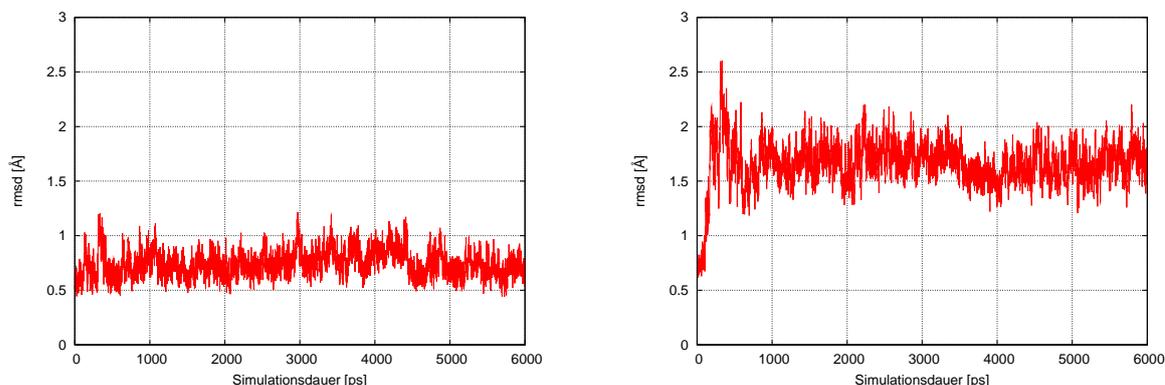
**Abbildung 5.27:** Verhalten des Liganden ITB im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante B: *Links:* Abstand zwischen dem Carboxylat-O der Carbonsäurefunktion in 2-Position von ITB und dem Indol-N von Trp 20; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach 51 (blau), 1501 (cyan), 5001 (silber) und 5951 (orange) ps MD-Simulation.

### 5.4.2.3 Variante C

Der durchschnittliche  $C\alpha$ -RMSD-Wert beträgt in dieser Simulation  $1,17 \pm 0,14 \text{ \AA}$ . Der entsprechende Wert für die 15 Aminosäuren der Bindetasche beträgt  $0,74 \pm 0,12 \text{ \AA}$ . Finden alle Atome der Bindetasche Berücksichtigung, ergibt sich ein Wert von  $1,66 \pm 0,22 \text{ \AA}$ . Der letztgenannte Wert, der in etwa doppelt so groß ist wie jener für die  $C\alpha$ -Atome der Bindetasche, lässt darauf schließen, dass konformative Veränderungen in den Seitenkettenbereichen der Bindetasche erfolgen. Während der zeitliche Verlauf der  $C\alpha$ -RMSD-Werte über das gesamte Protein (Abb. 5.28) und die Bindetasche keine ersichtliche starke Störung aufweist, zeigt der Graph für die Bindetaschenatome eindeutig zu Beginn der Simulation eine sprunghafte Erhöhung des RMSD-Wertes von  $0,7$  auf  $2,2 \text{ \AA}$  (Abb. 5.29).

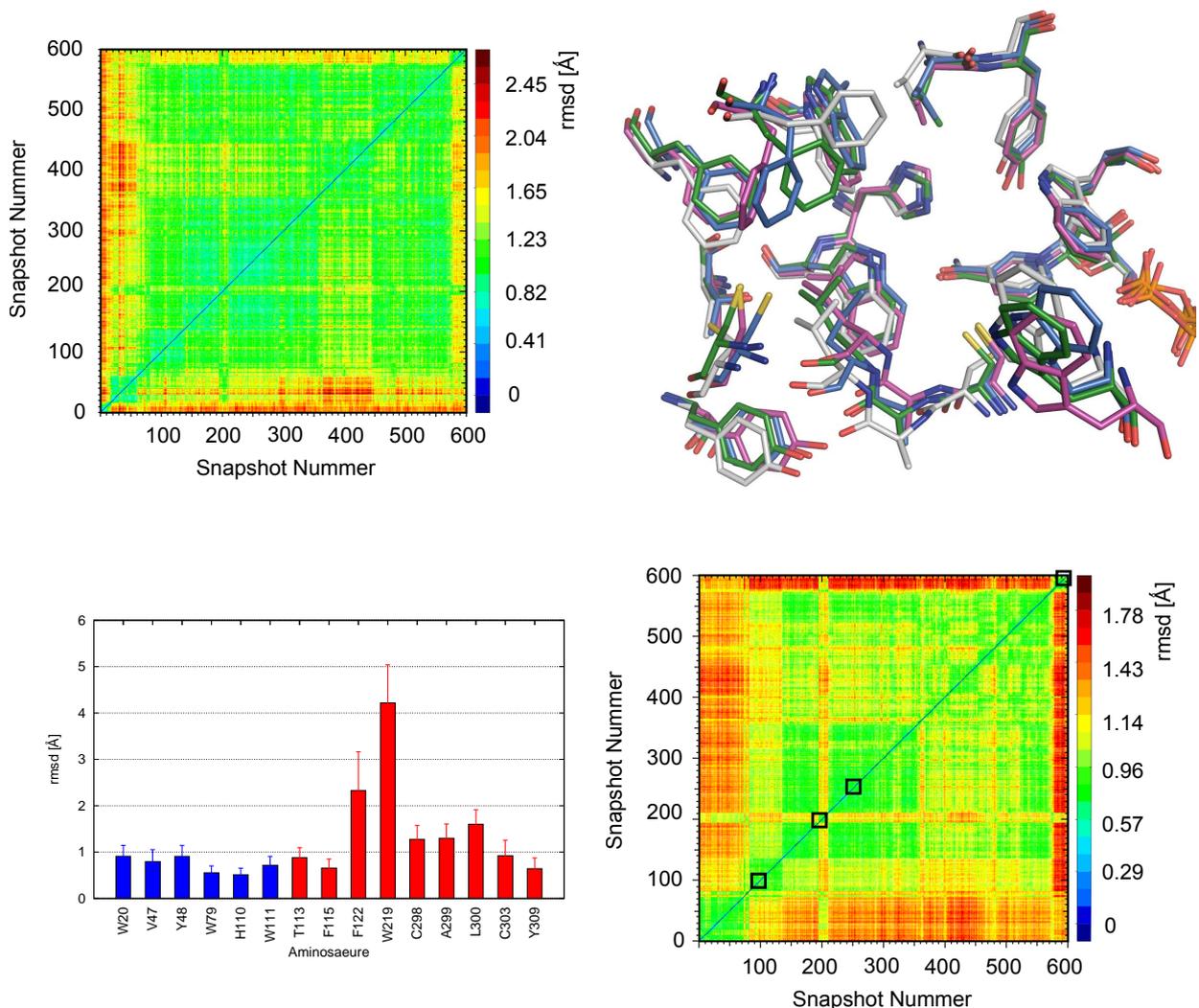


**Abbildung 5.28:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C.



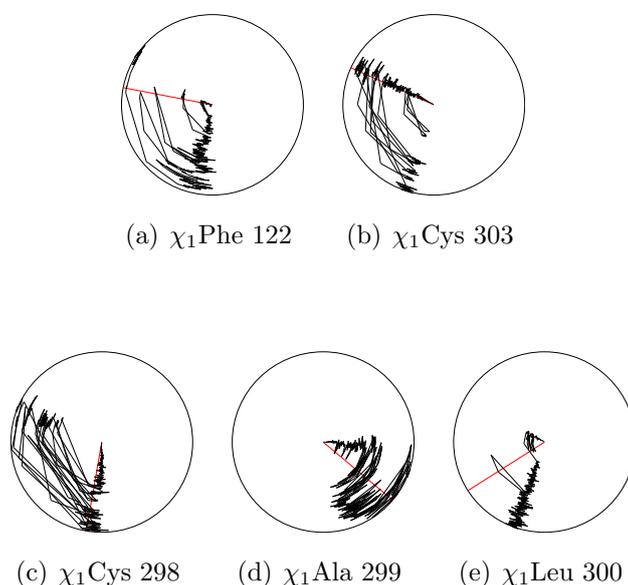
**Abbildung 5.29:** RMSD-Werte der Bindetasche im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C: *Links:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte; *Rechts:* „all-atom“-RMSD-Werte.

Betrachtet man die RMSD-Werte für jede Aminosäure der Bindetasche, wird klar, dass der größte Beitrag von Trp 219 und Phe 122 stammt. Für beide beträgt der Wert jeweils  $2,33 \pm 0,83$  und  $4,22 \pm 0,82$  Å. Eine Auftragung dieser Werte mit den zugehörigen Standardabweichungen erfolgte in Abb. 5.30 in einem Balkendiagramm. Aufgrund der großen Fluktuationen von Trp 219, das manuell der Struktur hinzugefügt wurde, erkennt man im 2D-RMS Plot auch keine eindeutigen Cluster. Bei Entfernung dieses Restes in der paarweisen Berechnung der RMSD-Werte über die Bindetasche und anschließender Erstellung eines solchen Plots, ist allerdings eine Unterscheidung verschiedener Bindetaschenkonformationen möglich. Die entsprechenden Snapshots nach 1001 (blau), 2001 (grün) 2501 (pink) und 5951 (silber) ps MD-Simulation wurden der Trajektorie entnommen und in Abb. 5.30 die Bindetaschen vergleichend analysiert.



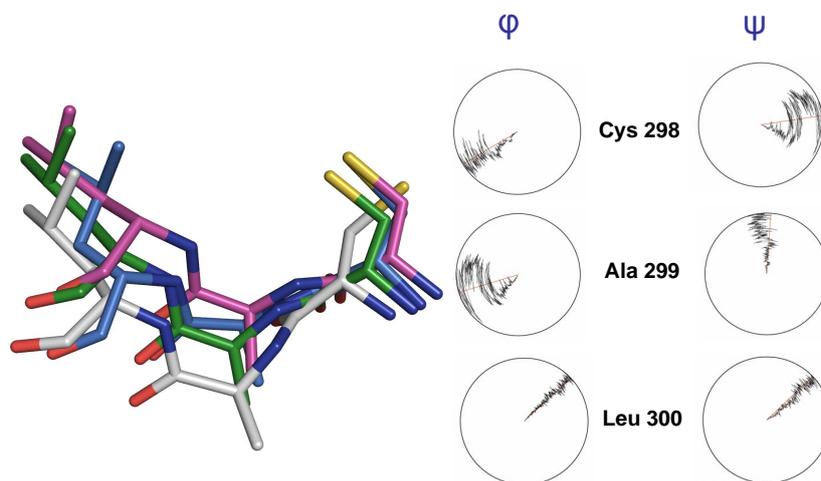
**Abbildung 5.30:** Überblick über die ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITB-Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 1001 (blau), 2001 (grün) 2501 (pink) und 5951 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* 2D-RMS Plot ohne Trp 219.

Auffallend ist natürlich die große Bewegung von Trp 219, daneben sind aber auch unterschiedliche Seitenkettenorientierungen von Phe 122, Cys 298, Ala 299, Leu 300 und Cys 303 erkennbar. Die zugehörigen Auftragungen der  $\chi_1$ -Winkel sind in Abb. 5.31 in einem Kreisdiagramm dargestellt.



**Abbildung 5.31:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvd-Kristallstruktur.

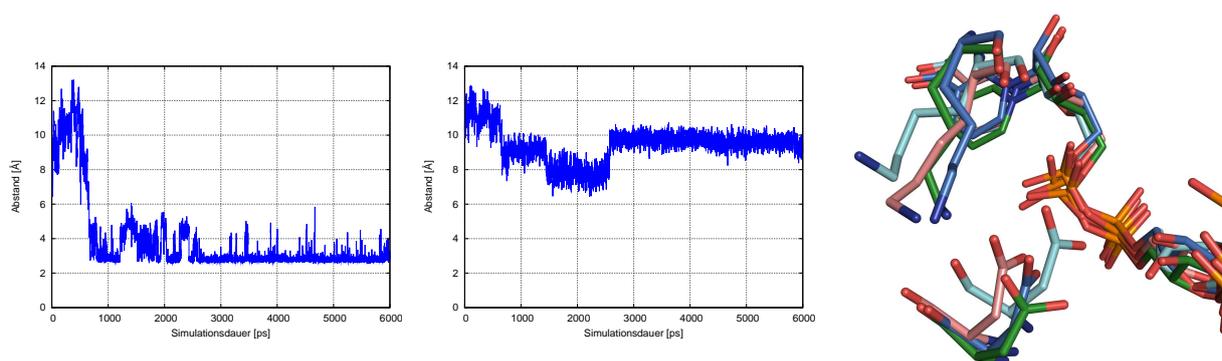
Das Backbone von Cys 298 bis Leu 300 zeigt entsprechend ebenfalls Fluktuationen vor allem im Bereich um Cys 298 und Ala 299 (Abb. 5.32).



**Abbildung 5.32:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C: Snapshots nach 1001 (blau), 2001 (grün) 2501 (pink) und 5951 (silber) ps MD-Simulation.

Die in Unterkapitel 5.4 beschriebene Solvensexponierung von Lys 21 wurde ebenfalls

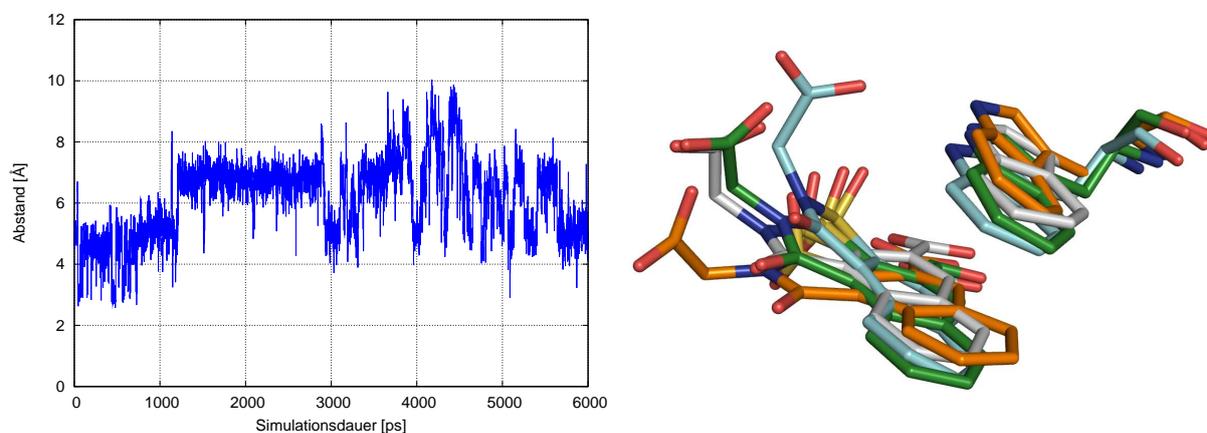
untersucht. Während dieser Rest in allen anderen bekannten Kristallstrukturen eine Salzbrücke sowohl zu einem Phosphatsauerstoffatom des Kofaktors  $\text{NADP}^+$  als auch zu einem Carboxylatsauerstoffatom der Asp 216 Seitenkette ausbildet, ist dies in der hier als Startstruktur der MD-Simulation herangezogenen, ITB-gebundenen Form nicht der Fall. Aus diesem Grund wurden in der folgenden Abb. 5.33 die Abstände zwischen dem  $\text{N}_\epsilon$ -Atom von Lys 21 und dem Carboxylatsauerstoffatom von Asp 216 sowie zwischen dem  $\text{N}_\epsilon$ -Atom von Lys 21 und einem Phosphatsauerstoffatom des Kofaktors während der 6 ns MD-Simulation gemessen. Der Abstand zur Asp 216 Seitenkette sinkt innerhalb der ersten 700 ps von anfänglichen 7,7 Å ab auf einen Wert um 2,8 Å, was für die Ausbildung einer H-Brücke zwischen beiden Wechselwirkungspartnern spricht. In der Auftragung des Abstandes zwischen dem Lys 21  $\text{N}_\epsilon$  und dem  $\text{NADP}^+$ -Phosphatsauerstoff sind 4 unterscheidbare Zustände ersichtlich, die allerdings alle weit über einen zulässigen Heteroatomabstand, wie er in typischen Salzbrücken auftritt, liegen. Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (cyan), 1001 (blau), 2001 (grün) und 3001 (lachs) ps Simulation sind in Abb. 5.33 rechts abgebildet und zeigen eine allmähliche Annäherung und somit H-Brückeninteraktion zwischen Lys 21 und Asp 216, während eine Annäherung an den Kofaktor nicht eintritt.



**Abbildung 5.33:** Verhalten von Lys 21 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C: *Links:* Abstand zwischen  $\text{N}_\epsilon$  von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216; *Mitte:* Abstand zwischen  $\text{N}_\epsilon$  von Lys 21 und  $\text{NADP}^+$ -Phosphatsauerstoff; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (cyan), 1001 (blau), 2001 (grün) und 3001 (lachs) ps MD-Simulation.

Analog zu den beiden vorhin beschriebenen Varianten A und B zeigt auch in diesem Fall der Ligand ITB eine Änderung der Ausgangsgeometrie am Sulfonamidstickstoff im Laufe der MD-Simulation. Eine mögliche H-Brücke zwischen dem Carboxylatsauerstoff der Carbonsäurefunktionalität in der 2-Position des Liganden und dem Indol-Stickstoffatom von Trp 20 könnte den Liganden in diese Geometrie zwingen. Daher wurde der Abstand zwischen diesen beiden Atomen betrachtet und in Abb. 5.34 aufgetragen. Nach etwa den ersten 1200 ps steigt der Abstand an, sobald der Ligand seine bevorzugte planare Geometrie am Sulfonamidstickstoff einnimmt. Ab etwa 3000 ps schwanken die Werte stärker, was mit einer Verschiebung des ITB-Aromatengerüsts zusammenhängt und in der Stabdarstellung

des Snapshots nach 4501 ps (orange) verdeutlicht wird.



**Abbildung 5.34:** Verhalten des Liganden ITB im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-Komplexsimulation nach Variante C: *Links:* Abstand zwischen dem Carboxylat-O der Carbonsäurefunktion in 2-Position von ITB und dem Indol-N von Trp 20; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (cyan), 2001 (grün), 4501 (orange) und 5951 (silber) ps MD-Simulation.

#### 5.4.2.4 Diskussion

Die in diesem Unterkapitel 5.4.2 beschriebenen MD-Simulationen mit gebundenem Liganden ITB unterscheiden sich voneinander in der Art und Weise wie das in der Kristallstruktur 2nvd nicht aufgelöste Trp 219 inseriert wurde (siehe Abschnitt 5.4.1). Ein Vergleich der Varianten A-C zeigt eine von der Einfügung des Trp 219 unabhängige Bindung des Liganden ITB in der Bindetasche. ITB verhält sich in allen drei Simulationsstudien bzgl. seiner Molekülgeometrie ident. Im Simulationsverlauf geht die anfangs pyramidale Geometrie am Sulfonamidstickstoff ziemlich rasch in eine energetisch begünstigte planare über. Die zur Platzierung des Liganden durch eine Rotation von Trp 20 um seinen  $\chi_2$ -Winkel geöffnete Untertasche bleibt in allen drei Simulationen immer bestehen. Lys 21, welches in der Kristallstruktur 2nvd zur Vermeidung sterischer Kollisionen mit Trp 20 solvensexponiert ist und als Folge dessen im Gegensatz zu allen übrigen bekannten Strukturen der ALR2 keine H-Brücke mit Asp 216 eingehen kann, vermag in Variante A sowie C diese wieder auszubilden. Diese beiden Varianten der Trp 219 Insertion beschränken sich nur auf eine Manipulation der einen Aminosäure, welche manuell der Struktur hinzugefügt wird. In Variante B wird der gesamte Loop-Bereich von Arg 217 - Glu 223 aus der 2nvc Struktur eingefügt. Konsequenterweise ergeben sich dadurch erhebliche Umorientierungen

im gesamten Loop, da dieser in seiner 2nvc Geometrie nicht mit dem vorhandenen ITB vereinbar zu sein scheint. Insbesondere jene Aminosäuren, welche die bereits vorhandenen mit den neu eingefügten Strukturbereichen verknüpfen, unterliegen immensen Fluktuationen. Asp 216 hat genau eine solche verknüpfende Position inne. Aus diesem Grund wird in der MD-Simulation nach Variante B die H-Brücke zwischen dem N $\epsilon$  von Lys 21 und dem Carboxylat-O von Asp 216 nicht eingegangen. Die „all-atom“-RMSD-Werte von Trp 219 sind aber in dieser Variante am kleinsten, weil sich sein Indolteil bereits in einer dem eingefügten Loop angepassten stabilen Position befindet, was für Variante A und C nicht der Fall ist. Hier sind die „all-atom“-RMSD-Werte von Trp 219 um ca. 1 Å höher.

Die bereits bekannte Flexibilität in dem „safety-belt“-Bereich der Aldose Reduktase hat sich in allen drei Simulationen bestätigt: Die Trp 219 Insertion an sich führt zu ausgeprägten Bewegungen in diesem Bereich. Auffallend ist auch, dass geringe Unterschiede in der Art und Weise der Einfügung dieser Aminosäure zu völlig anderem Verhalten in dem Loopbereich, aber auch im gesamten Protein, führen. Die eigentliche Bindung des Liganden ITB ist davon aber völlig unbeeinflusst. Zudem ergibt sich auch kein unmittelbar bevorzugter Aufenthaltsbereich von Trp 219, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass der Kontakt mit dieser Aminosäure für die Ligandenbindung in der Tasche nicht benötigt wird. Was die Gesamtheit des „safety-belt“-Bereichs betrifft, kann aufgrund der Tatsache, dass die Insertion des Loopbereiches von Arg 217 - Glu 223 aus 2nvc bei Variante B die größten Veränderungen/RMSD-Werte der Aminosäuren in der Bindetasche sowie um diese herum (Lys 21, Asp 216) provoziert, davon ausgegangen werden, dass diese Konformation eines größeren Loopabschnittes nicht mit dem in der Tasche vorhandenen Liganden ITB vereinbar ist. Auch der einnehmbare Konformationsraum des „safety-belt“-Bereichs ist damit ligandenabhängig.

### 5.4.3 Untersuchung der Molekülstruktur des Liganden ITB

Wie bereits in Kapitel 5.4 beschrieben, zeigt der Sulfonamidstickstoff am Naphthoisothiazol-essigsäureliganden ITB eine pyramidale Geometrie. Eine planare Geometrie sollte für einen Stickstoff vom Imin-Typ günstiger sein. Es stellt sich daher die Frage, weshalb in der Kristallstruktur, die in der Regel eine Minimumsstruktur darstellt, ITB in genau dieser Geometrie erscheint. Die genannte Kristallstruktur beinhaltet auch weitere zwei im Randbereich des Proteins lokalisierte Ligandenmoleküle (siehe Abb. 5.12). Diese zeigen tatsächlich die erwartete planare Geometrie am Sulfonamidstickstoff, was die Vermutung nahe legt, dass das in der katalytischen Tasche gebundene Ligandenmolekül in seiner ungewöhnlichen Geometrie durch Wechselwirkungen mit dem umgebenden Protein stabilisiert wird. Eine mögliche Ursache könnte bei genauerer Betrachtung der den Inhibitor umgebenden Aminosäuren die Ausbildung einer H-Brücke zwischen der Carboxylatgruppe, die über eine Methylenbrücke an der 2-Position von ITB hängt, und dem Indol-Stickstoff von Trp 20 sein. Auf diese Weise erhält der ITB-Stickstoff eine abgewinkelte Geometrie, wodurch auch sterische Behinderungen mit Phe 122 vermieden werden. Abb. 5.13 in Kapitel 5.4 zeigt die Geometrie am Sulfonamidstickstoff des Liganden und den möglichen Wechselwirkungspartner Trp 20.

In den folgenden beiden Abschnitten soll nun zunächst die Stärke der möglichen H-Brücke zwischen Trp 20 und ITB quantenmechanisch abgeschätzt werden, bevor MD-Simulationen mit veränderten Parametern die Geometrie am Sulfonamidstickstoff im verwendeten Kraftfeld bewerten.

#### 5.4.3.1 Quantenmechanische Berechnung der H-Brückenstärke zwischen Trp 20 und ITB

In diesem Kapitel wird die Möglichkeit einer Abschätzung der H-Brückenstärke zwischen Trp 20 und ITB mit Hilfe quantenmechanischer Berechnungen aufgezeigt. Formal ergibt sich die Stärke einer H-Brücke als Differenz der Energie des geometrieoptimierten H-Brückenkomplexes und der Summe der individuell geometrieoptimierten Einzelmoleküle, sprich H-Brückenakzeptor und -donor:

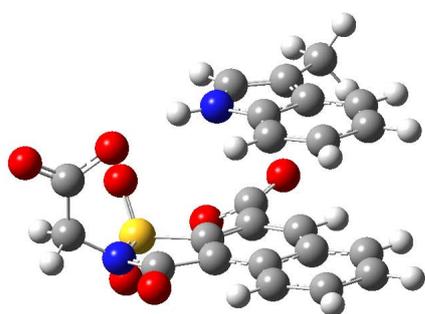
$$\Delta E_{HB} = E_{AD} - (E_D + E_A) \quad (5.1)$$

In der angeführten Formel sind  $\Delta E_{HB}$  die H-Brückenstärke,  $E_{AD}$  die Energie des geometrieoptimierten Komplexes,  $E_D$  und  $E_A$  die Energien des jeweils geometrieoptimierten H-Brückendonors und -akzeptors. Allerdings müssen hier noch Korrekturen durchgeführt werden, die sich aus der quantenmechanischen Beschreibung ergeben. So muss der sogenannte **Basissatzsuperpositionsfehler BSSE** Berücksichtigung finden sowie eine Korrektur der Nullpunktsenergie **Zero Point Energy ZPE** durchgeführt werden. Für die vollständig korrigierte H-Brückenstärke ergibt sich demnach die Formel:

$$\Delta E_{HB} = E_{AD} - (E_A + E_D) + \mathbf{ZPE} + \mathbf{BSSE} \quad (5.2)$$

Aufgrund vorhergehender Studien [325] wird in diesem Fall auf eine BSSE- und ZPE-Berechnung verzichtet. Zudem wird hier keine Geometrieoptimierung durchgeführt, da

hier konkret für den Fall der pyramidalen Ligandengeometrie die Energie ermittelt werden soll und eine Optimierung den Sulfonamidstickstoff in eine planare Geometrie zwingen würde. Daher wird die Energie aller E-Terme aus Gleichung 5.1 über eine Single-Point-Energieberechnung durchgeführt. Als Methode zur Energieberechnung wurde die Dichtefunktionaltheorie gewählt und der Basissatz 6-31+G(d) angewandt. Die Berechnungen erfolgten mit dem Quantenmechanik-Programmpaket Gaussian03 [314]. Als Modellsystem zur Abschätzung der H-Brückenstärke zwischen der Aminosäure Trp 20 und dem Liganden diente das System in Abb. 5.35, in welchem Trp 20 durch ein 3-Methylindol imitiert wird.



**Abbildung 5.35:** H-Brücke zwischen Trp 20 und dem Liganden ITB.

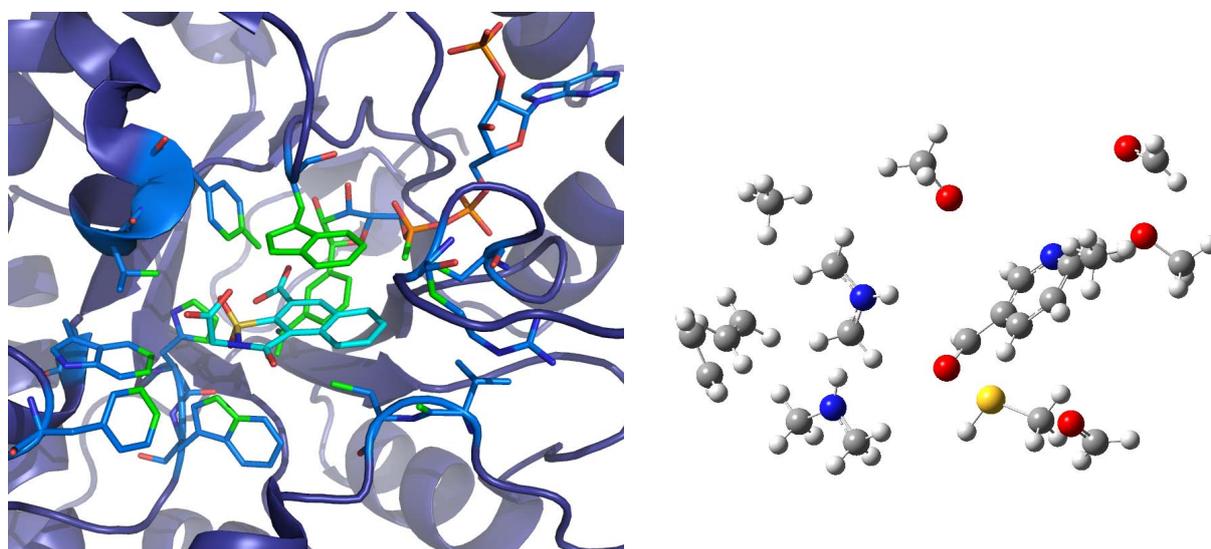
Die Berechnungen im Vakuum liefern folgende Ergebnisse (Tabelle 5.1):

**Tabelle 5.1:** B3LYP-6-31+G(d) berechnete Energien zur Ermittlung der Wasserstoffbrückenstärke  $\Delta E_{HB}$  [kcal/mol] im Vakuum.

Energie-Term	Energie
$E_D$ [hartree]	-403,145
$E_A$ [hartree]	-1517,187
$E_{AD}$ [hartree]	-1920,359
$\Delta E_{HB}$ [hartree]	-0,027
$\Delta E_{HB}$ [kcal/mol]	-16,899

Die H-Brückenstärke in dem kleinen Modellsystem beträgt somit -16,90 kcal/mol. Dieser vermeintlich große Wert liegt in einer negativen Ladung an der Carboxylatgruppe von ITB begründet. Eine vergleichende Berechnung, in dem 3-Methylindol durch ein 1H-Inden ersetzt wurde und somit kein möglicher H-Brückendonator in dem System vorliegt, ergab einen Wert von -3,47 kcal/mol und ist somit um ca. 13,4 kcal/mol ungünstiger. Wie erwähnt,

erfolgte die Berechnung im Vakuum, allerdings wäre es von unbedingtem Interesse auch die Umgebung der Wechselwirkungspartner, sprich die nähere Umgebung im Protein, in die Energiebestimmungen miteinzubeziehen. Aus diesem Grund wurden zunächst alle Atome der umgebenden Aminosäuren bzw. des Kofaktors NADP<sup>+</sup> bestimmt, die innerhalb eines Abstandes von 4 Å um den Liganden ITB lokalisiert sind. Daraufhin wurden diese Atome in kleine Modellmoleküle eingebaut und als Bestandteile dieser nach wie vor dort lokalisiert, wo sie auch in der Kristallstruktur vorzufinden sind. Die nachfolgende Abb. 5.36 visualisiert die gewählte Vorgehensweise zur Umgebungsmodellierung erklärend. Dabei werden in der linken Grafik die im Umkreis von 4 Å um den Liganden (cyan) liegenden Atome grün hervorgehoben, die anschließend in kleinere Moleküle eingebaut werden, welche in der rechten Grafik der Abbildung ausschließlich dargestellt sind und die reine Umgebung bilden, die für die folgende Berechnung herangezogen wird.



**Abbildung 5.36:** Umgebung der H-Brücke zwischen Trp 20 und dem Liganden ITB: *Links:* Atome im Umkreis von 4 Å (grün) von Inhibitor ITB (cyan); *Rechts:* Modellsystem der Umgebung von Inhibitor ITB.

In der somit definierten Umgebung, die aufgrund ihrer Atomanzahl durchwegs tragbar für quantenmechanische Berechnungen ist, wurde nun die H-Brückenstärke (mit derselben DFT-Methode wie im Vakuum) zwischen 3-Methylindol und dem Inhibitor ITB bestimmt. Zu diesem Zweck wurden analog zur Studie im Vakuum folgende Singlepoint-Energien ermittelt, nun allerdings jeweils innerhalb der vereinfachten und modellierten Proteinumgebung  $U$ , die in Abb. 5.36 rechts dargestellt ist: Die Energie des H-Brückenkomplexes  $E_{ADu}$ , des H-Brückenakzeptors (ITB)  $E_{Au}$  und des H-Brückendonors (3-Methylindol)  $E_{Du}$ . Zudem wurde auch der Singlepoint-Energiewert der vereinfachten Proteinumgebung  $E_U$  ohne eingebetteten H-Brückenkomplex, -akzeptor oder -donor bestimmt. Die Berechnung der H-Brückenstärke  $\Delta E_{HB}$  erfolgte im Detail gemäß Gleichung 5.3.

$$\Delta E_{HB} = E_{ADu} - (E_{Au} + E_{Du} - E_U) \quad (5.3)$$

Die einzelnen ermittelten Energien sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Es ergibt sich hierfür eine H-Brückenstärke von -12,30 kcal/mol in der modellierten Proteinumgebung.

**Tabelle 5.2:** B3LYP-6-31+G(d) berechnete Energien zur Ermittlung der Wasserstoffbrückenstärke  $\Delta E_{HB}$  [kcal/mol] in vereinfachter Proteinumgebung.

Energie-Term	Energie
$E_D$ [hartree]	-2172,314
$E_A$ [hartree]	-3286,354
$E_{AD}$ [hartree]	-3689,517
$E_U$ [hartree]	-1769,171
$\Delta E_{HB}$ [hartree]	-0,020
$\Delta E_{HB}$ [kcal/mol]	-12,296

Der Wert ist um 3,6 kcal/mol weniger günstig als jener im Vakuum. Das elektrostatische Potential wurde bereits in Abschnitt 3.1 definiert und ist noch einmal in der folgenden Gleichung 5.4 angeführt:

$$V(r) = \sum_{i < j}^{Atome} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (5.4)$$

$\epsilon$  ist dabei die Dielektrizitätskonstante des Mediums. Diese wird häufig durch die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  ersetzt. Diese ergibt sich zu  $\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0$ .  $\epsilon_0$  ist die elektrische Feldkonstante, eine Naturkonstante. Die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  von Wasser beträgt 78,3, jene für Vakuum 1. Die Dielektrizitätskonstante des Mediums gibt gemäß der Formel 3.6 den Faktor an, um den die elektrostatische Wechselwirkung zwischen zwei Ladungen in einem Medium gegenüber der elektrostatischen Wechselwirkung der beiden Ladungen im Vakuum geschwächt wird. Da in der hier modellierten Proteinumgebung eine relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r > 1$  simuliert wird, folgt eine gegenüber der reinen Berechnung im Vakuum verringerte Wasserstoffbrückenstärke.

Aufgrund der hier durchgeführten Studie gilt es als durchwegs wahrscheinlich, dass die H-Brücke zwischen Trp 20 und dem Liganden ITB einen wesentlichen Beitrag zur pyramidalen Geometrie am Sulfonamidstickstoff des Inhibitors in der Kristallstruktur 2nvd leistet. Der ermittelte Wert der (geladenen) H-Brücke im Vakuum steht in guter Übereinstimmung mit anderen Studien, die ebenfalls mit Hilfe der DFT H-Brückenstärken kleinerer Systeme im Vakuum berechnen [326, 325]. So liefert eine H-Brücke zwischen Anilin und einem Acetatanion bei Berechnung mit DFT und dem 6-31+G(d,p)/6-311+G(2df,2pd) Basissatz

einen Energiewert von -17,9 kcal/mol.

Wie bereits beschrieben, wäre eine planare ITB-Konformation begünstigt, doch führt eine H-Brücke zwischen seiner Carboxylatgruppe, die über eine Methylenbrücke an der 2-Position von ITB hängt, und dem Indol-Stickstoff von Trp 20 zur Ausbildung einer pyramidalen Struktur am ITB-Sulfonamidstickstoffatom. In dem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, wie groß die Energiedifferenz zwischen planarer und pyramidalen Konformation des ITB-Liganden ist. Auch zu diesem Zweck wurden quantenmechanische Berechnungen durchgeführt. Wie im Falle der Bestimmung der H-Brückenstärke wurde auch hier eine DFT-Berechnung mit dem 6-31+G(d) Basissatz gewählt. Die Carboxylatgruppe, welche über eine Methylengruppe mit dem ITB-Grundgerüst verbunden ist, weicht in einem Winkel von  $36,7^\circ$  von der planaren Ringebene ab. Damit aber dieser Winkel auch im Laufe der quantenmechanischen Berechnung bestehen bleibt, wird ein Diederwinkel entlang der Atome C1, S2, N3 und C4 (siehe Abb. 5.37) während der Geometrieoptimierung fixiert. Es wird nun die Differenz der Energien  $E_{barr}$  zwischen der geometrieoptimierten, aber nach wie vor pyramidalen  $E_{pyramidal}$  und der geometrieoptimierten, planaren ITB-Struktur  $E_{planar}$  berechnet (siehe Gleichung 5.5 und Abb. 5.37). Der ermittelte Wert für  $\Delta E_{barr}$  beträgt -2,66 kcal/mol.

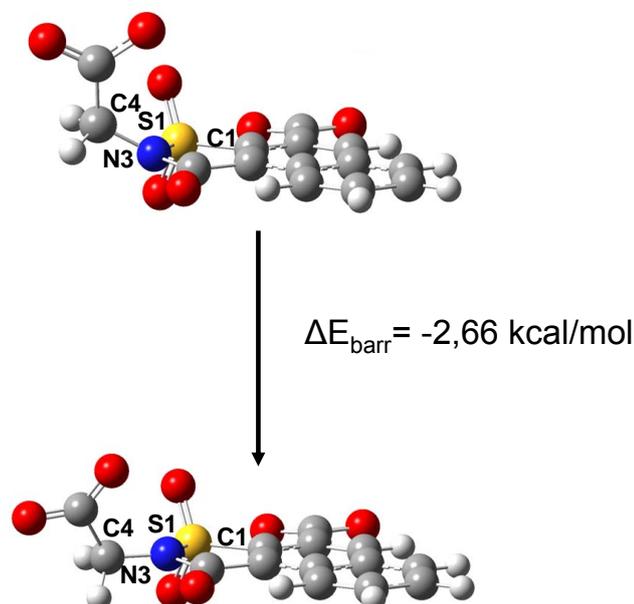
$$\Delta E_{barr} = E_{pyramidal} - E_{planar} \quad (5.5)$$

Im Detail sind die quantenmechanisch ermittelten Energien in nachfolgender Tabelle 5.3 aufgelistet.

**Tabelle 5.3:** Energiedifferenz  $\Delta E_{barr}$  [kcal/mol] zwischen pyramidalen und planarer ITB-Struktur.

Energie-Term	Energie
$E_{pyramidal}$ [hartree]	-1517,299
$E_{planar}$ [hartree]	-1517,303
$\Delta E_{barr}$ [hartree]	0,004
$\Delta E_{barr}$ [kcal/mol]	2,656

Die planare Anordnung der Atome um den Sulfonamidstickstoff wäre um 2,66 kcal/mol günstiger als die in der Kristallstruktur 2nvd beobachtete pyramidale. Dieser Energieverlust, den ITB eingeht, wird aber durch die Wasserstoffbrücke zwischen seiner Carboxylatgruppe in 2-Position des aromatischen Grundgerüsts und dem Indol-N von Trp 20 wettgemacht. Der durch die Wasserstoffe verursachte Energiegewinn beträgt ca. 16,90 kcal/mol (im Vakuum berechnet) bzw. 12,30 kcal/mol (in vereinfachter Proteinumgebung berechnet), was einen Nettogewinn von ca. 14,20 bzw. 9,70 kcal/mol durch die eingegangene Wasserstoffbrücke bei pyramidalen Geometrie ergibt.



**Abbildung 5.37:** Energiegewinn beim Übergang von pyramidaler zu planarer ITB-Struktur.

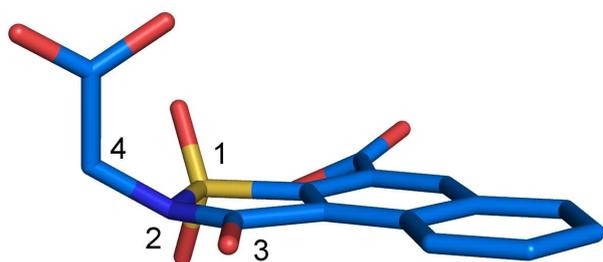
#### 5.4.3.2 MD-Simulationen der ITB-Komplexstruktur mit veränderten Parametern

Wie in Unterkapitel 5.4 erklärt, besitzt das Sulfonamidstickstoffatom des Naphthoisothiazol-essigsäurederivates ITB pyramidale Geometrie, obwohl eine planare hier bevorzugt wäre. In allen Varianten der ITB-Komplexsimulationen wurde beobachtet, dass der Ligand im Laufe des Fortschreitens der MD-Simulation in eine planare Konformation gezwungen wird. Der Grund dafür liegt in dem verwendeten Kraftfeld und den darin implementierten „improper torsion“ Termen.

Aus diesem Grund wurden alle drei Varianten der ITB-Komplexsimulation auch ohne diese Terme für den Liganden gestartet. Die Simulationsdauer beträgt wiederum 6 ns. Des Weiteren wurde der Ligand quantenmechanisch mit GAUSSIAN03 [314] unter Verwendung des ab-initio Verfahrens HF/6-31G\* minimiert und in dieser minimierten, planaren Struktur in die Bindetasche eingefügt und eine Simulation mit und ohne „improper torsion“ Terme nach Variante A der Trp 219 Insertion gestartet. Variante A wurde gewählt, weil sie sich durch einen geringen Einfluss auf die Bindetasche ausgezeichnet hat und die Fragestellung hier den Liganden ITB in der Bindetasche betrifft.

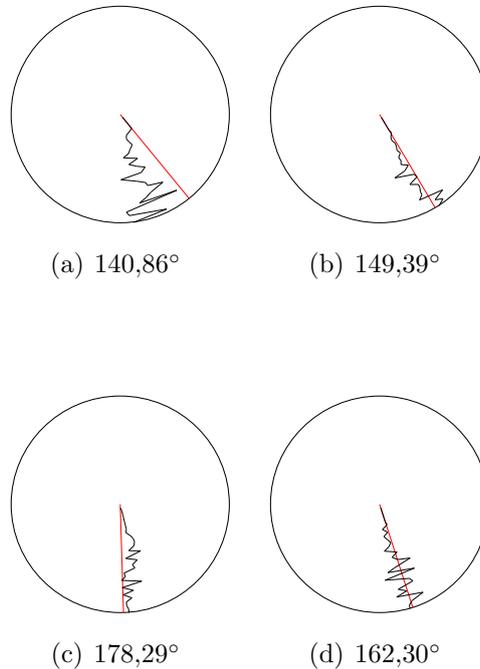
Zur Bewertung der Geometrie am Sulfonamidstickstoffatom wurde ein Diederwinkel im

Liganden ITB definiert, der in Abb. 5.38 illustriert ist. Es wird der Winkel zwischen zwei durch je drei Atome definierten Ebenen gemessen. Die erste Ebene ist durch die mit 1, 2 und 3 markierten Atome bestimmt, die zweite durch Atome 1, 2 und 4. Auf diese Weise wird die Abweichung der Methylenbrücke von der Ringebene während der Equilibrierung und der nachfolgenden 6 ns MD-Simulation verfolgt.



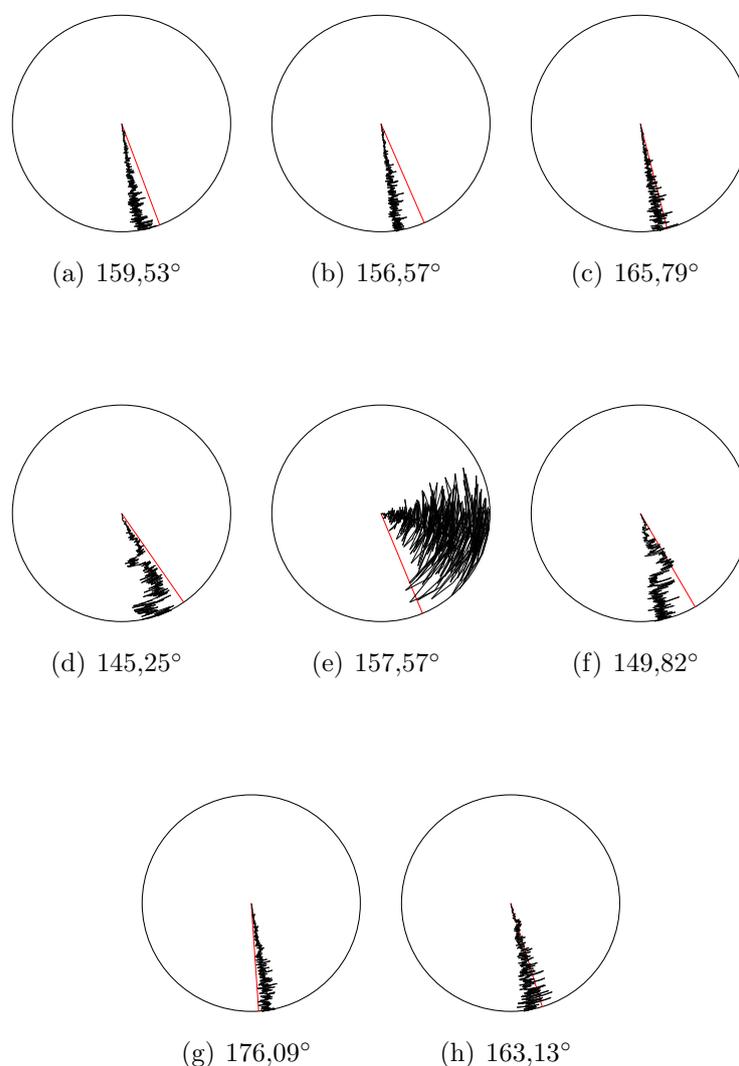
**Abbildung 5.38:** Definition des Winkels am Sulfonamidstickstoff von ITB durch Messung des Winkels zwischen zwei Ebenen; Ebene 1 definiert durch Atome: 1, 2, 3; Ebene 2 definiert durch Atome: 1, 2, 4

Dabei ergibt sich für alle vier Simulationen nach Variante A das in Abb. 5.39 gezeigte Bild während der Vorbereitung des Systems bis hin zum Simulationsbeginn. Die MD-Simulationen umfassen je zwei Simulationen, in welchen der Inhibitor ITB sowohl in der Konformation der Kristallstruktur vorliegt, als auch in der quantenmechanisch optimierten planaren. Diese wurden jeweils mit und ohne „improper torsion“ Termen für den Liganden gestartet. Es zeigt sich klar ein Bestreben des Liganden in den Versionen mit „improper torsion“ Einfluss, eine planare Geometrie einzunehmen bzw. diese beizubehalten. Im Gegensatz dazu stehen die beiden Simulationen ohne diese Terme und somit ohne diesen Einfluss. Die Struktur mit optimiertem Liganden, die ohne „improper torsion“ Parameter gestartet wurde, ergibt bereits in der Minimierung über 200 Schritte „steepest descent“ eine Abweichung von der Planarität, die dann auch beibehalten wird.



**Abbildung 5.39:** Der in Abb 5.38 definierte Winkel im Laufe der Equilibrierung mit jeweiligem Startwert (rote Linie sowie jeweilige Bildunterschrift) nach anfänglicher Minimierung über 200 Schritte: *Links oben:* ITB-Komplexsimulation mit „improper torsion“ Termen nach Variante A; *Rechts oben:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A ohne „improper torsion“ Terme; *Links unten:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A mit „improper torsion“ Termen, ausgehend von der optimierten Ligandenstruktur; *Rechts unten:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A ohne „improper torsion“ Terme, ausgehend von der optimierten Ligandenstruktur.

Abb. 5.40 zeigt den Verlauf während der MD-Simulation ergänzt durch die ITB-Komplexsimulationen nach Variante B und C mit und ohne „improper torsions“. Generell ist eine stärkere Schwankung des definierten Diederwinkels in den MD-Versionen ohne Berücksichtigung der „improper torsion“ Beiträge erkennbar. Dies hängt damit zusammen, dass der Sulfonamidstickstoff seine Geometrie durchwegs ändern darf und dies auch tatsächlich tut.



**Abbildung 5.40:** Der in Abb 5.38 definierte Winkel im Laufe der MD-Simulation mit jeweiligem Startwert (rote Linie und Unterschrift) nach der Equilibrierungsphase: *Erste Reihe:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A, B und C mit „improper torsion“ Termen; *Zweite Reihe:* ITB-Komplexsimulation Variante A, B und C ohne „improper torsion“ Terme; *Dritte Reihe:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A, ausgehend von der optimierten Ligandenstruktur mit (links) und ohne „improper torsion“ Terme (rechts).

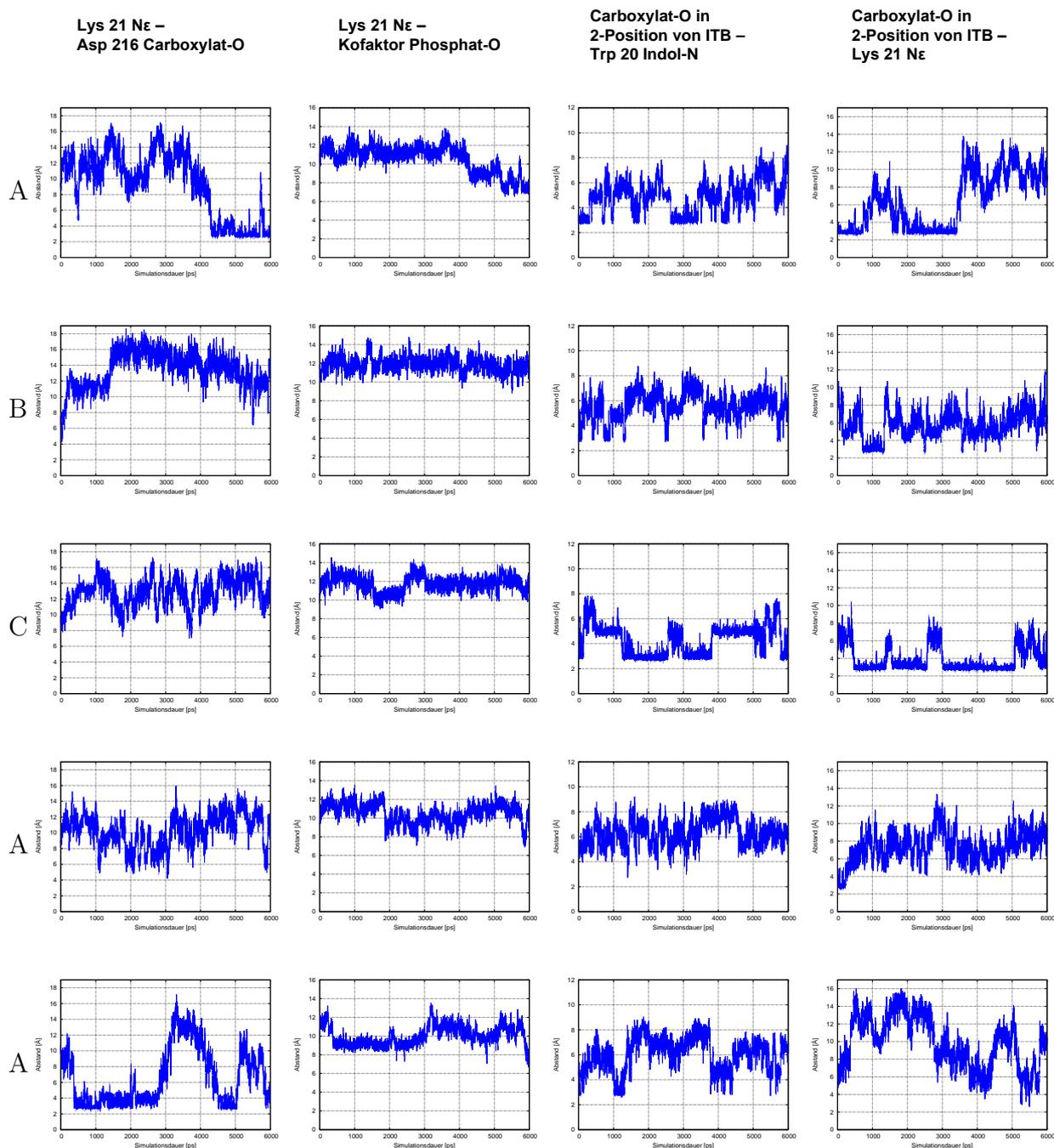
Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss die veränderten Parameter während der MD-Simulation auf die H-Brücke zwischen Trp 20 und der Carboxylatgruppe in 2-Position des Liganden haben. Zu diesem Zwecke wurde mit Hilfe des PTRAJ Moduls die relative Häufigkeit berechnet, mit der diese H-Brücke in der MD-Simulation beobachtet werden

kann. Das Ergebnis ist in Tab. 5.4 zusammengefasst. Eindeutig ist ein Anstieg in der relativen Häufigkeit ihrer Existenz zu erkennen, sobald der Geometrie am Sulfonamidstickstoff keine Planarität aufgezwungen wird. Die abgewinkelte Situation an der Methylenbrücke mit der Carboxylatfunktionalität erleichtert die Wechselwirkung mit dem Indol-N von Trp 20. Erstaunlicherweise ist der Wert für die MD-Simulation ausgehend vom optimierten und damit planaren ITB bei Anwendung der „improper torsions“ höher als in jener mit ihrer Anwendung und dem nicht optimierten Liganden ITB. Dies gilt auch verglichen mit Variante B und C, wenn auch hier der Unterschied nur bei etwa 1% liegt.

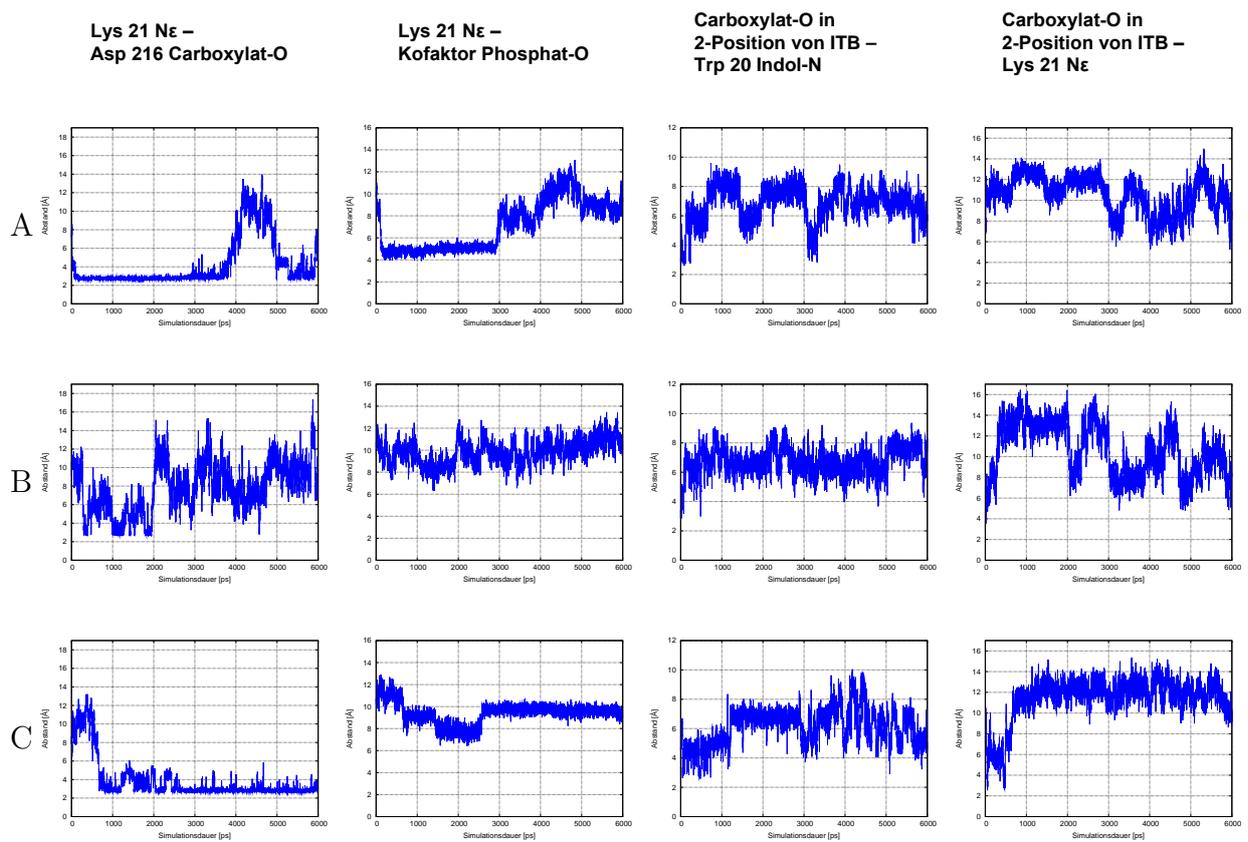
**Tabelle 5.4:** Relative H-Brücken-Häufigkeit zwischen Trp 20 und ITB in den verschiedenen ALR2-ITB-Komplexsimulationen.

MD-Simulation	H-Brücken-Häufigkeit [%]
Variante A mit „improper torsion“ Termen	2,56
Variante B mit „improper torsion“ Termen	0,55
Variante C mit „improper torsion“ Termen	3,06
Variante A ohne „improper torsion“ Terme	37,42
Variante B ohne „improper torsion“ Terme	17,99
Variante C ohne „improper torsion“ Terme	56,91
Variante A mit optimiertem ITB und „improper torsion“ Termen	3,36
Variante A mit optimiertem ITB ohne „improper torsion“ Terme	13,50

Die nachfolgenden Abbildungen 5.41 und 5.42 listen wichtige Abstände der ITB-Komplex-Simulationen auf, welche die nähere Umgebung und Wechselwirkungen des Inhibitors betreffen.



**Abbildung 5.41:** Vergleich wichtiger Abstände in verschiedenen ITB-Komplexsimulationen: A, B und C steht für die jeweilige Variante der MD-Simulation; *Erste bis dritte Reihe:* ITB-Komplexsimulation ohne „improper torsion“ Terme; *Vierte Reihe:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A mit „improper torsion“ Termen, ausgehend vom optimierten Liganden ITB; *Fünfte Reihe:* ITB-Komplexsimulation nach Variante A ohne „improper torsion“ Terme, ausgehend vom optimierten Liganden ITB.



**Abbildung 5.42:** Vergleich wichtiger Abstände in verschiedenen ITB-Komplexsimulationen: A, B und C steht für die jeweilige Variante der MD-Simulation; alle Simulationen wurden mit „improper torsion“ Termen durchgeführt.

Nur in Varianten A der ITB-Komplexsimulation ohne Einfluss von „improper torsion“ Termen bestätigt sich eine Wiederausbildung der Salzbrücke zwischen Lys 21 und Asp 216. In Variante B und C kommt es nicht dazu. Die H-Brücke zwischen Lys 21 und dem Kofaktor wird in allen drei Varianten nicht ausgebildet. Die Distanzen zwischen dem N $\epsilon$  von Trp 20 und dem Carboxylatsauerstoff des Liganden spiegeln die mit PTRAJ berechneten Werte der H-Brückenhäufigkeit wider. Von Zeit zu Zeit ist der Abstand so klein, dass man von der Existenz einer H-Brücke ausgehen kann. Daneben zeigt sich aber auch, dass Lys 21 diesem Akzeptor-Sauerstoff des Liganden auch über längere Zeitabschnitte sehr nahe kommt und also auch hier die Möglichkeit einer H-Brücke besteht. Darüber hinaus lässt sich aufgrund der Graphen der Schluss ziehen, dass Lys 21 entweder mit dem Liganden ITB oder Asp 216 wechselwirkt und in die jeweilige Richtung weist. Lys 21 schwingt zwischen diesen beiden Zuständen hin und her. Dieses Verhalten wird auch durch die Versionen, bei denen „improper torsion“ Terme in der MD-Simulation wirken, bestätigt. Dort wird die Tendenz zur Ausbildung der H-Brücke zwischen Lys 21 und ITB nicht beobachtet, was auf die Planarität am Sulfonamidstickstoff zurückzuführen ist, welche die Ausbildung einer solchen erschwert. Lys 21 wird folglich nicht in der Orientierung zu ITB festgehalten und befindet sich großteils in jener zu Asp 216 und wechselwirkt mit diesem über eine Salzbrücke. Die H-Brücke zwischen dem Liganden ITB und Trp 20 wird wegen der planaren Sulfonamid-Konformation natürlich auch nicht ausgebildet.

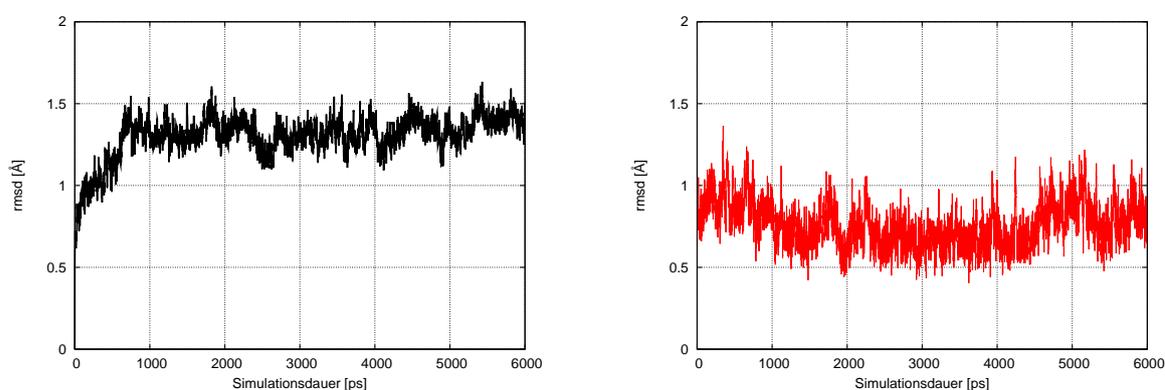
Die Salzbrücke zwischen Lys 21 und dem Kofaktor wird nur ansatzweise in Variante A mit „improper torsion“ Termen ausgebildet, verschwindet aber nach ca. 3000 ps wieder, sobald auch der Abstand zwischen Lys 21 und Asp 216 ansteigt. Der letztgenannte Abstand ist aber sowohl in Variante A als auch in Variante C über den Großteil der Simulationsdauer so klein, dass von der Existenz einer Salzbrücke ausgegangen werden kann, obwohl der Ligand gebunden ist.

Aufgrund der Erkenntnisse hinsichtlich der Molekülstruktur von ITB im Laufe von MD-Simulationen mit veränderten Parametern, d.h von MD-Simulationen, in denen auf die Verwendung von „improper torsion“ Termen verzichtet wurde bzw. in denen der Ligand bereits mit planarer Geometrie am Sulfonamidstickstoff eingesetzt wurde, wird vermutet, dass die pyramidale Geometrie des Liganden ITB in der Bindetasche von ALR2 bevorzugt ist. Der planare Sulfonamidstickstoff ist zwar an sich energetisch begünstigt, doch bei den lokalen Gegebenheiten in der Bindetasche ist sein Auftreten als eine Konsequenz des verwendeten Kraftfeldes mit seinen „improper torsion“ Termen zu verstehen. Wie die im vorhergehenden Abschnitt 5.4.3.1 beschriebenen quantenmechanischen Berechnungen bestätigen, ist die H-Brücke zwischen der Carboxylatgruppe, die über eine Methylenbrücke an der 2-Position von ITB hängt, und dem Indol-Stickstoffatom von Trp 20 verantwortlich für die abgewinkelte Ligandenstruktur, liefert sie doch einen beträchtlichen energetischen Gewinn von ca. 9,70 kcal/mol gegenüber der planaren Form.

## 5.4.4 MD-Simulationen der ALR2-ITB-freien-Komplexstruktur

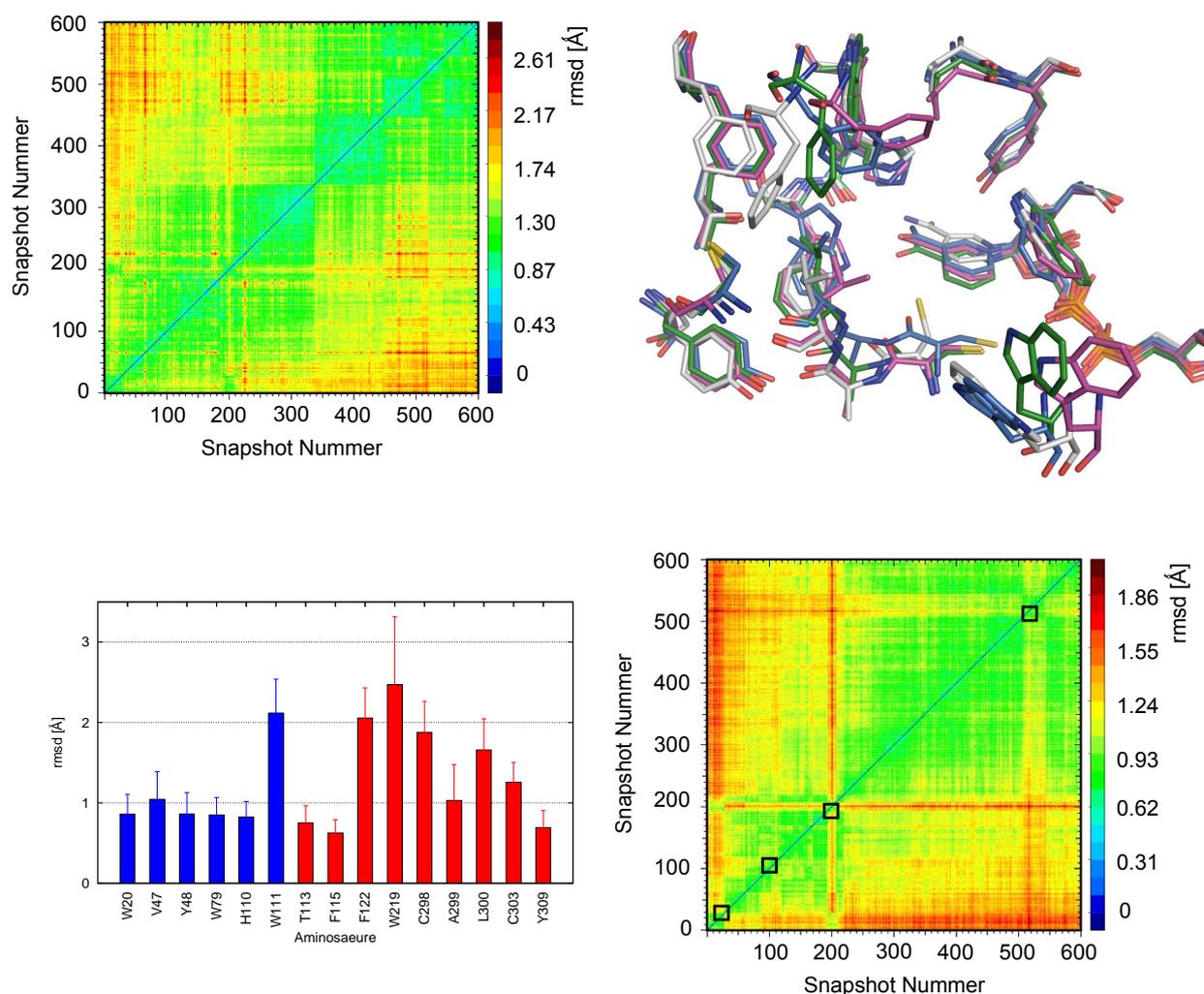
### 5.4.4.1 Variante A

Bei dieser in Unterkapitel 5.4.1 beschriebenen Modellierung der Trp 219 Seitenkette beträgt der durchschnittliche  $C\alpha$ -RMSD-Wert über das gesamte Protein  $1,36 \pm 0,14$  Å. Bei Beschränkung auf die Bindetasche beläuft sich der entsprechende Wert auf  $0,76 \pm 0,14$  und  $1,47 \pm 0,19$  Å unter Miteinbeziehung aller Atome der Bindetasche. Größere Schwankungen der RMSD-Werte sind in Abb. 5.43 nicht ersichtlich. Die Simulation erreicht sehr bald nach Simulationsbeginn einen Zustand, in dem die Atompositionen equilibriert sind.



**Abbildung 5.43:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante A: *Links:* Über gesamtes Protein; *Mitte:* über ALR2-Bindetasche.

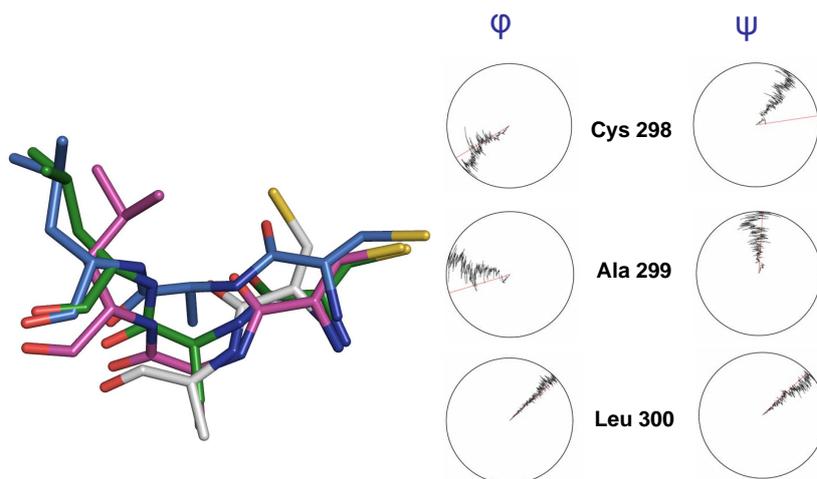
Das Histogramm der „all-atom“-RMSD-Werte der Bindetaschen-Aminosäuren zeigt verhältnismäßig kleine Werte. Trp 219 erreicht mit  $2,47 \pm 0,85$  Å den höchsten Wert. Erstaunlich ist in diesem Fall, dass ein Rest der Anionenbindetasche, Trp 111, mit  $2,12 \pm 0,42$  Å knapp hinter Trp 219 folgt (Abb. 5.44). Bei genauer Betrachtung repräsentativer Snapshots, die der Trajektorie nach 201 (blau), 1001 (grün), 2001 (pink) und 5151 (silber) ps MD-Simulation entnommen wurden, ist auch eine eindeutige Änderung am  $\chi_1$ -Winkel von Trp 111 erkennbar, die nach ca. 600 ps MD erfolgt. Abb. 5.47 zeigt dies in einem Kreisdiagramm.



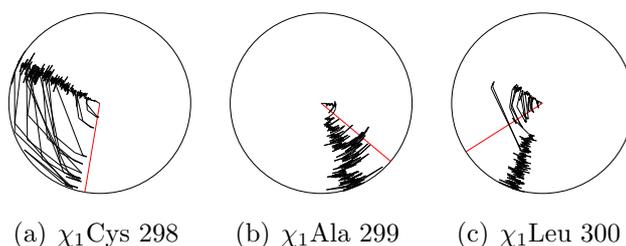
**Abbildung 5.44:** Überblick über die ALR2-ITB-freie-Komplexsimulation nach Variante A: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 201 (blau), 1001 (grün), 2001 (pink) und 5151 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* 2D-RMS Plot ohne Trp 219.

Das Backbone von Cys 298 bis Leu 300 zeigt zusammen mit dessen Seitenketten ebenfalls große Veränderungen. Auffallend ist dabei eine deutliche Änderung des  $\psi_1$ -Winkels von Cys 298 sowie des  $\phi_1$ -Winkels von Ala 299 und aller  $\chi_1$ -Winkel der entsprechenden Seitenketten in den Darstellungen in Abb. 5.45 und 5.46. Interessant ist dabei auch ein Umklappen der Seitenkette an Leu 300, das die Frage aufkommen lässt, ob ein Übergang in den Zustand der Tolrestat-Struktur mit offener Spezifitätstasche auftritt. Der  $\chi_1$ -Winkel

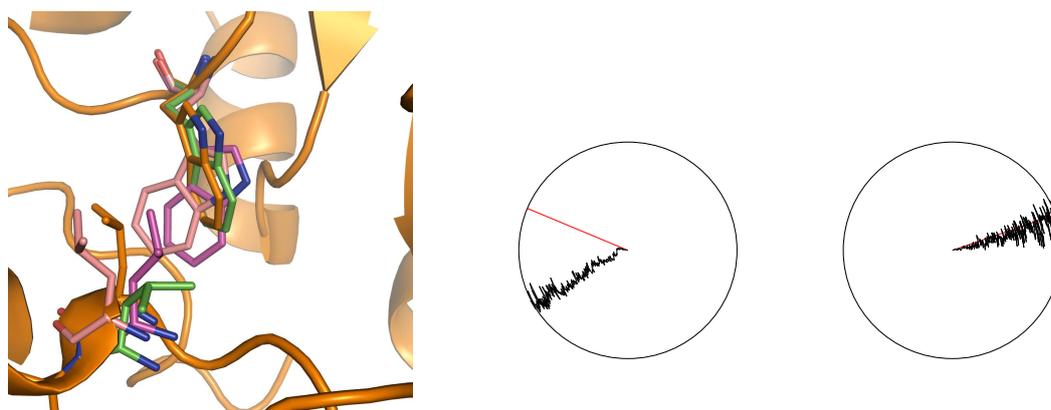
ändert sich bereits während der Equilibrierung von einem Wert von  $-122,58^\circ$  in einen von ca.  $-60^\circ$ . Der entsprechende Wert der Tolrestat-Stuktur (1ah3) beträgt  $-73,47^\circ$ . Nach etwa 2200 ps Simulationszeit klappt die Seitenkette dann erneut um und nimmt einen  $\chi_1$ -Winkel von  $-140^\circ$  ein. Da aber auch Trp 111 seinen  $\chi_1$ -Winkel bereits nach 800 ps ändert, vermeidet die relative Anordnung der beiden Seitenketten zueinander eine Öffnung der Tasche. Abb. 5.47 veranschaulicht dies im Vergleich mit den Kristallstrukturen von 2nvd (orange, Spezifitätstasche geschlossen) und 1ah3 (grün, Spezifitätstasche geöffnet).



**Abbildung 5.45:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante A: Snapshots nach 201 (blau), 1001 (grün), 2001 (pink) und 5151 (silber) ps MD-Simulation.



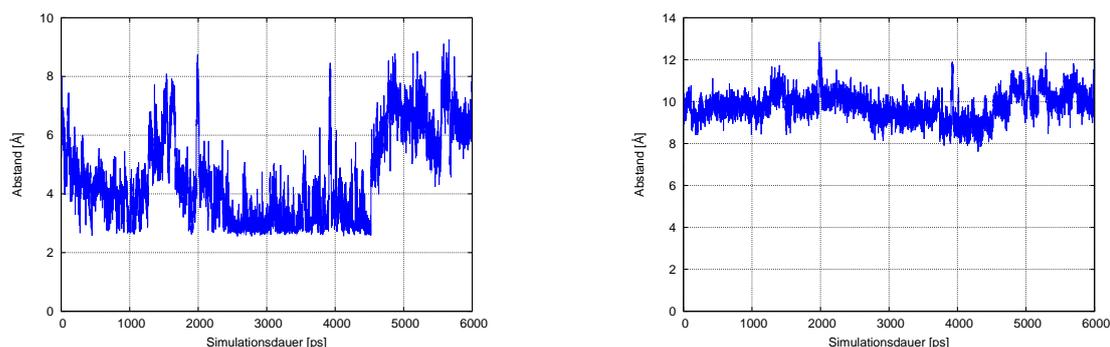
**Abbildung 5.46:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante A, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvd-Kristallstruktur.



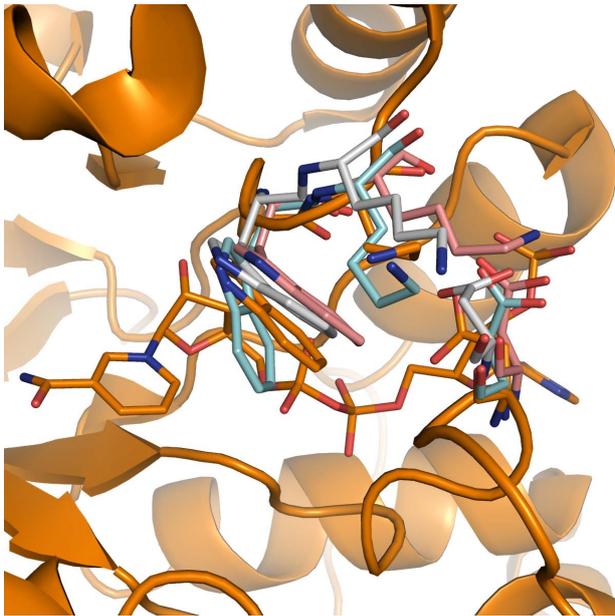
**Abbildung 5.47:** *Links:* Orientierung von Trp 111 und Leu 300 zueinander: nach 2001 (pink) und 3001 (lachs) ps ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation, 2nvd (orange), 1ah3 (grün); *Mitte:*  $\chi_1$ -Winkel von Trp 111; *Rechts:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20.

Die Entfernung des Liganden führt im Laufe der Equilibrierung zu einem Schließen der durch Trp 20-Rotation um den  $\chi_2$ -Winkel geöffneten Untertasche (siehe dazu Abschnitt 5.5). Kurz nach Simulationsbeginn kippt Trp 20 aber wieder zurück und öffnet diese wieder. Abb. 5.47 zeigt rechts den invarianten  $\chi_2$ -Winkel. Die Untertasche bleibt während der Gesamtsimulationsdauer von 6 ns bestehen.

Lys 21 bleibt solvens exponiert, bildet aber zwischenzeitlich immer wieder die Salzbrücke durch Bewegungen im „safety-belt“-Bereich zur Carboxylatgruppe von Asp 216 aus. Die Salzbrücke zum Kofaktor NADP<sup>+</sup> existiert aber während der 6 ns nie. Die folgenden Abbildungen Abb. 5.48 und 5.49 illustrieren dies.



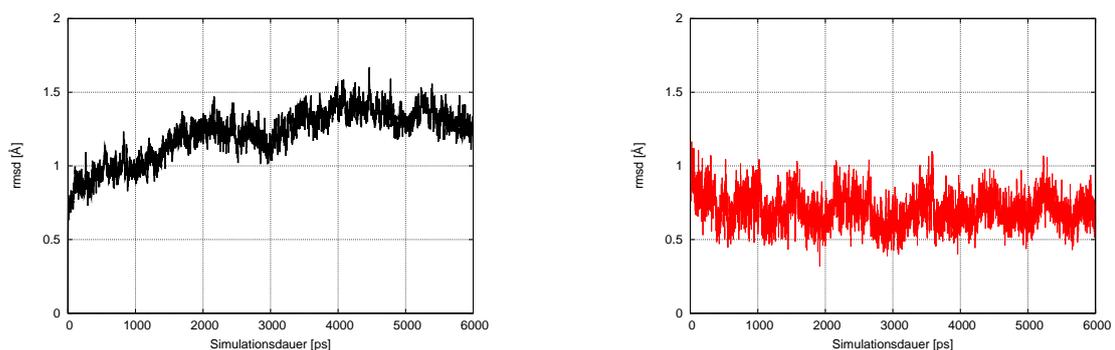
**Abbildung 5.48:** Verhalten von Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 6 ns der ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante A: *Links:* Abstand zwischen Nε von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts:* Abstand zwischen Nε von Lys 21 und NADP<sup>+</sup>-Phosphatsauerstoff.



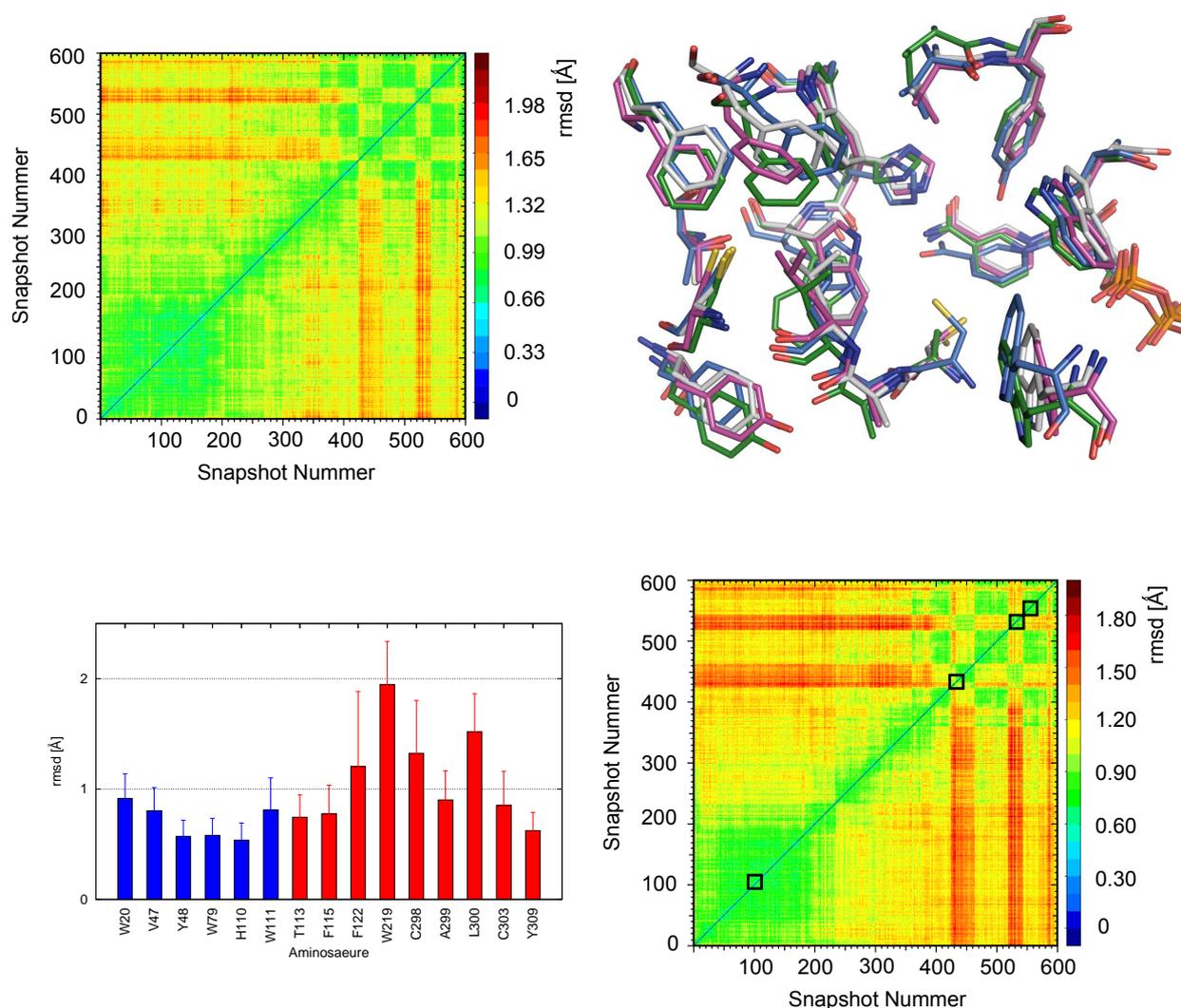
**Abbildung 5.49:** Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante A: Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (cyan), nach 3001 (lachs) und 5151 (silber) ps MD-Simulation sowie die 2nvd-Kristallstruktur (orange).

#### 5.4.4.2 Variante B

Für diese MD-Simulation beträgt der Protein- $C\alpha$ -RMSD-Wert  $1,18 \pm 0,17 \text{ \AA}$ . Für die Bindetasche beträgt der Wert  $0,70 \pm 0,11 \text{ \AA}$  und steigt auf  $1,06 \pm 0,15 \text{ \AA}$  bei Berücksichtigung aller Atome der Bindetasche. Auffallend ist bei Betrachtung der Auftragung der  $C\alpha$ -RMSD-Werte, dass jene über das Gesamtprotein während der gesamten Simulationsdauer in einem Intervall zwischen ca. 1 und 1,5  $\text{\AA}$  liegen. Der Graph, welcher nur die  $C\alpha$ -Atome der Bindetasche berücksichtigt, unterstreicht die Stabilität der MD-Simulation, da die Werte über die gesamte Simulationsdauer von 6 ns nur sehr wenig Schwankungen aufweisen 5.50.



**Abbildung 5.50:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante B: *Links:* Über gesamtes Protein; *Mitte:* über ALR2-Bindetasche.



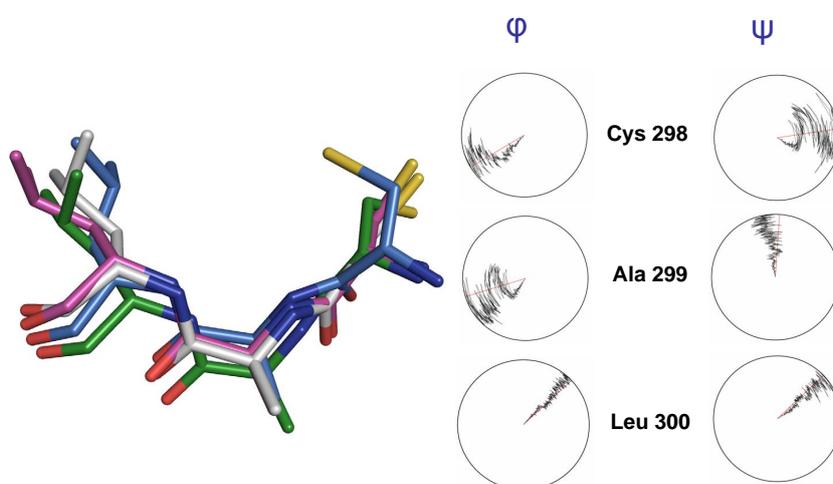
**Abbildung 5.51:** Überblick über die ALR2-ITB-freie Komplexsimulation nach Variante B: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITB-freien Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 1001 (blau), 4301 (grün), 5201 (pink) und 5501 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* 2D-RMS Plot ohne Trp 219.

Auch die im Histogramm aufgetragenen RMSD-Werte der Aminosäuren-Atome der Bindetasche (5.51) zeigen nur kleine Balken. Jener von Trp 219 ist mit  $1,95 \pm 0,39$  Å am höchsten, allerdings folgt in dieser Variante der MD-Simulation Leu 300 mit  $1,53 \pm 0,34$  Å relativ knapp dahinter vor Cys 298 mit  $1,32 \pm 0,48$  Å und Phe 122 mit  $1,20 \pm 0,68$  Å. Phe 122 war in allen bislang beschriebenen MD-Varianten jene Aminosäure, die nach Trp 219 die höchsten Schwankungen aufwies. In dieser Variante B der ITB-freien Komplexsimula-

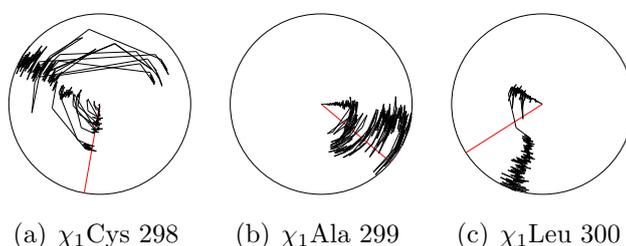
tion zeigen Leu 300 und Cys 298 größere Bewegungen.

Eine Auftragung der  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Kreisdiagramm bestätigt große Fluktuationen im Backbone-Bereich von Cys 298, Ala 299 und Leu 300 (Abb. 5.52). Zudem zeigen die  $\chi_1$ -Winkel dieser Aminosäuren starke Variationen, so für Leu 300 nach etwa 2300 ps ein Umklappen der Seitenkettenorientierung (Abb. 5.53).

Die gemäß der erkennbaren Cluster im 2D-RMS Plot entnommenen Snapshots nach 1001 (blau), 4301 (grün), 5201 (pink) und 5501 (silber) ps MD-Simulation zeigen, dass sich in diesem Fall Trp 219 tatsächlich im Laufe der 6 ns nur wenig bewegt. Insgesamt führt dies zu kleineren RMSD-Werten für die Bindetasche. Außerdem sind die Cluster bereits im 2D-RMS Plot erkennbar, der auch den Rest Trp 219 berücksichtigt (Abb. 5.51).

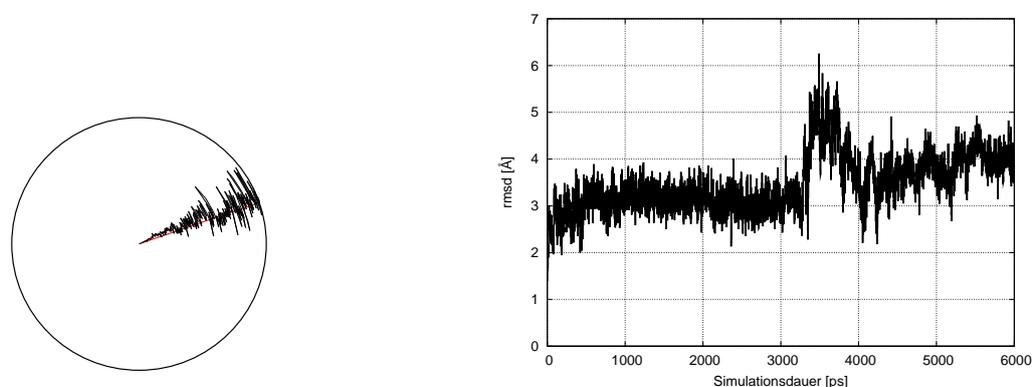


**Abbildung 5.52:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante B: nach 1001 (blau), 4301 (grün), 5201 (pink) und 5501 (silber) ps MD-Simulation.

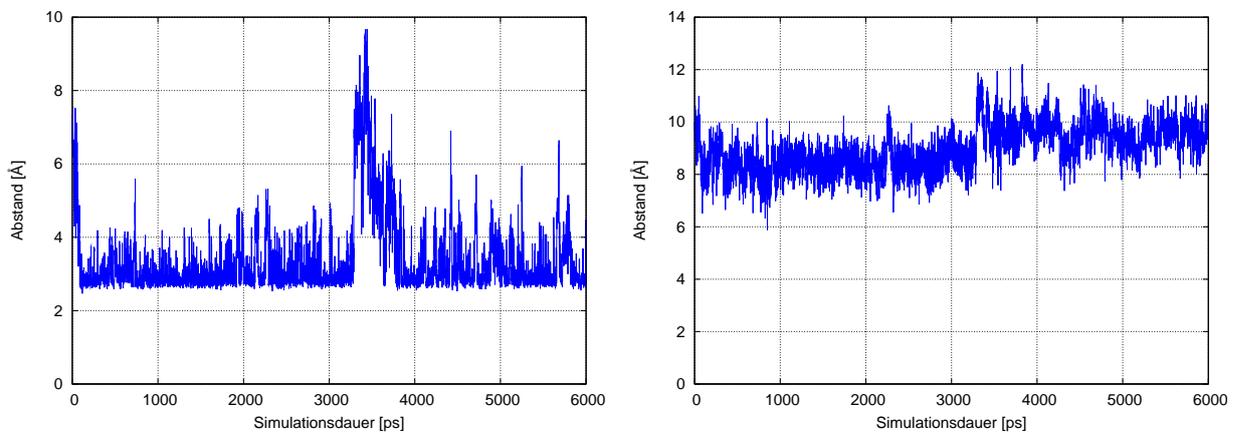


**Abbildung 5.53:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante B, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvd-Kristallstruktur.

Interessant ist in diesem Fall auch, dass Trp 20 seinen  $\chi_2$ -Winkel nicht ändert und somit die neu geöffnete Untertasche nicht schließt, obwohl der Ligand ITB entfernt wurde. Im Laufe der gesamten hier geschilderten MD-Simulation gemäß Variante B weist Trp 20 immer die Orientierung auf, die es in der Kristallstruktur 2nvd einnimmt. Das Kreisdiagramm in Abb. 5.54 (links) bestätigt das. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass im Laufe der Equilibrierung die neue Bindetasche sehr wohl durch die Trp 20-Bewegung als verschlossen erscheint, allerdings öffnet sie sich sogleich nach Simulationsbeginn wieder (nach 30 ps). Obwohl Trp 20 seine Orientierung nicht ändert, bildet Lys 21 sehr bald wieder eine Salzbrücke über sein  $N_\epsilon$ -Atom zum Carboxylat-O von Asp 216 aus. Nur kurzfristig zwischen 3300 und 3700 ps wird sie durch eine Asp 216 Bewegung gebrochen. Gerade in dieser Zeit steigt stimmigerweise auch der „all-atom“-RMSD-Wert von Asp 216 (Abb. 5.55 und 5.54).

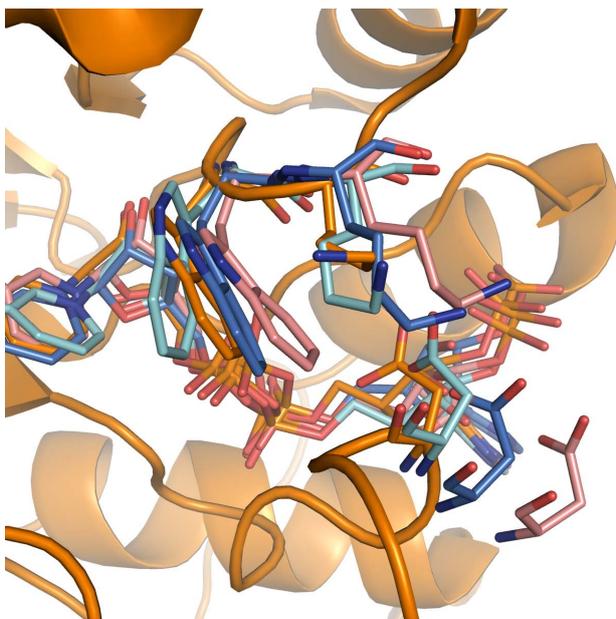


**Abbildung 5.54:** *Links:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante B; *Rechts:* „all-atom“-RMSD-Werte von Asp 216 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante B.



**Abbildung 5.55:** Verhalten von Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante B: *Links:* Abstand zwischen  $N\epsilon$  von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts:* Abstand zwischen  $N\epsilon$  von Lys 21 und  $NADP^+$ -Phosphatsauerstoff.

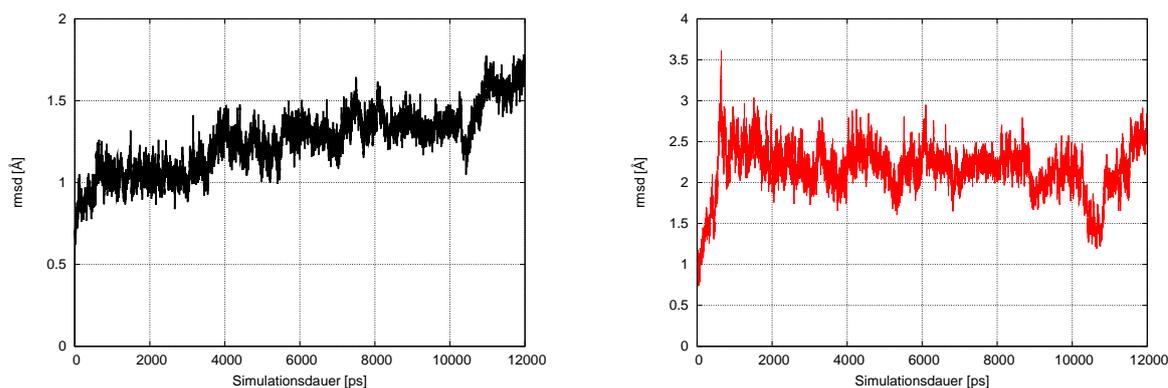
Abb. 5.56 zeigt ausgewählte Snapshots der MD-Simulation nach der Equilibrierung (cyan), 1001 (blau), 3501 (lachs) ps MD-Simulation und die Kristallstruktur 2nvd (orange) zum Vergleich. Während sich die Salzbrücke von Lys 21 zu Asp 216 ausbilden kann, bleibt der Abstand zum Kofaktor zu groß und die Ausbildung einer solchen ist folglich nicht möglich (Abb. 5.55).



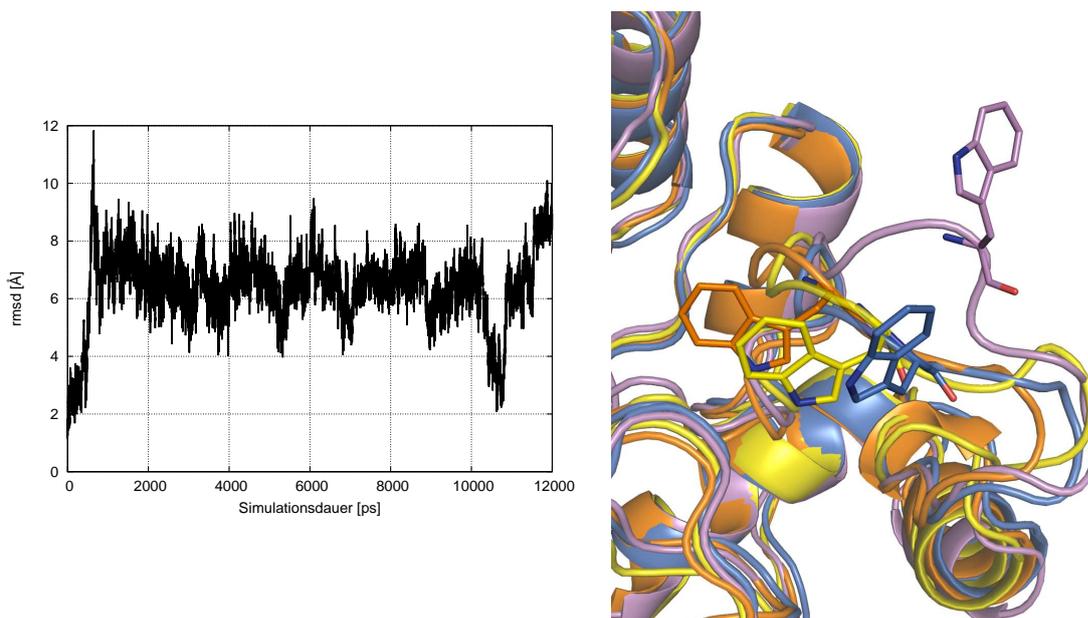
**Abbildung 5.56:** Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 6 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante B: Repräsentative Snapshots nach der Equilibrierung (cyan), 1001 (blau), 3501 (lachs) und 2nvd (orange) ps MD-Simulation.

### 5.4.4.3 Variante C

Diese Variante der ITB-freien Komplexsimulation wurde 12 ns lang ausgeführt. Trp 219 wird so eingefügt, wie es in der 2nvc Kristallstruktur vorliegt. Der durchschnittliche  $C\alpha$ -RMSD-Wert beträgt  $1,25 \pm 0,211$  Å. Für die Bindetasche ergibt sich ein entsprechender Mittelwert von  $1,27 \pm 0,207$  Å, der bei Berücksichtigung aller Atome der Bindetasche auf  $2,16 \pm 0,315$  Å ansteigt. Große Fluktuationen sind daher im Bereich der Seitenketten der Bindetasche zu erwarten. Abb. 5.57 zeigt die zeitliche Entwicklung der  $C\alpha$ -RMSD-Werte über das Gesamtprotein und die Bindetaschenreste über die Gesamtsimulationsdauer von 12 ns. Ein rasanter Anstieg binnen der ersten 700 ps zeigt sich im Plot der „all-atom“-RMSD-Werte (ebenfalls in Abb. 5.57) der Bindetasche. Dieser Sprung ist eindeutig auf Bewegungen des in die Struktur eingefügten Trp 219 zurück zu führen. Abb. 5.58 macht dies deutlich. Der Graph des RMSD-Wertes für Trp 219 zeigt denselben Verlauf wie jener der „all-atom“-RMSD-Werte der Bindetasche aus Abb. (5.57) und zeigt Trp 219 als Stabmodell, welches weiträumige Bewegungen eingeht.

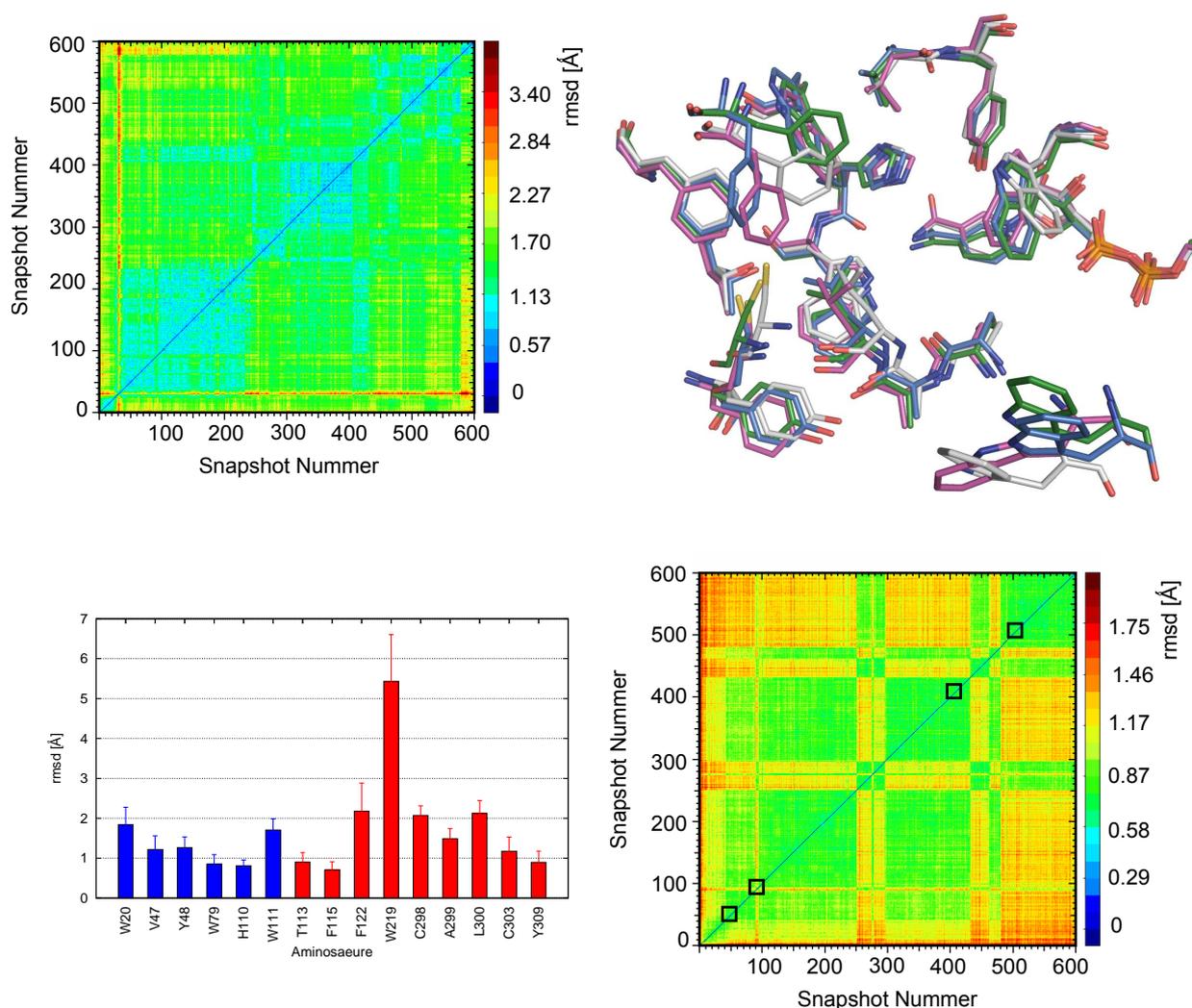


**Abbildung 5.57:** RMSD-Werte im Verlauf der 12 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante C: *Links:*  $C\alpha$ -RMSD-Werte über gesamtes Protein; *Mitte:* „all-atom“-RMSD-Werte über ALR2-Bindetasche.



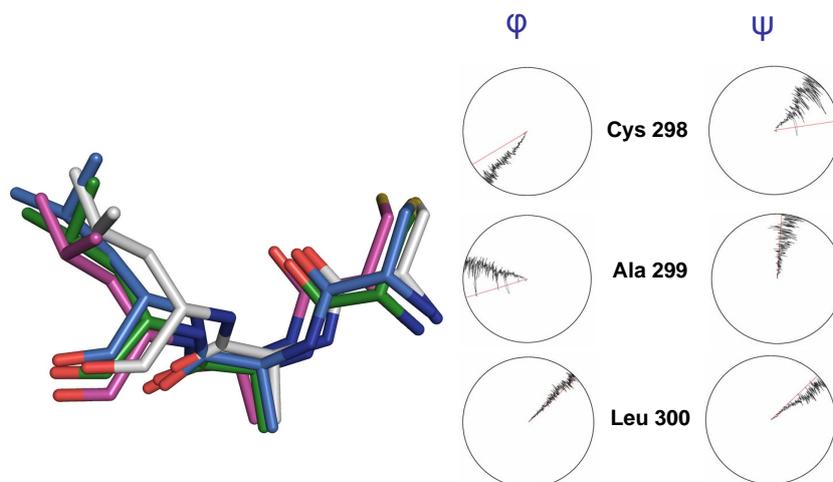
**Abbildung 5.58:** Verhalten von Trp 219 in der ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante C: *Links:* RMSD-Wert im Verlauf der ALR2-ITB-freien Komplexsimulation; *Rechts:* Vergleich repräsentativer Snapshots nach 651 (flieder), 1001 (blau) und 10551 (gelb) ps ALR2-ITB-freier Komplexsimulation mit der Ausgangsstruktur (orange).

Der 2D-RMSD Plot zeigt über die 12 ns kein Clustering, wenn Trp 219 berücksichtigt wird. Nur ein Bereich um 600 ps weist einen erhöhten RMSD-Wert (rot) auf, was mit der Spitze des RMSD-Wertes von Trp 219 in Zusammenhang steht. Sobald dieser Rest vernachlässigt wird, ergeben sich über die 12 ns verteilt insgesamt 8 konformationell unterscheidbare Zustände. 4 repräsentative Bindetaschen aus der MD wurden der Trajektorie entnommen und überlagert (Abb. 5.59). Sie zeigen Fluktuationen im Bereich um Phe 122 und Trp 219, sowie einzigartig in dieser Serie von Simulationen an Trp 20. Trp 20 erscheint im Histogramm der RMSD-Werte mit einem verhältnismäßig hohen Balken, der einem Wert von  $1,84 \pm 0,44$  Å entspricht.

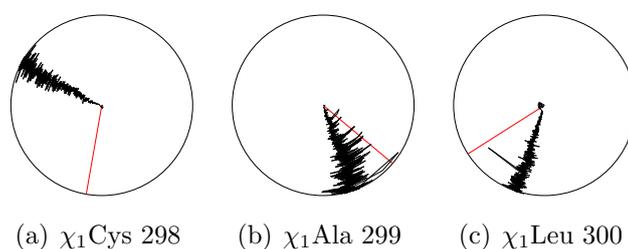


**Abbildung 5.59:** Überblick über die ALR2-ITB-freie Komplexsimulation nach Variante C: *Links oben:* 2D-RMS Plot; *Rechts oben:* Vergleich repräsentativer Snapshots aus der ALR2-ITB-freien Komplexsimulation: Bindetaschenkonformation nach 1001 (blau), 1801 (grün), 8001 (pink) und 10001 (silber) ps MD-Simulation; *Links unten:* Histogramm der gemittelten RMSD-Werte aller Aminosäuren der Bindetasche; *Rechts unten:* 2D-RMS Plot ohne Trp 219.

Was den Backbone-Bereich betrifft, so erleben die  $\phi_1$ -Winkel von Cys 298 und Ala 299 und der  $\psi_1$ -Winkel von Cys 298 sowie die  $\chi_1$ -Winkel der Seitenketten ebenfalls größere Veränderungen (Abb. 5.60 und 5.61). Zudem ändert auch Trp 111 seine Position und scheint im Histogramm aus Abb. 5.59 mit zweithöchstem Balken bei  $1,71 \pm 0,28$  Å nach Trp 219 auf, welches mit  $5,43 \pm 1,17$  Å eindeutig am flexibelsten ist.

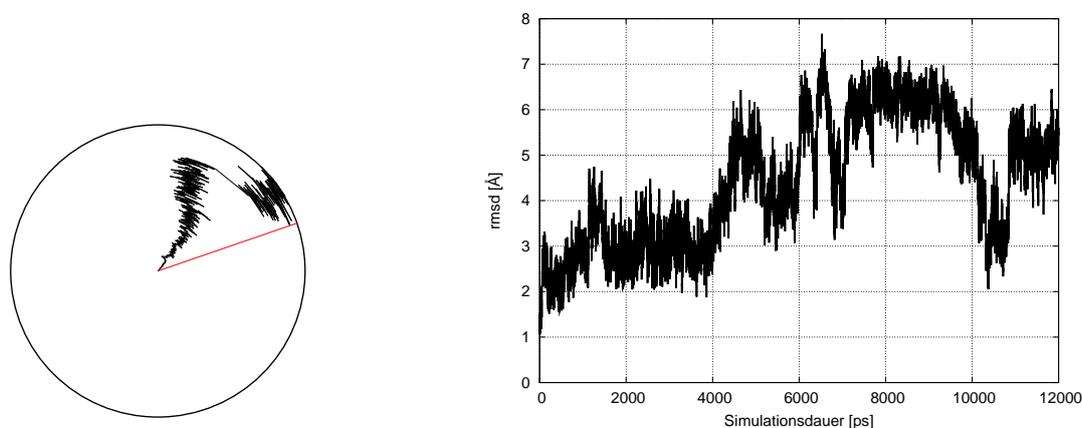


**Abbildung 5.60:** Verhalten des Cys 298-Ala 300 Backbones mit Darstellung der zugehörigen  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel im Verlauf der 12 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante C: Snapshots nach 1001 (blau), 1801 (grün), 8001 (pink) und 10001 (silber) ps MD-Simulation.

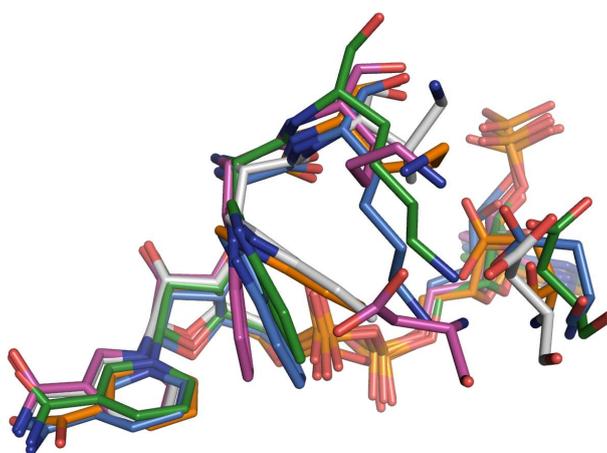


**Abbildung 5.61:**  $\chi_1$ -Winkel im Verlauf der 12 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante C, rote Linie entspricht dem Wert in der 2nvd-Kristallstruktur.

Wie in den vorherigen Simulationen schließt auch in dieser Variante Trp 20 die durch seine Rotation um den  $\chi_2$ -Winkel geöffnete Untertasche im Zuge der Equilibrierungsphase. Im Gegensatz zu den beiden anderen Simulationen, ohne gebundenen Inhibitor, öffnet sie sich in diesem Fall aber nicht sofort nach Simulationsbeginn wieder, sondern bleibt in geschlossenem Zustand, bis sie nach 10 ns durch eine Klappbewegung von Trp 20 wieder geöffnet wird. Abb. 5.62 illustriert die erneute Öffnung der Untertasche durch Auftragung des  $\chi_2$ -Winkels und des RMSD-Wertes von Trp 20. Repräsentative Snapshots zu der Öffnung der Untertasche 1801 (blau), 5201 (grün), 8001 (pink) und 10001 (silber) ps MD-Simulation sind in Abb. 5.63 dargestellt. Klar ersichtlich ist die Rotation von Trp 20 nach 10 ns Simulation (silber).



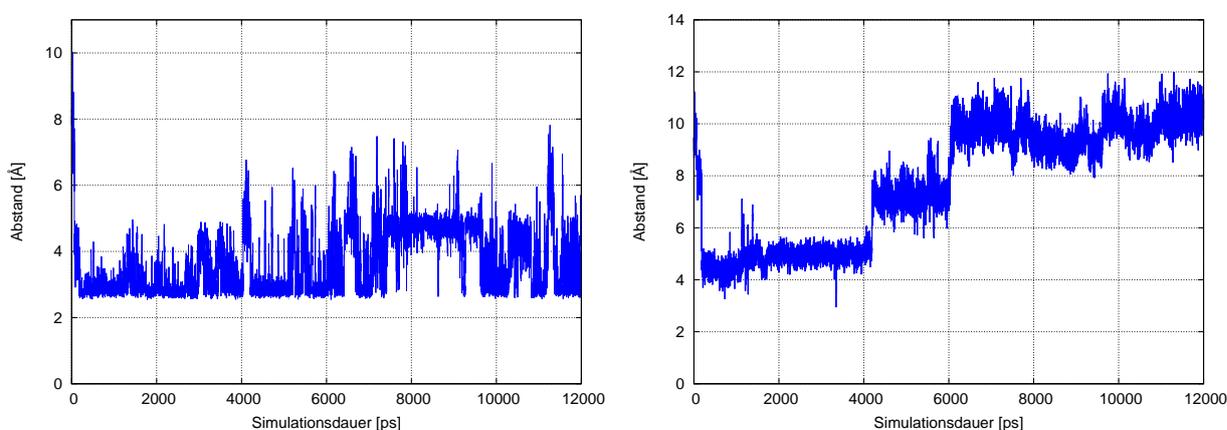
**Abbildung 5.62:** Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 12 ns ALR2-ITB-freien Komplexsimulation nach Variante C: *Links:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20; *Rechts:* „all-atom“-RMSD-Werte von Asp 216.



**Abbildung 5.63:** Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 12 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante C: Repräsentative Snapshots 1801 (blau), 5201 (grün), 8001 (pink) und 10001 (silber) ps MD-Simulation, 2nvd-Kristallstruktur (orange) zum Vergleich.

Der geschlossene Zustand der Untertasche von Simulationsbeginn bis 10 ns führt auch dazu, dass der Abstand zwischen dem Ne Atom von Lys 21 und dem Phosphatsauerstoff

des Kofaktors  $\text{NADP}^+$  auf ca. 4 Å verringert wird und somit die Tendenz besteht, die H-Brücke zwischen diesen beiden Interaktionspartnern wieder auszubilden. Nach 4 ns Simulationdauer wird diese aber wieder gebrochen und nimmt über den Zwischenwert von etwa 7 Å ab 6 ns wieder den Wert aus der Kristallstruktur an (siehe Abb. 5.64, rechts). Der Abstand zur Carboxylatgruppe von Asp 216 entspricht nahezu über die gesamte Simulation dem einer H-Brücke zwischen den beiden Interaktionspartnern. Nur kurzzeitig führt eine weitläufigere Bewegung von Asp 216 (Abb. 5.62, 5.63 und 5.64) zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen 8 und 10 ns und geht somit der Rotation von Trp 20 und dem folgenden Öffnen der Untertasche direkt voran.



**Abbildung 5.64:** Verhalten von Lys 21 und Asp 216 im Verlauf der 12 ns ALR2-ITB-freien-Komplexsimulation nach Variante C: *Links:* Abstand zwischen  $\text{Ne}$  von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts:* Abstand zwischen  $\text{Ne}$  von Lys 21 und  $\text{NADP}^+$ -Phosphatsauerstoff.

#### 5.4.4.4 Diskussion

Die drei in diesem Abschnitt beschriebenen MD-Simulationen mit unterschiedlicher Art der Trp 219 Insertion in die Ausgangsstruktur wurden in Bezug auf das dynamische Verhalten der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Bindetasche analysiert. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass sich für Aminosäuren, die in unterschiedlichen Konformationen in verschiedenen Kristallstrukturen existieren, auch eine erhöhte Flexibilität in den Simulationen ergab. Von besonderem Interesse ist in dem hier geschilderten Fall der Simulationen des ALR2-ITB-freien Komplexes das Verhalten von Trp 20, welches in der 2nvd Kristallstruktur um seinen  $\chi_2$ -Winkel rotiert und dadurch eine neue Subtasche öffnet. In allen drei Varianten A-C wurde diese Untertasche in der vorgeschalteten Equilibrierung geschlossen. Nur bei der nachfolgenden 12 ns MD-Simulation gemäß Variante C blieb diese Subtasche auch

tatsächlich geschlossen, bis sie nach ca. 10 ns wieder durch eine Klappbewegung des Indolteils von Trp 20 geöffnet wird, während sie in den Varianten A und B sofort nach dem eigentlichen Simulationsbeginn wieder geöffnet wird. Das in dieser Variante in der Konformation aus der 2nvc Struktur eingefügte Trp 219 unterliegt mit seinem umliegenden „safety-belt“-Bereich weitläufigen Bewegungen. Gerade dann, wenn Trp 219 wieder in die Nähe der Startstruktur der MD-Simulation nach dieser Variante C gelangt, öffnet sich auch die Subtasche durch eine Trp 20 Rotation wieder. Es wird daher davon ausgegangen, dass diese Trp 219 Konformation jener sehr nahe kommt, welche theoretisch in diesem Moment in der 2nvd Kristallstruktur beobachtet werden sollte, dort aber aufgrund der enormen Flexibilität um diese Aminosäure als nicht aufgelöst erscheint. Die Flexibilität in diesem Loopbereich der ALR2 wurde in der Simulation ebenfalls nachvollzogen und ist für die biologische Funktion des Enzyms von immenser Bedeutung. Das „safety-belt“, in welchem auch Trp 219 liegt, öffnet und schließt die Kofaktorbindetasche. Der Kofaktor muss nach jedem katalytischen Zyklus ausgetauscht werden, daher ist eine erhöhte Flexibilität in diesem Bereich notwendig.

Nach Variante A und B öffnet sich die neue Subtasche um Trp 20 kurz nach dem eigentlichen Simulationsbeginn wieder und bleibt über die nachfolgenden 6 ns bestehen. Trotz der vorliegenden offenen Subtasche ist es Lys 21 aber möglich, eine H-Brücke über sein Ne zur Carboxylatgruppe von Asp 216 einzugehen. Für Variante B, bei dem der Loopbereich von Arg 217 - Glu 223 aus der 2nvc Struktur eingefügt wurde, steht dies im Gegensatz zur im vorigen Kapitel 5.4.2 beschriebenen MD-Simulation mit vorhandenem ITB in der Bindetasche. Als Grund dafür wird eine Inkompatibilität der durch die Loopinsertion aufgezwungenen 2nvc Konformation in einem kleinen Bereich des „safety-belt“-Bereichs mit dem Vorhandensein des Liganden ITB angenommen.

Die H-Brücke zwischen Lys 21 und dem Phosphat-O des Kofaktors wird nur bei Variante C, wenn die Subtasche sich schließt, annäherungsweise wieder eingegangen.

Da in Variante C ein Schließen und nachfolgendes Öffnen der neuen Subtasche um Trp 20, die auch unabhängig vom Vorhandensein eines Liganden zu sein scheint, beobachtet werden konnte, sollte versucht werden, diesen Bereich im zukünftigen Design neuer ALR2-Inhibitoren zu adressieren.

### 5.4.5 Clustering der drei Varianten der ITB-freien Komplexsimulationen

Die durch MD-Simulationen berechneten Trajektorien repräsentieren eine zeitliche Abfolge von Atompositionen, welche in ihrer Gesamtheit ein Sampling des dem Molekül energetisch zugänglichen Konformationsraumes darstellen [327]. Die in diesen Trajektorien gespeicherte Datenmenge kann bei den heute zugänglichen Simulationszeiten von bis zu einigen Hundert ns sehr groß werden. Aus diesem Grund wird versucht, diese in den Trajektorien inhärente Information zu extrahieren. Eine weit verbreitete Methode der Analyse solcher Trajektorien stellen Clusteringalgorithmen dar. Diese versuchen die in der Trajektorie enthaltenen Datenelemente bezüglich gewisser Charakteristika, wie z. B. RMSD-Werte, Distanzen und

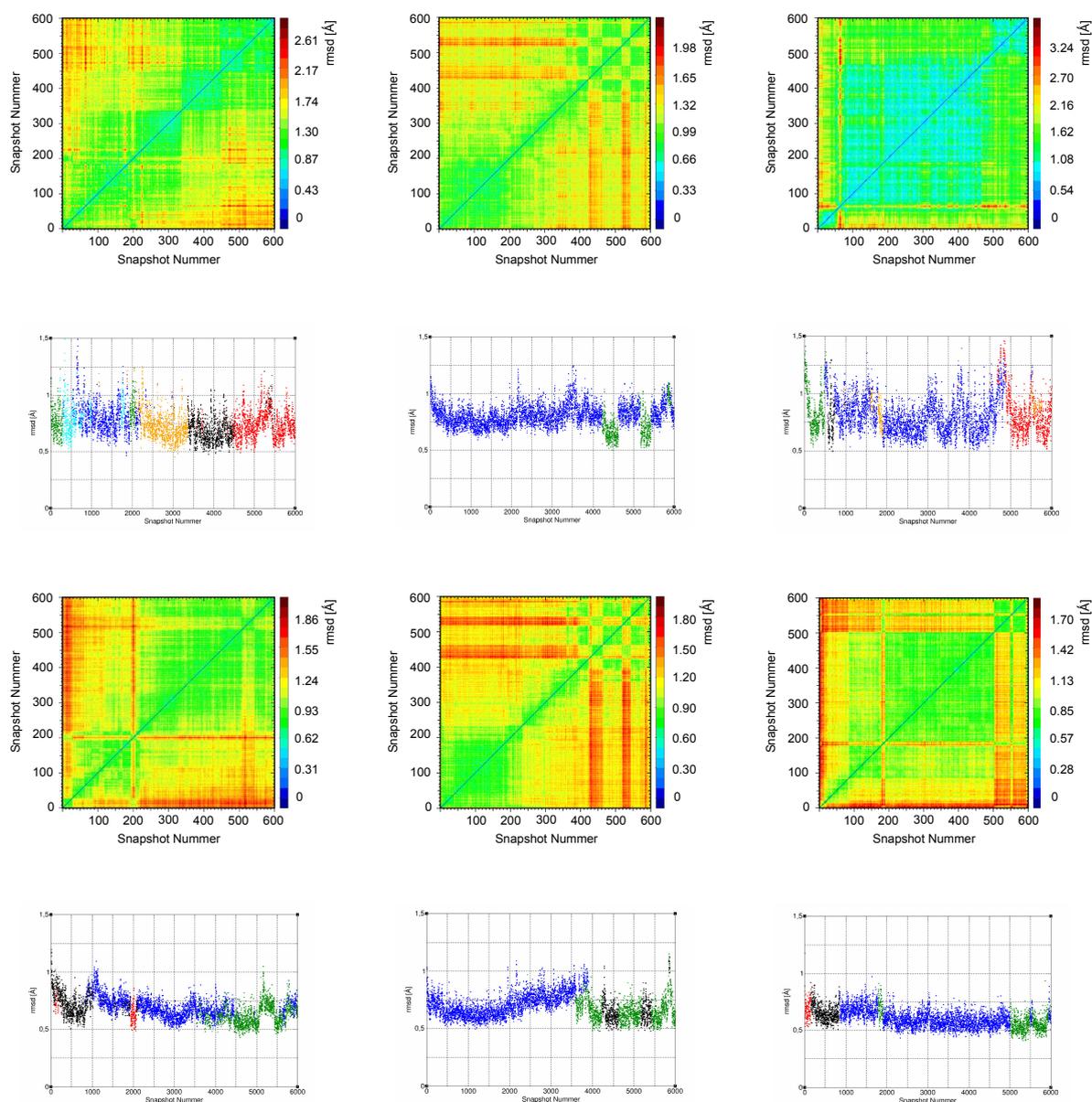
Winkel, in verschiedene Gruppen aufzuteilen (zu clustern) und somit inhärente Zusammenhänge zwischen unterschiedlichen im Laufe der MD-Simulation auftretenden Konformationen zu verdeutlichen bzw. der Trajektorie entsprechende repräsentative Konfigurationen zu extrahieren [328, 329].

Die auf diese Weise generierten Cluster zeichnen sich dadurch aus, dass die Datenpunkte innerhalb eines solchen Clusters mehr Ähnlichkeiten zueinander zeigen, als zu Punkten aus einem anderen Cluster.

Ausgehend von den in dieser Arbeit behandelten Trajektorien wurden ebenfalls Clustering-Analysen für die ITB-freien Komplexsimulationen versucht. Diese sollen Aufschluss über den Effekt der Insertion des in der Kristallstruktur 2nvd nicht aufgelösten Trp 219 auf die nachfolgende MD-Simulation geben. Dabei wurde ein Clustering von Strukturen aus den MD-Trajektorien mit fixiertem Cluster-Radius nach dem K-Means Algorithmus [330] gewählt und mit der bereits gezeigten Methode des 2D-RMS Plots verglichen. Der Cluster-Radius gibt die maximale Entfernung vom sogenannten Zentroid an, d.h. wie weit darf eine Struktur von der Durchschnittsstruktur im Raum, welche das Zentrum des Clusters repräsentiert, entfernt sein, dass sie nicht einem anderen Cluster zugeordnet wird.

Zu diesem Zweck wurden aus den drei Trajektorien der ITB-freien Komplexsimulation Snapshots im zeitlichen Abstand von 1 ps extrahiert und auf die Backbone Atome gefittet. Diese Snapshots beinhalten alle Aminosäuren der Bindetasche. Ein zweites entsprechendes Set dieser Strukturen enthält alle diese Aminosäuren mit Ausnahme des als sehr flexibel beobachteten Trp 219. Die Clusteranalyse mit fixiertem Cluster-Radius wurde mit dem Programm *kclust* der „Modeling Tools in Structural Biology“ MMTSB-Tools [331] durchgeführt. Die Analyse wurde dabei hinsichtlich der paarweisen RMSD-Werte aller Atome der Snapshots im Datenset relativ zum Zentroid des ermittelten Clusters durchgeführt. Der jeweilig gewählte Cluster-Radius der Analysen ist in den Darstellungen der ermittelten Cluster in Abb. 5.65 und 5.66 angegeben.

Die Clusteranalyse wurde zunächst für die drei Simulationen jeweils getrennt über eine Simulationsdauer von 6 ns durchgeführt. Auch die MD nach Variante C, welche in Abschnitt 5.4.4 über einen Zeitraum von 12 ns analysiert wurde, wird hier nur während der ersten 6 ns betrachtet. Trp 219 floss dabei in einem Fall in die Analyse mit ein, im anderen Ansatz wurde es vernachlässigt. Das Ergebnis ist in Abb. 5.65 vorgestellt. Die Kennzeichnung der Zugehörigkeit eines Snapshots zu demselben Cluster erfolgt durch eine Zuweisung derselben Farbe. Die Abbildung zeigt außerdem die bereits diskutierten 2D-RMS Plots aus Kapitel 5.4.4. Die darin auftretenden Cluster korrespondieren sehr gut mit den nun in diesem Kapitel gewonnenen. Natürlich reicht bei Nicht-Berücksichtigung von Trp 219 in der Analyse ein kleinerer Cluster-Radius aus, um eine ausreichende Gruppierung der Konformationen zu erhalten. Bei Betrachtung der Abbildung ist es auch wichtig, daran zu erinnern, dass bei der Generierung der 2D-RMS Plots nur jeder zehnte Snapshot berücksichtigt wurde und damit das Zeitintervall zwischen jedem 10 ps betrug, während hier jeder Snapshot in die Analyse einfließt und das Zeitintervall somit bei 1 ps liegt. Diese Tatsache bedingt auch den Unterschied in der Skalierung der x-Achse der 2D-RMS Plots und der Clusteranalyse mit fixiertem Cluster-Radius.



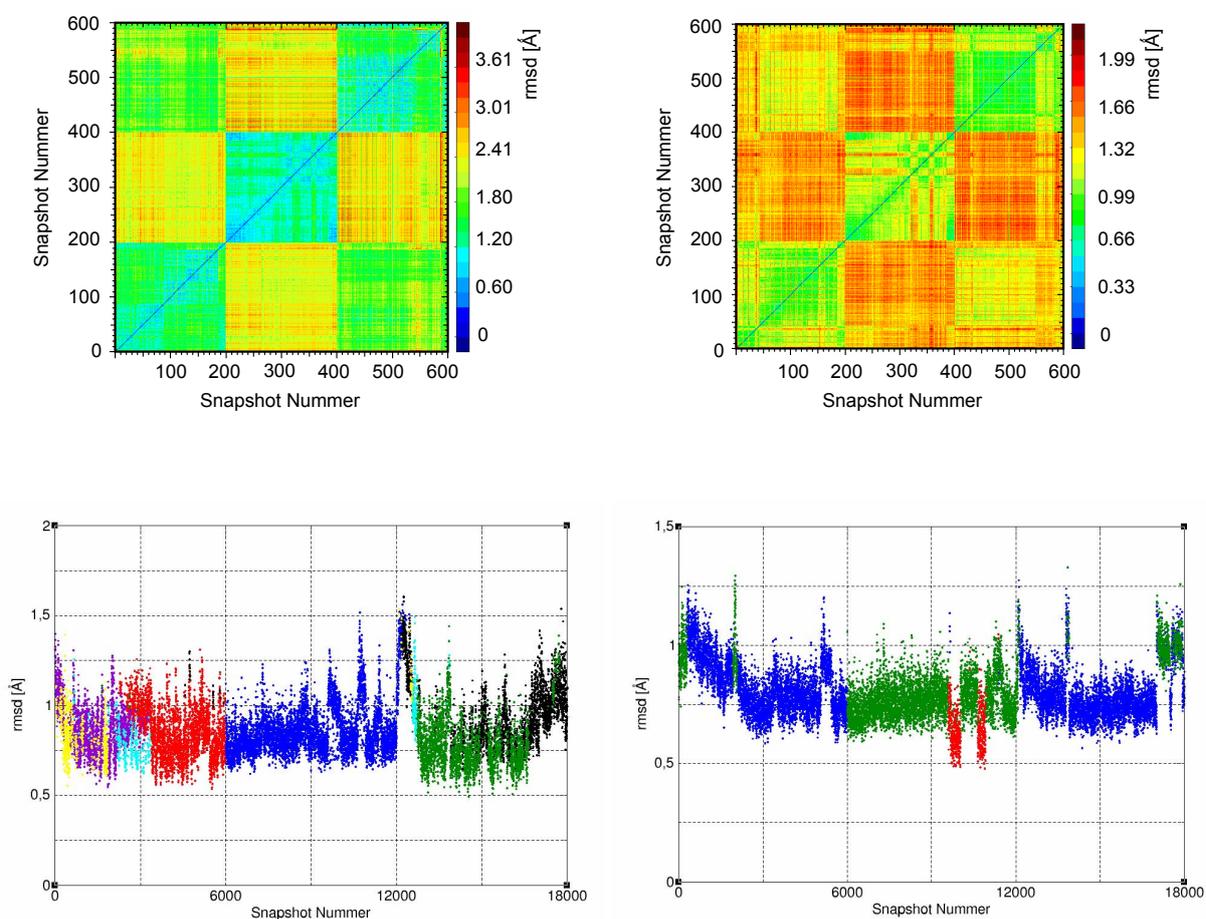
**Abbildung 5.65:** Clusteranalyse der ITB-freien Komplexsimulationen nach Variante A, B und C: *Erste Reihe:* 2D-RMS Plot der Bindetasche; *Zweite Reihe:* Ergebnis des Clusterings der Bindetasche mit fixiertem Cluster-Radius von 1.5 Å; *Dritte Reihe:* 2D-RMS Plot der Bindetasche ohne Trp 219; *Vierte Reihe:* Ergebnis des Clusterings der Bindetasche ohne Trp 219 mit fixiertem Cluster-Radius von 1.2 Å.

Die Ergebnisse der 2D-RMS Plots wurden somit für die drei getrennt voneinander betrachteten Varianten der ITB-freien Simulationen durch diese Cluster-Analyse bestätigt. Von Interesse ist aber auch eine gemeinsame Analyse aller drei Simulationen. Zu diesem

Zweck wurden nun ebenfalls entsprechende 2D-RMS Plots erstellt, wobei dazu nun aus Speichergründen jeder 30. Snapshot einfluss, d. h. der Trajektorie wurde alle 30 ps ein Snapshot entnommen. Variante A umfasst somit Snapshots 1 bis 200, Variante B von 201 bis 400 und Variante C jene von 401 bis 600. Die Ergebnisse zeigt Abb. 5.66. Von Interesse ist nun auch ein Vergleich dieser 2D-RMS Plots mit den Ergebnissen einer *kclust* Clusteranalyse, die nun ebenfalls anhand der Trajektorien aller drei Varianten (A-C) der ITB-freien Simulation durchgeführt wird. Die sich bei der Analyse aller drei Simulationen mit fixiertem Cluster-Radius ergebenden Cluster werden in Abb. 5.66 farblich unterschieden und den 2D-RMS Plots gegenübergestellt. Genauso wie bei der unabhängigen Betrachtung aller Einzeltrajektorien wurde auch hier in einem Fall Trp 219 der Bindetasche berücksichtigt, in dem anderen vernachlässigt. Auch bei dem hier angestellten Vergleich aller drei ITB-freien MD-Trajektoren korrelieren die *kclust*-Ergebnisse sehr schön mit den entsprechenden 2D-RMS Plots.

Auffallend ist allerdings bei Berücksichtigung der gesamten Bindetasche, dass die drei unter verschiedenen Bedingungen der Trp 219 Insertion gestarteten Simulationen sich voneinander unterscheiden. So zeigen die Ergebnisse für diese Analyse im Grunde genommen drei unterschiedliche Cluster, die den drei unterschiedlichen Simulationen entsprechen. Die Einführung von Trp 219 scheint somit einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf den weiteren Simulationsverlauf zu haben. Die Analyse ohne die Berücksichtigung des modellierten Restes zeigt dagegen, dass die Konformationen nach Variante A und C miteinander durchwegs ähnlicher sind, als die Konformationen, die sich nach Variante B ergeben. In Variante B wurde der gesamte Loopbereich von Arg 217 bis Glu 223 aus der 2nvc Kristallstruktur eingefügt, während Variante A und C nur den einen Rest Trp 219 betreffen. Die Insertion des Loops führt wohl zu größeren Spannungen in dem Enzym und somit zu einem abweichenden Verhalten als nach Variante A und C.

In dem Zusammenhang soll auch auf die unterschiedliche Skalierung beider 2D-RMS Plots hingewiesen werden. Während im 2D-RMS Plot bei Berücksichtigung vom sehr flexiblen Trp 219 RMSD-Werte von bis zu ca. 4 Å auftreten, sind es im Trp 219-freien Plot nur Werte bis ca. 2,2 Å. Die Konformationen mit Trp 219 unterscheiden sich voneinander viel bedeutender, was sich in höheren RMSD-Werten äußert. Es ergeben sich somit auch viel mehr (unterschiedliche) Cluster. Nur ein relativ kleiner Bereich um Snapshot 2500-3100 bzw. 13000-13100 definiert einen Variante A und C gemeinsamen Cluster. Aufgrund der relativ großen RMSD-Werte wurde hier ein Clusterradius von 1,8 Å verwendet. Ein geringerer Radius, wie im Falle der Nicht-Berücksichtigung von Trp 219, würde eine Aufspaltung in noch mehr verschiedene Cluster bewirken. Ein Clusterradius von 1,5 Å führt zu einer Verdopplung der Clusteranzahl von 7 auf 14 und macht die Analyse sehr unübersichtlich. Das *kclust*-Clustering zeigt aber auch hier eindeutig, dass die erreichten Konformationen aus Variante B, welche der Loopinsertion entspricht, sich eindeutig von den beiden anderen Varianten A und C unterscheiden, aber untereinander ähnlich sind.



**Abbildung 5.66:** Clusteranalyse der ITB-freien Komplexsimulationen nach Variante A, B und C: *Erste Reihe:* 2D-RMS Plot der Bindetasche mit (links) und ohne Trp 219 (rechts); *Zweite Reihe:* Ergebnis des Clusterings der Bindetasche mit fixiertem Cluster-Radius von 1,8 Å (links) 1,4 Å (rechts).

## 5.5 Zusammenfassende Bemerkungen

In diesem Unterkapitel soll ein kurzer, abschließender Überblick über die durchgeführten MD-Simulationen und die dabei beobachteten Charakteristika geliefert werden. In Tab. 5.5 werden die  $C\alpha$ -RMSD-Werte über das gesamte Protein, die  $C\alpha$ -RMSD-Werte und die „allatom“-RMSD-Werte der Bindetasche aller in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Simulationen aufgelistet.

**Tabelle 5.5:** Überblick über RMSD-Werte aller MD-Simulationen.

MD-Simulation	$C\alpha$ -RMSD [ $\text{\AA}$ ]	$C\alpha$ -RMSD der Bindetasche [ $\text{\AA}$ ]	„all-atom“- RMSD der Bindetasche [ $\text{\AA}$ ]
ITA-Komplexsimulation	$1,07\pm 0,11$	$0,66\pm 0,11$	$1,12\pm 0,13$
ITA-freie Komplexsimulation	$0,94\pm 0,08$	$0,68\pm 0,11$	$1,05\pm 0,15$
ITB-Komplexsimulation (Variante A)	$1,32\pm 0,21$	$1,19\pm 0,38$	$1,59\pm 0,47$
ITB-Komplexsimulation (Variante B)	$1,39\pm 0,19$	$1,17\pm 0,39$	$1,47\pm 0,35$
ITB-Komplexsimulation (Variante C)	$1,17\pm 0,14$	$0,74\pm 0,12$	$1,66\pm 0,21$
ITB-freie Komplexsimulation (Variante A)	$1,36\pm 0,14$	$0,76\pm 0,14$	$1,47\pm 0,29$
ITB-freie Komplexsimulation (Variante B)	$1,18\pm 0,17$	$0,70\pm 0,11$	$1,06\pm 0,15$
ITB-freie Komplexsimulation (Variante C)	$1,25\pm 0,21$	$1,27\pm 0,21$	$2,16\pm 0,32$
ITB-Komplexsimulation ohne „improper torsion“ Terme (Variante A)	$1,04\pm 0,10$	$0,92\pm 0,26$	$1,34\pm 0,37$
ITB-Komplexsimulation ohne „improper torsion“ Terme (Variante B)	$1,15\pm 0,15$	$0,64\pm 0,11$	$0,91\pm 0,10$
ITB-Komplexsimulation ohne „improper torsion“ Terme (Variante C)	$1,13\pm 0,09$	$0,89\pm 0,21$	$1,71\pm 0,35$
ITB-Komplexsimulation mit optimiertem ITB (Variante A)	$1,30\pm 0,19$	$0,74\pm 0,13$	$1,26\pm 0,12$
ITB-Komplexsimulation mit optimiertem ITB ohne „improper torsion“ Terme (Variante A)	$1,13\pm 0,10$	$0,92\pm 0,34$	$1,53\pm 0,61$

Die RMSD-Werte der Simulationen ausgehend von der 2nvc (ITA) Kristallstruktur sind generell kleiner als jene der 2nvd (ITB) Kristallstruktur. Die Existenz des in der 2nvd Struktur nicht aufgelösten Trp 219 und die Notwendigkeit seiner Modellierung spielt hier natürlich eine große Rolle.

Die „all-atom“-RMSD-Werte sind gegenüber jenen der  $C\alpha$ -RMSD-Werte der Bindetasche erhöht, was durch die konformationellen Änderungen der Seitenkettenorientierungen be-

dingt wird.

Bei einem Vergleich der Simulationen mit und ohne gebundenem ITB fällt auf, dass erstaunlicherweise für Variante A und B die RMSD-Werte der Bindetasche für die ITB-freie Simulation kleiner sind, als jene mit gebundenem Inhibitor, was eventuell auch darauf zurück zu führen ist, dass „improper torsion“ Terme den Liganden in eine planare Konformation zwingen und dies entscheidende Einflüsse auf die Bindetasche hat, welche somit stärkeren Veränderungen unterliegt, um die Planarität zu gewähren. Die ebenfalls aufgelisteten RMSD-Werte der MD-Simulationen, welche ohne diese Terme gestartet wurden, bestätigen diese Vermutung: Für die Varianten A und B sind die RMSD-Werte der Bindetasche im Falle der ohne „improper torsion“ Terme gestarteten MD-Simulationen tatsächlich kleiner als die RMSD-Werte der Bindetasche, welche beim Start der entsprechenden MDs unter Miteinbeziehung von „improper torsion“ Termen erhalten wurden.

In der Version der MD-Simulation, in welcher der Ligand bereits in seiner optimierten und planaren Konformation eingesetzt wurde, liegt der RMSD-Wert der Bindetasche in dem Bereich wie jener ohne Verwendung der „improper torsion“ Terme. Die aktiven „improper torsion“ Terme zwingen den Liganden nämlich dazu, von Anfang an in seiner planaren Geometrie zu verbleiben, was keine tiefgreifenden Veränderungen in der Proteinumgebung bewirkt. Dasselbe gilt auch für die erwähnte Simulation ausgehend vom gewinkelten Liganden ITB ohne Verwendung der entsprechenden Terme, da auch hier der Ligand weitestgehend stabil in seiner Konformation verbleiben kann, da ihm keine Planarität aufgezwungen wird. Für die RMSD-Werte der Bindetasche ergeben sich daher kleinere Werte. Zudem wird in dieser Variante die für die gewinkelte Ligandengeometrie verantwortliche H-Brücke zwischen Trp 20 und der Carboxylatgruppe in 2-Position des Liganden 37,42% der Simulationsdauer lang (siehe Tabelle 5.4) ausgebildet. Wie bereits in Abschnitt 5.4.3.2 erwähnt, ist die pyramidale Geometrie des Liganden in der ALR2-Bindetasche durch diese H-Brücke begünstigt und stabilisiert die Tasche in ihrer Konformation über den Simulationsverlauf, weswegen kleinere RMSD-Werte zustande kommen. Die Möglichkeit der Ausbildung der H-Brücke ist also ein entscheidendes Kriterium für die RMSD-Werte der Bindetasche.

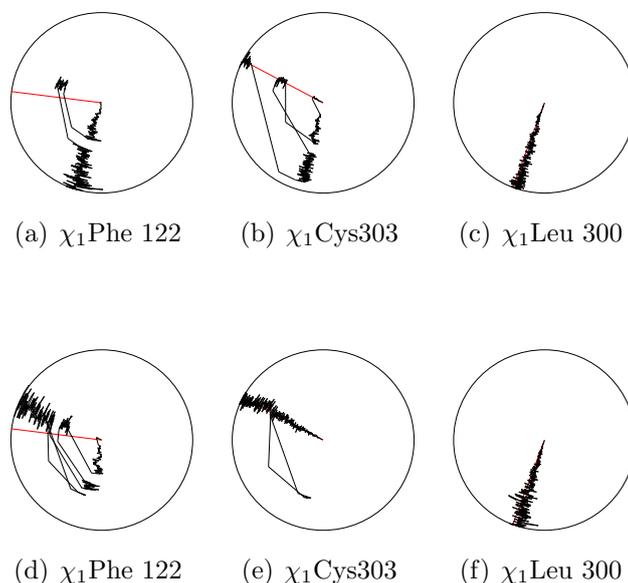
Sobald in der Version des optimierten Liganden die „improper torsion“ Terme nicht in die Simulation einfließen, steigt der RMSD-Wert der Bindetasche an. Der Ligand wird hier nämlich nicht in seiner Planarität festgehalten und unterliegt somit Veränderungen in seiner Konformation in einer Umgebung, die noch nicht optimal an seine zu Simulationsbeginn planare Geometrie angepasst ist. Wie in Abschnitt 5.4.3.2 beschrieben, erreicht die relative Häufigkeit in der Ausbildung der H-Brücke zwischen Trp 20 und der Carboxylatgruppe in 2-Position des Liganden einen Wert von 13,50% und ist damit um ca. 11% größer als in der Simulation mit Verwendung von „improper torsion“ Termen ausgehend vom gewinkelten Liganden. Die Veränderungen in der Konformation des Liganden führen in der unmittelbaren Proteinumgebung zu erhöhten RMSD-Werten, da eine Ausbildung der energetisch günstigen H-Brücke, induziert durch eine durch Verzicht auf die „improper torsion“ Terme ermöglichte Konformationsänderung des Liganden, angestrebt wird. In der MD-Simulation mit planarem Liganden ITB und „improper torsion“ Termen sind die RMSD-Werte der Bindetasche kleiner, weil der Ligand planar verbleibt und keine Möglichkeit hat, durch eine Änderung seiner Geometrie die H-Brücke auszubilden. Was die Planarität betrifft, so

ergeben sich für diese im Verlauf der MD ohne Einsatz von „improper torsion“ Termen tatsächlich größere Schwankungen als beim Gebrauch dieser Terme (siehe Abb. 5.40). Die MD-Simulationen ohne „improper torsion“ Terme wurden in Unterkapitel 5.4.3.2 näher beschrieben.

Anders verhält es sich für Variante C. Hier sind die RMSD-Werte der ITB-freien Simulation deutlich erhöht. Hauptverantwortlich hierfür ist allerdings Trp 219 selbst, welches in der Geometrie aus der 2nvc Kristallstruktur eingefügt wurde und selbst sehr große Veränderungen zeigt (siehe Abb. 5.58 in Kapitel 5.4.4).

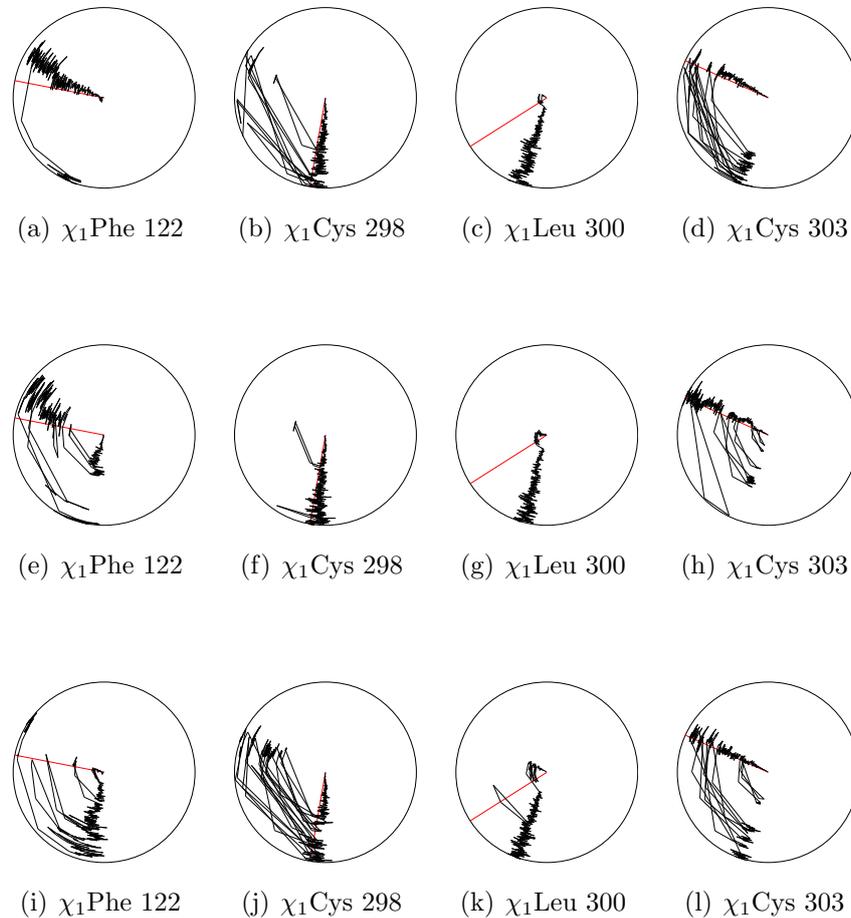
Im Vergleich mit den ligandenfreien Simulationen nach Variante A und B zeigt die entsprechende Simulation nach Variante C einen wesentlich größeren  $C\alpha$ -RMSD-Wert der Bindetasche. Bei der Simulation mit ITB in der Bindetasche sinkt dieser RMSD-Wert nach Variante C aber erstaunlicherweise unter die Werte aus Variante A und B. Die Simulation nach Variante C der Einfügung von Trp 219 scheint also den größten Einfluss auf die Bindetasche zu haben, falls alle Atome der Bindetaschenamino-säuren berücksichtigt werden. Variante B hingegen, welche die Einfügung des gesamten Loops zwischen den Resten Arg 217 und Glu 223 darstellt, übt in der ligandenfreien Simulation den geringsten Einfluss auf das gesamte Protein aus.

Wird rückblickend noch die Simulation des ITA-Liganden betrachtet und auf die wesentlichen Erkenntnisse daraus eingegangen, muss hervorgehoben werden, dass eine vielfache Änderung der Orientierung des Phenylringes von Phe 122 offensichtlich ist. Abb. 5.67 zeigt die  $\chi_1$ -Winkel der Reste mit den einschneidendsten Veränderungen. Dabei wird in der Simulation, in welcher der Inhibitor ITA in der Bindetasche vorliegt, deutlich, dass eine Kopplung in der Bewegung von Phe 122 und Cys 303 vorliegt. Eine Änderung ihres Winkels liegt immer gleichzeitig vor.



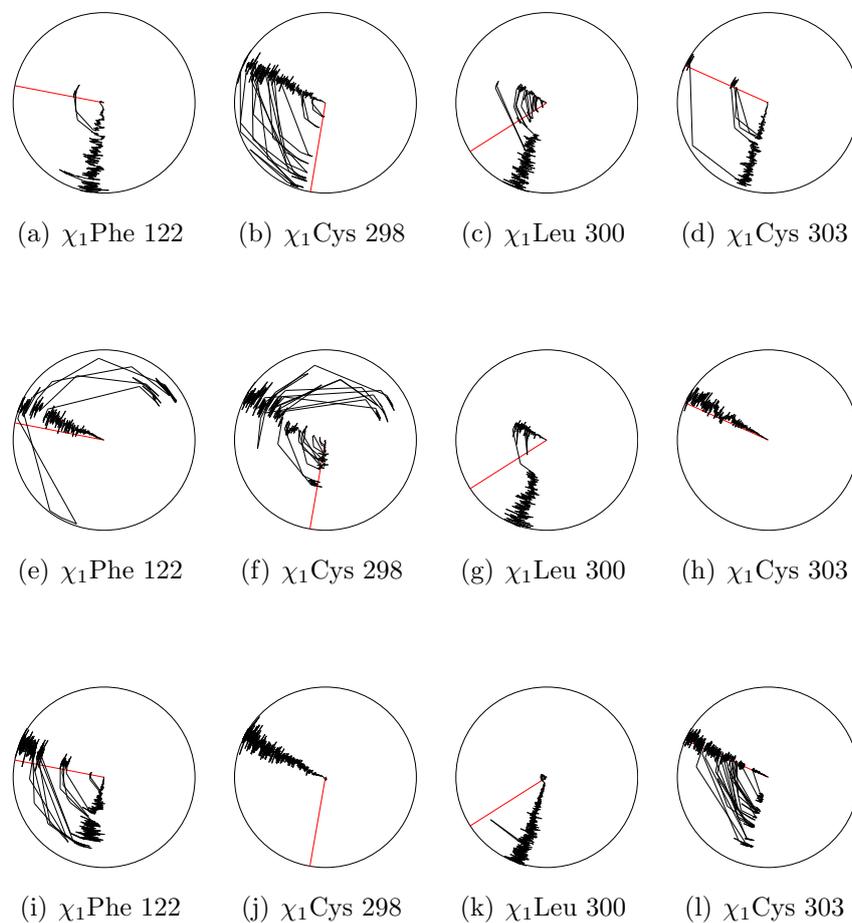
**Abbildung 5.67:** Vergleich der  $\chi_1$ -Winkel aller ALR2-ITA-Simulationen: *Erste Reihe:* ITA-Komplexsimulation; *Zweite Reihe:* ITA-freie Komplexsimulation.

In den Simulationen, welche ausgehend von der 2nvd Komplexstruktur durchgeführt wurden, zeigt ein Vergleich von Abb. 5.68 und 5.69, dass in der Simulation mit und ohne gebundenen Liganden Leu 300 immer seinen  $\chi_1$  Winkel ändert und den ursprünglichen Wert auch nicht mehr zurückgewinnt. Annähernd ist auch hier eine Kopplung in der Orientierung von Cys 303 und Phe 122 erkennbar. In den Simulationen, in denen sich der  $\chi_1$ -Winkel vom Wert aus der Kristallstruktur wegbewegt, trifft dies für beide Aminosäuren zu. Bleibt der  $\chi_1$ -Winkel des einen den Großteil der Simulation über in dem Bereich des Wertes aus der Kristallstruktur, dann trifft das auch für den anderen zu. Betrachtet man den  $\chi_1$ -Winkel von Cys 298, fällt auf, dass in allen drei Varianten der ALR2-ITB-freien Simulation dieser seinen Ausgangswert von  $-179,15^\circ$  auf einen Wert von ca.  $65^\circ$  ändert. Wenn der Ligand in der Tasche vorliegt, bleibt dieser Winkel weitestgehend stabil in seiner Ausgangslage. Der Grund für diese Beobachtung ist, dass in der 2nvd Kristallstruktur Cys 298 mit seiner Thiolgruppe in Richtung Spezifitätstasche und damit nicht auf Trp 20 hin weist. Dies steht im Gegensatz zu allen anderen ALR2-Komplexstrukturen. Dadurch kann hier aber dem Naphthylring von ITB Platz gegeben werden. Solange ITB in der Simulation in der Bindetasche vorliegt, bleibt diese Situation bestehen. Wird der Inhibitor entfernt, wird diese Erweiterung der Bindetasche durch Cys 298 geschlossen.



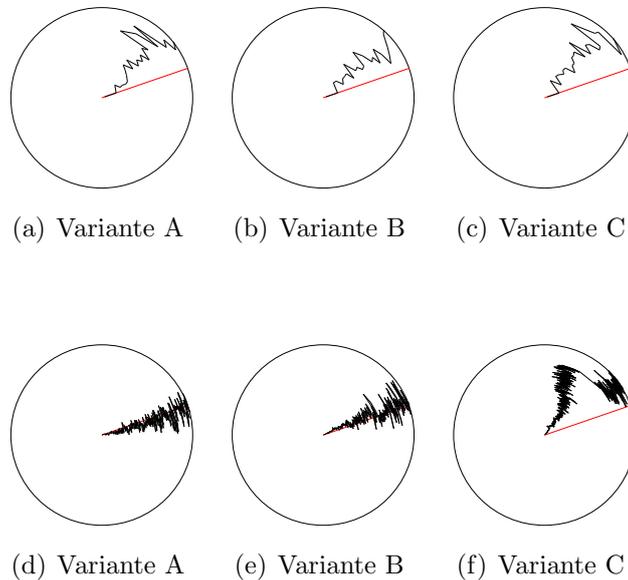
**Abbildung 5.68:** Vergleich der  $\chi_1$ -Winkel der ALR2-ITB-Komplexsimulationen: *Erste Reihe:* Variante A; *Zweite Reihe:* Variante B; *Dritte Reihe:* Variante C.

Ein wesentlicher Punkt, welcher die 2nvd Kristallstruktur auszeichnet, ist die Orientierung von Trp 20, welches hier eine neue Untertasche öffnet. Solange ITB in der Tasche vorliegt, bleibt diese natürlich bestehen. Von Interesse ist nun allerdings, was mit ihr passiert, wenn der Ligand aus der Kristallstruktur entfernt und eine MD-Simulation gestartet wird. Abb. 5.70 zeigt den  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 im Laufe der Equilibrierung und der anschließenden MD-Simulation für alle drei Varianten der Trp 219 Insertion. Dabei fällt eine Schließung der Tasche bereits in der Equilibrierungsphase auf, wenn sich der Wert des betrachteten Winkels von  $70,91^\circ$  auf ca.  $55^\circ$  ändert. In der anschließend gestarteten MD-Simulation ändert sich nun aber gleich zu Beginn dieser auf den Wert der Kristallstruktur, allerdings nur für Variante A und Variante B der Modellierung des fehlenden Restes Trp 219. Anders ist dies in Variante C, in welcher Trp 219 in seiner Geometrie aus 2nvc in die 2nvd Kristallstruktur eingefügt wurde. Hier wird die Schließung der Tasche, die



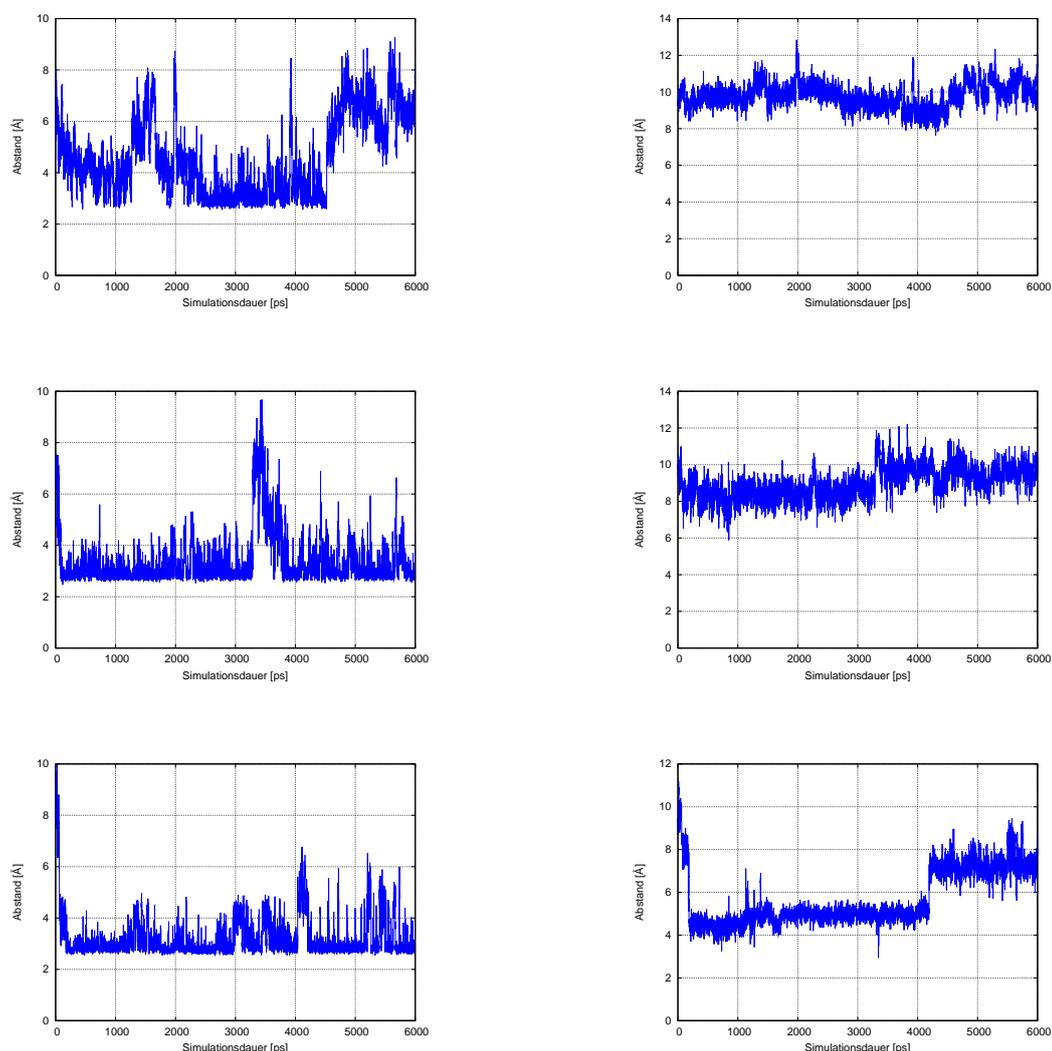
**Abbildung 5.69:** Vergleich der  $\chi_1$ -Winkel der ALR2- ITB-freien Komplexsimulationen: *Erste Reihe:* Variante A; *Zweite Reihe:* Variante B; *Dritte Reihe:* Variante C.

in der Equilibrierungsphase erreicht wird, auch in den nächsten 10 ns der MD-Simulation beibehalten. Dies bringt eine Orientierung von Trp 20 mit sich, die auch in allen anderen ALR2-Komplexen vorliegt. Nachher klappt Trp 20 aber wieder um und öffnet erneut die Untertasche, obwohl kein Ligand ITB vorliegt.



**Abbildung 5.70:** Vergleich der  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 der ALR2-ITB-freien Komplexsimulationen: *Erste Reihe:* während der Equilibrierungsphase; *Zweite Reihe:* während der MD-Simulation.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Distanzen, welche die von Lys 21 ausgehenden und in allen anderen ALR2-Komplexstrukturen vorliegenden Salzbrücken charakterisieren. Abb. 5.71 liefert auch hier einen Überblick über die drei Varianten der Simulationen, welche kein ITB in der Bindetasche vorliegen haben. Auch hier zeigt sich, dass sich Variante C von den beiden anderen abhebt. Hier ist nämlich im Gegensatz zu Variante A und B die Tendenz erkennbar, beide Salzbrücken wieder auszubilden. Dies gilt vor allem für jene zur Phosphatgruppe des Kofaktors  $\text{NADP}^+$ . In den beiden anderen Fällen bleibt der Distanzwert zwischen dem Phosphatsauerstoff des Kofaktors immer konstant hoch bei ca. 10 Å. In Variante C sinkt dieser Wert innerhalb der ersten 300 ps auf ca. 4 Å, was mit der enormen Änderung der Orientierung von Trp 219 in Zusammenhang gebracht werden kann (siehe Abb. 5.58). Die Salzbrücke zu Asp 216 wird in allen drei Varianten wieder eingegangen.



**Abbildung 5.71:** Vergleich wichtiger Abstände in den drei Varianten der ALR2-ITB-freien Komplexsimulationen. Von links nach rechts: Abstand zwischen Nε von Lys 21 und Carboxylat-O von Asp 216, Abstand zwischen Nε von Lys 21 und Phosphat-O des Kofaktors NADP<sup>+</sup>. *Erste Reihe:* Variante A; *Zweite Reihe:* Variante B; *Dritte Reihe:* Variante C.

Abschließend lässt sich sagen, dass die verschiedenen Arten der Insertion von Trp 219 mitunter zu erheblichen Unterschieden in der Proteinantwort führen, wie z.B. beim Verhalten von Trp 20 bzw. in der Folge auch von Lys 21. Aufgrund der erhöhten RMSD-Werte im Falle der ALR2-ITB-Simulation nach Variante B bei Loopinsertion wird davon ausgegangen, dass die Seitenkettenkonformationen aus der 2nvc Struktur inkompatibel mit der Bindung des Liganden B sind und somit die beiden strukturell sehr ähnlichen Liganden

tatsächlich auch Unterschiede im „saftey-belt“-Bereich induzieren. Die ITB-freie Simulation nach dieser Variante zeigt im Gegensatz dazu die kleinsten RMSD-Werte, was damit zusammenhängt, dass die bei Loop-Insertion ins System gebrachten Spannungen sich in Richtung Scharnierbereich der Schleifenregion um Trp 219 verteilen. Diese sind ohnehin für die erhöhte Flexibilität in diesem Proteinabschnitt verantwortlich und gleichen hier nun die Störung des Systems aus. Zudem liegt kein Ligand ITB vor, der zu zusätzlichen Turbulenzen aufgrund der Unvereinbarkeit mit der 2nvc Struktur führen würde.

Was die in der Kristallstruktur 2nvd beobachtete neue Subtasche betrifft, wurde bei allen drei Varianten ein Schließen der Subtasche bei nicht vorhandenem ITB im Laufe der Equilibrierung beobachtet. Nur in der anschließenden MD-Simulation nach Variante C wurde nach 10 ns die Untertasche durch eine Rotation um den  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 wieder geöffnet und blieb daraufhin für die restlichen 2 ns Simulation bestehen. Bei den Simulationen nach Variante A und B öffnete sie sich sofort nach dem der Equilibrierung angeschlossenen Start der eigentlichen MD-Simulation. Da die neue Subtasche in allen drei Varianten unabhängig von dem Vorhandensein des Liganden ITB zugänglich war, sollte bei einem zukünftigen Design neuer ALR2-Inhibitoren versucht werden, diese neue Untertasche zu adressieren.

In jeder bekannten ligandgebundenen Kristallstruktur der ALR2 liegt eine H-Brücke zwischen dem N $\epsilon$  von Lys 21 und dem Carboxylat-O von Asp 216 vor. In der Kristallstruktur mit gebundenem ITB (2nvd) ist Lys 21 solvensexponiert, um sterische Clashes mit Trp 20 zu vermeiden. Die H-Brücke liegt demnach in der experimentell ermittelten Struktur nicht vor. In allen ligandfreien MD-Simulationen, die von der 2nvd Kristallstruktur ausgehend durchgeführt wurden und somit auch in jenen, in welchen die Subtasche durch die Trp 20 Rotation geöffnet bleibt, wird diese Brücke wieder ausgebildet, was vor allem auf enorme Anpassungen im „saftey-belt“-Bereich des Enzyms zurückgeführt wird. Im Falle der MD-Simulationen, die mit gebundenem ITB gestartet wurden, wird sie in Variante A und C ebenfalls wieder ausgebildet. Im Laufe der Simulation nach Variante B ist dies nicht möglich, da die Loopinsertion aus 2nvc bei vorhandenem Liganden ITB eine viel zu große Störung im System darstellt und der Loop ständig fluktuiert (siehe Abschnitt 5.4.2).

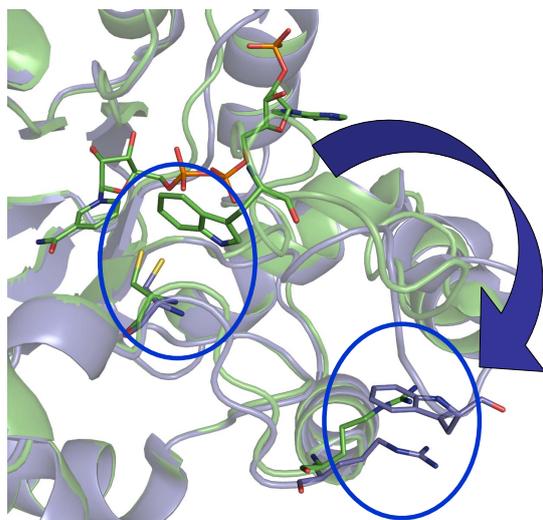
Der Grund für die gebrochene Salzbrücke zwischen dem N $\epsilon$  von Lys 21 und dem Carboxylat-O von Asp 216 in der 2nvd Kristallstruktur liegt vermutlich in den experimentellen Bedingungen der Röntgenstrukturanalyse. Im modellierten Solvens fluktuiert der Loop bei 300 K stark und die H-Brücke wird wieder ausgebildet.

Abschließend lässt sich keine der drei durchgeführten Varianten der Insertion von Trp 219 als geeignetste hervorheben. Die geringfügigen Änderungen bei der Insertion bzw. im „saftey-belt“-Bereich führen zu großen und unterschiedlichen Auswirkungen im Verlauf der Simulation. Insgesamt zeigt sich, dass bei der Wahl des Ausgangspunktes einer MD-Simulation bereits eine Einschränkung bzgl. des Samplings des dafür zugänglichen Phasenraumes getroffen wird. Dies macht auch verständlich, weshalb nicht alle drei Varianten der MD zu denselben Zuständen konvergieren. In Modelling-Studien sollte dieses Sampling-Problem Berücksichtigung finden, indem mehrere MD-Simulationen mit unterschiedlichen Ausgangsstrukturen gestartet und analysiert werden.

## 6 SMD-Simulationen: Übergang der Holo- in die Apo-Form der Aldose Reduktase

Viele Enzyme sind auf die Anwesenheit eines Kofaktors angewiesen, um das katalytisch aktive Holo-Enzym zu formen. Im Falle der in dieser Arbeit behandelten Aldose Reduktase übernimmt Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) diese Funktion. Kinetische Studien erklären die Substratreduktion durch ein sequentielles Binden des Kofaktors und nachfolgend des Aldehyds [332, 333]. Der gebildete Enzym-Kofaktor Komplex erfährt eine langsame, geschwindigkeitsbestimmende konformationelle Änderung während der katalysierten Reduktionsreaktion, die der oxidierten Form des Kofaktors eine Dissoziation ermöglicht [334, 335]. Für die Reduktion an sich dient Tyr 48 als Protonendonator [91, 336], wobei His 110 für die Stereochemie des Hydridtransfers verantwortlich ist [89]. Sobald der Kofaktor in die Tasche der ALR2 bindet, wird er tief in der Tasche vergraben, was von einer Loopbewegung begleitet wird, auf die noch später im Text näher eingegangen wird. Diese Konformationsänderung führt zu einem kompakten und affinen Binden des Kofaktors, welches zu einer Sättigung der ALR2 mit NADPH führt und damit ein schnelles und zweckmäßiges Reduzieren von im Organismus auftretenden Aldehyden erlaubt.

NADPH bindet mit hoher Spezifität an die Aldose Reduktase und ist affiner als NADH ( $K_d < 1\mu\text{M}$  vs. 1.2 mM). Der Hauptgrund dafür liegt in zwei starken Salzbrücken zwischen der 2'-Phosphatgruppe von NADP(H) und den Resten Lys 262 und Arg 268 [337]. Durch Mutation von Arg 268 in ein Alanin wurde die Ausbildung der einen H-Brückenwechselwirkung vermieden und damit die Ermittlung einer apo-Kristallstruktur ermöglicht [84]. Die Struktur mit PDB-Code 1xgd zeigt tatsächlich die angenommene Verschiebung des sogenannten „safety-belt“ (Bereich zwischen Ser 214 und Ser 226), welche in allen Kofaktor-gebundenen Strukturen nicht vorkommt. Ein Abstand von 17 Å ist zwischen den  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 im Strukturvergleich mit einer repräsentativen holo-Struktur (PDB-Code 1ads) messbar. Trp 219 selbst ist an Wechselwirkungen beteiligt, die den Loop in der holo- oder apo-Form stabilisieren und die entsprechenden Konformationen charakterisieren. Trp 219 wechselt in dieser Funktion von einer Schwefel-Aren Wechselwirkung mit Cys 298 in der Nukleotid-gebundenen, „geschlossenen“ Konformation in eine aromatische  $\pi$ -Stapelwechselwirkung mit Arg 293 in der Nukleotid-freien, „offenen“ Konformation (siehe Abb. 6.1). Zudem ist der „geschlossene“ Zustand der ALR2 durch zwei H-Brücken zwischen dem  $N\epsilon$ -Atom von Lys 21 und einer Phosphatgruppe von  $\text{NADP}^+$  einerseits und der Carboxylatseitenkette von Asp 216 andererseits gekennzeichnet.



**Abbildung 6.1:** Vergleich der 1ads-Holo- (grün) und 1xgd-Apo-Enzymform (violett). Dargestellt ist die Schwefel-Aren Wechselwirkung zwischen Trp 219 und Cys 298 in der kofaktorgebundenen und die  $\pi$ -stacking Wechselwirkung zwischen Trp 219 und Arg 293 in der kofaktorfreen Struktur.

Um ein detaillierteres Verständnis der strukturellen Veränderungen im Zuge des Austausches des Kofaktors sowie des Konformationsraumes der ALR2 zu erwerben, wurden in dieser Arbeit Steered Molekuldynamik-Simulationen (SMD) durchgeführt, die einen geeigneten Austrittspfad von  $\text{NADP}^+$  finden sollten. In diesem Kontext wurde ein Augenmerk auf die erwartete Bewegung des als „safety-belt“ bezeichneten Loops gelegt, die den Übergang von holo nach apo kennzeichnen sollte. Beobachtungen, wie die Freisetzung eines Liganden oder Kofaktors oder auch Denaturierungsprozesse sind durch klassische MD-Simulation nur sehr schwer und mit sehr langen Simulationsdauern zu erreichen. Die SMD-Simulationen eröffnen eine Möglichkeit, ein solches Ereignis zu induzieren, indem sie ein System entlang eines bestimmten Pfades durch Einwirkung einer Kraft zwingen. Diese Methode stellt damit eine Möglichkeit dar, große Veränderungen in Biomolekülen in rechenzeitlich sinnvollen Abschnitten zu erreichen und kann als *in silico* Ergänzung zu der Atomkraftmikroskopie (AFM) angesehen werden.

## 6.1 Vorgehensweise

Die Kristallstruktur der Holo-Form der Aldose Reduktase wurde aus der RCSB Protein Datenbank [70] (PDB-Code 1ads) entnommen und als Startpunkt für die Steered Molekuldynamik-Simulationen herangezogen. Diese wurden mit dem NAMD Simulationsprogramm [37] der Versionen 2.6 und 2.7 unter Verwendung des AMBER Kraftfeldes [310, 312] durchgeführt. Vorbereitende Schritte zur Parametrisierung und Minimierung wurden mit AMBER 9.0 und dem Cornell et al. Kraftfeld [313] in der Variante des parm99 Parametersets [30] ausgeführt. ANTECHAMBER weist dem Liganden seine Parameter aus dem GAFF Kraftfeld zu [316], Parameter für den Kofaktor  $\text{NADP}^+$  wurden einer früheren Studie entnommen [77]. Ausgehend von der Liganden- und Kofaktorkonformation der Kristallstruktur wurden beiden mit Hilfe von ANTECHAMBER unter Verwendung der RESP

Methode [34, 35] Ladungen durch Fitten auf das quantenmechanisch bestimmte elektrostatische Potential zugewiesen. Die dafür notwendigen *ab initio* Berechnungen wurden mit GAUSSIAN03 [314] durchgeführt. Wasserstoffatome wurden unter Verwendung von AMBER Templates hinzugefügt.

Vor Simulationsbeginn wurde die auf diese Weise parametrisierte Kristallstruktur (1ads) *in vacuo* einer 200-Schritt „steepest descent“ Energieminimierung unterzogen. Natriumionen wurden hinzugefügt und im Minimum des elektrostatischen Potentials platziert, um eine Neutralität des Systems zu gewährleisten. Dieses wurde in einer TIP3P-Box von Wassermolekülen solvatisiert [318]. Die Box enthielt insgesamt 8129 Wassermoleküle, 73 NADP<sup>+</sup>-Atome und 1 Na<sup>+</sup>-Gegenion und umfasste ein Volumen von  $\sim 70 \times 75 \times 80 \text{ \AA}^3$ .

Nach der Solvatisierung wurde eine Phase der Equilibrierung eingefügt. Diese bestand in einer 100 Schritte langen „conjugate gradient“ Minimierung des solvatisierten Enzym-Kofaktor Komplexes und in einer nachfolgenden, 1 ns langen MD-Simulation bei 300 K unter konstantem Druck. Das stabile System wurde anschließend als Ausgangspunkt der verschiedenen SMD-Simulationen verwendet, die mit Hilfe der Langevin-Dynamik und einer Kopplungskonstante von  $5 \text{ ps}^{-1}$  bei einer konstanten Temperatur von 300 K durchgeführt wurden.

Für die van der Waals Wechselwirkungen wurde ein Distanz-Ausschlusskriterium von  $12 \text{ \AA}$  gewählt. Die langreichweitigen elektrostatischen Wechselwirkungen wurden mit der PME (Particle Mesh Ewald) Methode [319] berechnet. Der Zeitschritt der Simulationen betrug 2 fs. Energiedaten wurde alle 0,2 ps und Koordinaten alle 0,5 ps gespeichert. Alle Simulationen liefen unter periodischen Randbedingungen im NPT Ensemble.

Um nun eine Dissoziation des Kofaktors zu erwirken, wurde die „Constant Velocity (CV)“ SMD-Methode gewählt. Wie in Kapitel 3.1.2 erwähnt, ist die dahinterstehende Grundidee die Einwirkung einer externen Kraft auf ein Atom oder eine Gruppe von Atomen [42] (per Definition als SMD-Atom bezeichnet) über eine an sie gekoppelte harmonische Feder. Diese Feder bewegt sich mit einer bestimmten, konstanten Geschwindigkeit in eine definierte Richtung [37].

SMD-Simulationen müssen aufgrund der artifiziellen Kraft, die auf bestimmte Atome des Systems einwirkt, unter dem Gesichtspunkt eines Nicht-Gleichgewichts-Prozesses betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde beschlossen, der SMD-Simulation eine 4 ns lange, klassische MD-Simulation als nachgeschaltete Equilibrierungsphase hin zu einem Gleichgewicht anzuhängen. Die sich daraus ergebenden weiteren strukturellen Veränderungen wurden evaluiert.

Neben der Wahl eines geeigneten Pfades für den Kofaktorausritt, war auch die Wahl der in SMD-Simulationen zentralen Parameter, der Ziehgeschwindigkeit  $\vec{v}$  und der Federkonstante  $k$ , entscheidend. Die Wahl dieser ist keine triviale Angelegenheit und systemabhängig.

Die strukturellen Eigenheiten des Enzyms während des Kofaktoraustritts werden in den folgenden Unterkapiteln beschrieben. Da sich der Loopbereich (Ser 214 - Ser 226) zwischen der Holo- und Apo-Enzymform unterscheidet, wurde speziell dieser Abschnitt untersucht. Vor allem interessiert die Orientierung von Trp 219, welches in beiden Formen unterschiedliche Wechselwirkungen eingeht (mit Cys 298 und Arg 293). Zur Feststellung einer möglichen

Annäherung der interessierenden Reste und Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen ihnen, wurden die Abstände zwischen den  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 sowie Arg 293 im SMD-Simulationsverlauf gemessen. In der kofaktorgebundenen Holo-1ads-Struktur beträgt der  $C\alpha$ -Abstand zwischen Cys 298 und Trp 219 9,55 Å und wächst auf 16,80 Å in der kofaktorfreen Apo-1xgd-Struktur an. Ein Augenmerk wurde auch auf die mögliche Ausbildung einer  $\pi$ -Stapelwechselwirkung zwischen Arg 293 und Trp 219 gelegt, welche die Apo-Form charakterisiert. Auch hier diente der  $C\alpha$ -Abstand zwischen beiden Resten als Maßstab. In der Holo-Form beträgt er 18,90 Å und in der Apo-Form 10,50 Å.

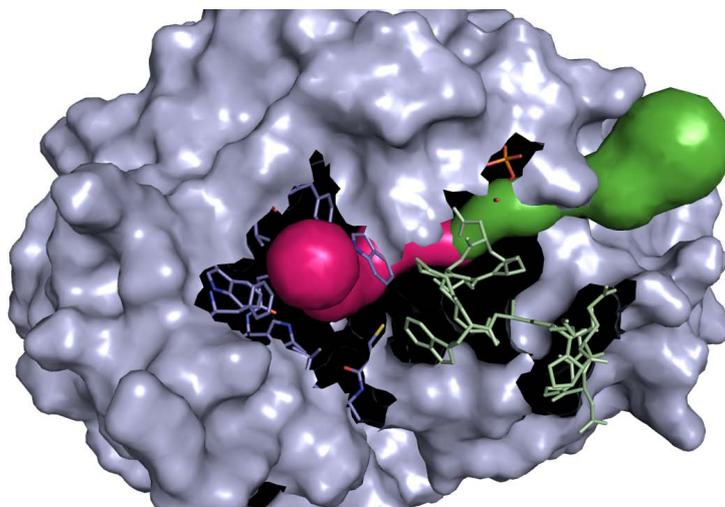
In allen vorgestellten Distanzplots gibt die blaue Referenzlinie den Wert aus der 1ads-Kristallstruktur wieder, die rote jenen aus der 1xgd-Kristallstruktur. Erwähnt werden sollte auch, dass der Startwert des Cys 298 - Trp 219  $C\alpha$ -Abstandes in diesen Plots um ca. 2,5 Å höher ist, als in der holo-Form, die als Startstruktur für die Studien hier verwendet wurde. Dies wird auf die 1 ns Equilibrierungsphase zurückgeführt. Die Schwefel-Aren-Wechselwirkung zwischen beiden Resten wird als schwach angenommen und der Abstand zwischen Cys 298 und Trp 219 nimmt im Laufe der Equilibrierung des Systems zu. Das „safety-belt“ verbleibt in seiner Gesamtheit nach wie vor in der geschlossenen Konformation.

Unterstützend zu den Distanzplots, die den Übergang zwischen holo- und apo-Form charakterisieren sollen, werden für jeden Pfad Graphen der sich ergebenden van der Waals (schwarz) und elektrostatischen (rot) Energie sowie der Gesamtenergie (blau) zwischen Cys 298-Trp 219 und Arg 293-Trp 219 gezeigt, die auf sich ausbildende oder lösende Interaktionen schließen lassen.

All diese graphischen Ergebnisse werden durch strukturelle Untersuchungen und Darstellungen des Loops (Vergleich mit 1ads und 1xgd Kristallstruktur, wobei Trp 219, Arg 293 und Cys 298 als Stabmodell abgebildet sind) im SMD-Verlauf ergänzt.

### 6.1.1 Suche eines idealen Pfades

Um einen möglichen Austrittsweg des Kofaktors  $NADP^+$  zu bestimmen, wurden zunächst mit Hilfe von CAVER 2.0 [340, 341, 342] zwei mögliche Tunnel ausgehend vom Massenschwerpunkt von  $NADP^+$  ermittelt. CAVER 2.0 berechnet den weitesten Tunnel mit minimaler Länge für die Dissoziation durch einen modifizierten Dijkstra Algorithmus. Die sich ergebenden Tunnel sind in Abb. 6.2 in pink und grün dargestellt.



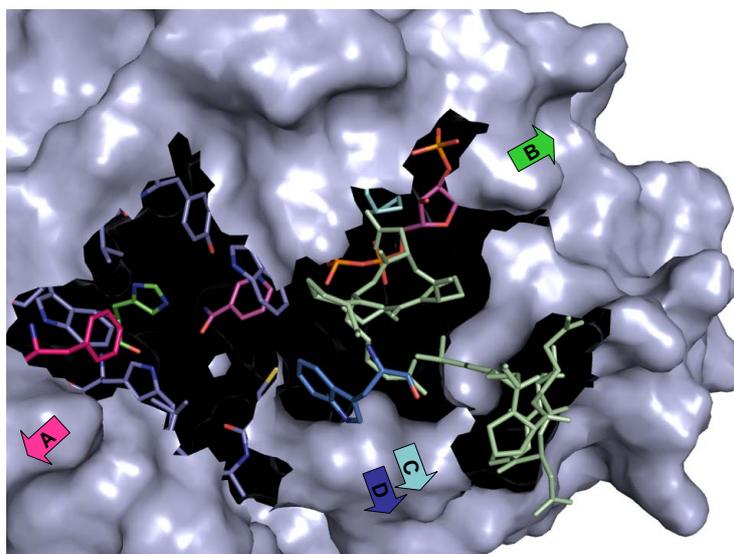
**Abbildung 6.2:** Mit CAVER 2.0 ermittelte Austrittwege des Kofaktors  $\text{NADP}^+$ , ausgehend von seinem Massenschwerpunkt.

Zwei Pfade in den folgenden SMD-Studien sind so gewählt, dass  $\text{NADP}^+$  die Tasche entlang dieser beiden Tunnels verlässt (Pfad A und B), zwei weitere wurden visuell durch Betrachten der Tasche gewählt (Pfad C und D). Diese steuern den Kofaktor direkt auf das „safety-belt“ zu. Einen Überblick über die vier gewählten Richtungen liefern Tabelle 6.1 sowie Abb. 6.3. In der zitierten Tabelle sind jene Atome aufgelistet, die für jeden gewählten Pfad zur Ermittlung des Vektors für die Kofaktorbewegung herangezogen wurden.

**Tabelle 6.1:** Überblick über die in den SMD-Simulationen gewählten Vektoren des Kofaktoraustritts; COM = Center of Mass, Massenschwerpunkt.

Pfad	$\text{C}\alpha$ -Atom von Rest	SMD Atom	Geschwindigkeit [ $\text{\AA}/\text{ps}$ ]	Kraftkonstante [ $\text{kcal}/\text{mol}/\text{\AA}^2$ ]
Pfad A	Phe 122	Kofaktor COM *	0,025	3
Pfad B	His 110	Kofaktor Purin N9	0,025	3
Pfad C	Pro 261	Kofaktor COM	0,025	7
Pfad D	Trp 219	Kofaktor COM *	0,025	3

\* für Pfad A und D wurde der resultierende Vektor invertiert



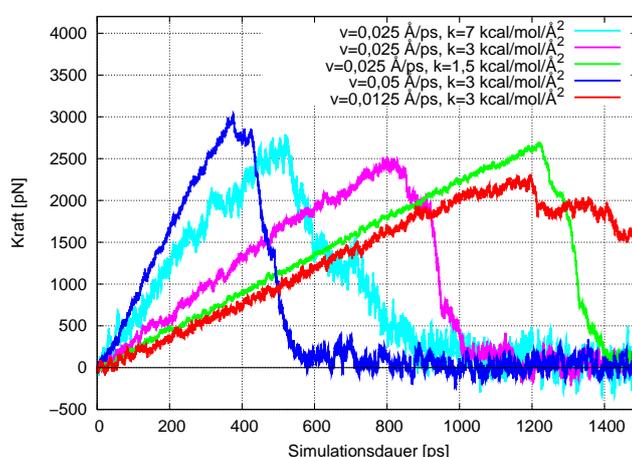
**Abbildung 6.3:** Gewählte Richtungen des Kofaktor-Austritts: "safety-belt" in grün, Bindetasche in violett, Kofaktor (COM als SMD Atom) in pink und zur Richtungsbestimmung herangezogene Aminosäuren: Phe 122 (Pfad A: pink), His 110 (Pfad B: grün), Pro 261 (Pfad C: cyan), Trp 219 (Pfad D: blau).

### 6.1.2 Abhängigkeit der Kraftprofile von Parametern $\vec{v}$ und $k$

Wie bereits erwähnt, ist die Wahl der in der SMD wählbaren Parameter, der Geschwindigkeit  $\vec{v}$  und der Kraftkonstante  $k$  keine triviale Angelegenheit. Die gewählte Geschwindigkeit  $\vec{v}$  beeinflusst die Stärke der Kofaktoradhäsion in der Bindetasche [338, 339]. Die Energiebarriere, die zum Austritt überschritten werden muss, wird bei Anwendung einer externen Kraft gesenkt. Generell gesprochen führen kleinere Ziehgeschwindigkeiten zu längeren Simulationszeiten und kleineren Kräften, die für die Dissoziation erforderlich sind. Ein besseres Sampling aufgrund längerer Simulationsdauer führt zu einem widerstandsloseren Austritt.

Für die Einstellung der gewählten Federkonstante  $k$  existiert keine *a priori* Regel [43]. Eine zu starre sowie eine zu weich eingestellte Feder beeinflussen das Ergebnis. Generell gesprochen sollte die Wahl so erfolgen, dass die Federkonstante klein genug ist, um Fluktuationen in der Kraft relativ zum Ausmaß von  $\vec{F}$  klein erscheinen zu lassen. Zugleich sollte sie aber groß genug sein, um eine Veränderung der wirkenden Kraft bei einer Fortbewegung der zu bewegenden Atomgruppe und somit Kontraktion der harmonischen Feder zu erreichen. Abb. 6.4 zeigt diesen Einfluss unterschiedlich gewählter Geschwindigkeiten und Kraftkonstanten bei der Dissoziation des Kofaktors entlang des später beschriebenen Pfades C. Eine größere Kraftkonstante führt zu einem zeitlich früher angesiedelten Austritt mit größeren Fluktuationen im Profil. Ein schnellerer Austritt wird natürlich auch bei erhöhter Geschwindigkeit erreicht. Der frühere Austritt führt dabei in beiden Fällen zu einem Anstieg des Maximums der erforderlichen Kraft.

In der hier geschilderten Studie des Kofaktoraustrittes wurde für jeden Pfad eine Serie von SMD-Simulationen mit unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten  $\vec{v}$  und Kraftkonstanten  $k$  untersucht. Nur jene mit der kleinsten Ziehgeschwindigkeit von  $\vec{v} = 0,025 \text{ \AA/ps}$  werden hier vorgestellt und analysiert, die Kraftkonstante liegt dabei bei  $k = 3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  und in einem Fall (Pfad C) bei  $k = 7 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ . Mit diesen Einstellungen resultierte der Kofaktorausritt in einer akzeptablen Zeitspanne und es zeigten sich die interessantesten Ergebnisse mit einem als vernünftig bewerteten Kraftprofil. Um Translationen und Rotationen des Proteins zu verhindern, wurde ein zusätzliches harmonisches Potential von  $1 \text{ kcal/mol}$  auf die Backbone C=O und N-H Atome der Aminosäuren der Anionen-Bindetasche bzgl. ihrer Ausgangspositionen gesetzt. Diese Reste sind Trp 20, Val 47, Tyr 48, Trp 79 und His 110.



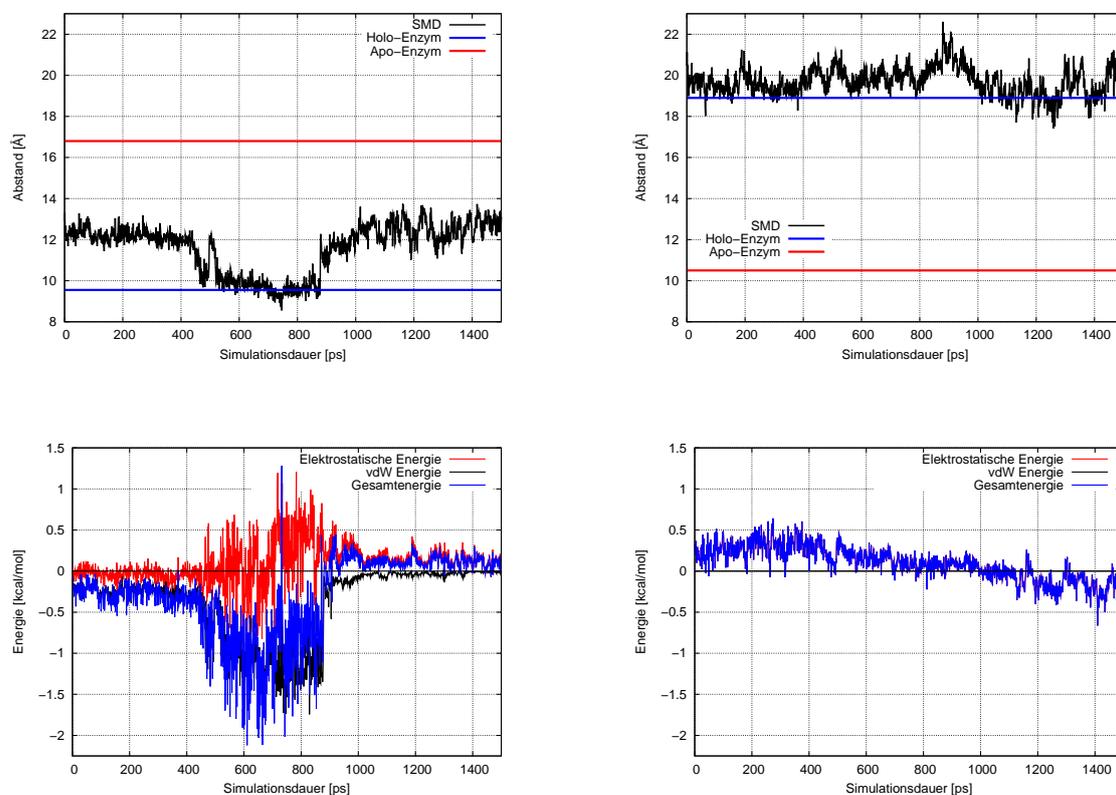
**Abbildung 6.4:** Kraftprofile in Abhängigkeit von  $\vec{v}$  und  $k$  bei einem Kofaktorausritt entlang Pfad C: Die gewählten Parameter der einzelnen Simulationen waren  $\vec{v}=0,025 \text{ \AA/ps}$ ,  $7 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  (cyan);  $\vec{v}=0,025 \text{ \AA/ps}$ ,  $3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  (pink);  $\vec{v}=0,025 \text{ \AA/ps}$ ,  $1,5 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  (grün);  $\vec{v}=0,05 \text{ \AA/ps}$ ,  $3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  (blau) und  $\vec{v}=0,0125 \text{ \AA/ps}$ ,  $3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  (rot).

## 6.2 Pfad A

In diesem Abschnitt wurde die Richtung der Kofaktorbewegung als Vektor zwischen dem  $C\alpha$ -Atom von Phe 122 und dem Massenschwerpunkt von  $\text{NADP}^+$  gemäß der Tunnelberechnung mit CAVER 2.0 und Visualisierung der Tasche gewählt (pink in Abb. 6.2 und 6.3). Eine SMD-Simulationszeit von  $1,5 \text{ ns}$  überführt den Kofaktor von seiner ursprünglichen Position in der Bindetasche ins umgebende Solvens.

In Abb. 6.5 zeigen die gemessenen Abstände zwischen den  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 bzw. Arg 293 keinerlei Annäherung von Trp 219 zu Arg 293. Folglich bleibt die

holo-Konformation während der gesamten 1,5 ns bestehen. Die einzige ersichtliche Veränderung betrifft den Abstand zwischen Cys 298 und Trp 219 zwischen 550 und 850 ps. Jedoch bewegt sich der gemessene Wert eher noch in Richtung des in der holo-Kristallstruktur 1ads beobachteten Abstandes beider  $C\alpha$ -Atome. Ab 850 ps wächst der Wert wieder an, gleichzeitig bleibt aber der Abstand zwischen den  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Arg 293 unverändert. Dies liegt in einer etwas anderen Orientierung von Trp 219 begründet, die aber keinerlei Ähnlichkeit mit jener in der apo-Struktur besitzt. Die apo-Struktur wird niemals erreicht, bleibt doch der gemessene Abstand zwischen Trp 219 und Arg 293 immer bei ca.  $20\text{\AA}$ , einem Wert, der näherungsweise bei dem in der 1ads-holo-Kristallstruktur gemessenen liegt. Abb. 6.6 verdeutlicht dies.



**Abbildung 6.5:** Abstände und Energien im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad A: *Obere Reihe:* Abstand zwischen  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts); *Untere Reihe:* Wechselwirkungsenergie (van der Waals (schwarz), elektrostatische (rot) und Gesamtenergie (blau)) zwischen Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts).

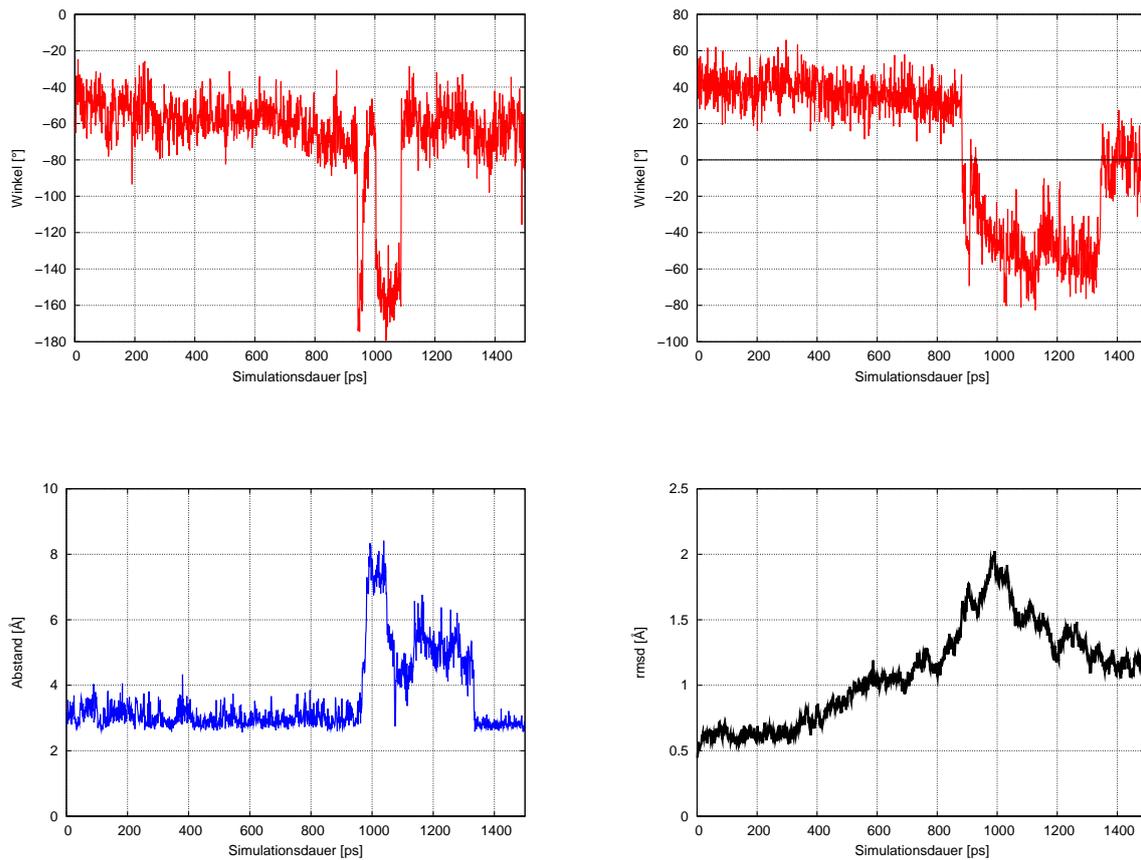
Die Graphen der Wechselwirkungsenergien zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Distanzplots. So weist jener der Cys 298-Trp 219 Interaktion tatsächlich eine günstige van

der Waals- und Gesamtenergie im Zeitraum zwischen 550 und 850 ps auf, wenn sich beide Reste näher kommen und ein Minimumsplateau von 9,5 Å erreicht wird. Der Graph der Wechselwirkungsenergien zwischen Trp 219 und Arg 293 zeigt demgegenüber keinerlei günstige Werte. Nur am Ende der Simulation, nach etwa 1000 ps ist eine leicht begünstigte Interaktion erkennbar, die in der erwähnten veränderten Orientierung von Trp 219 begründet liegt, welche zwischen jenen aus der holo und apo Struktur liegt (siehe Abb. 6.6).

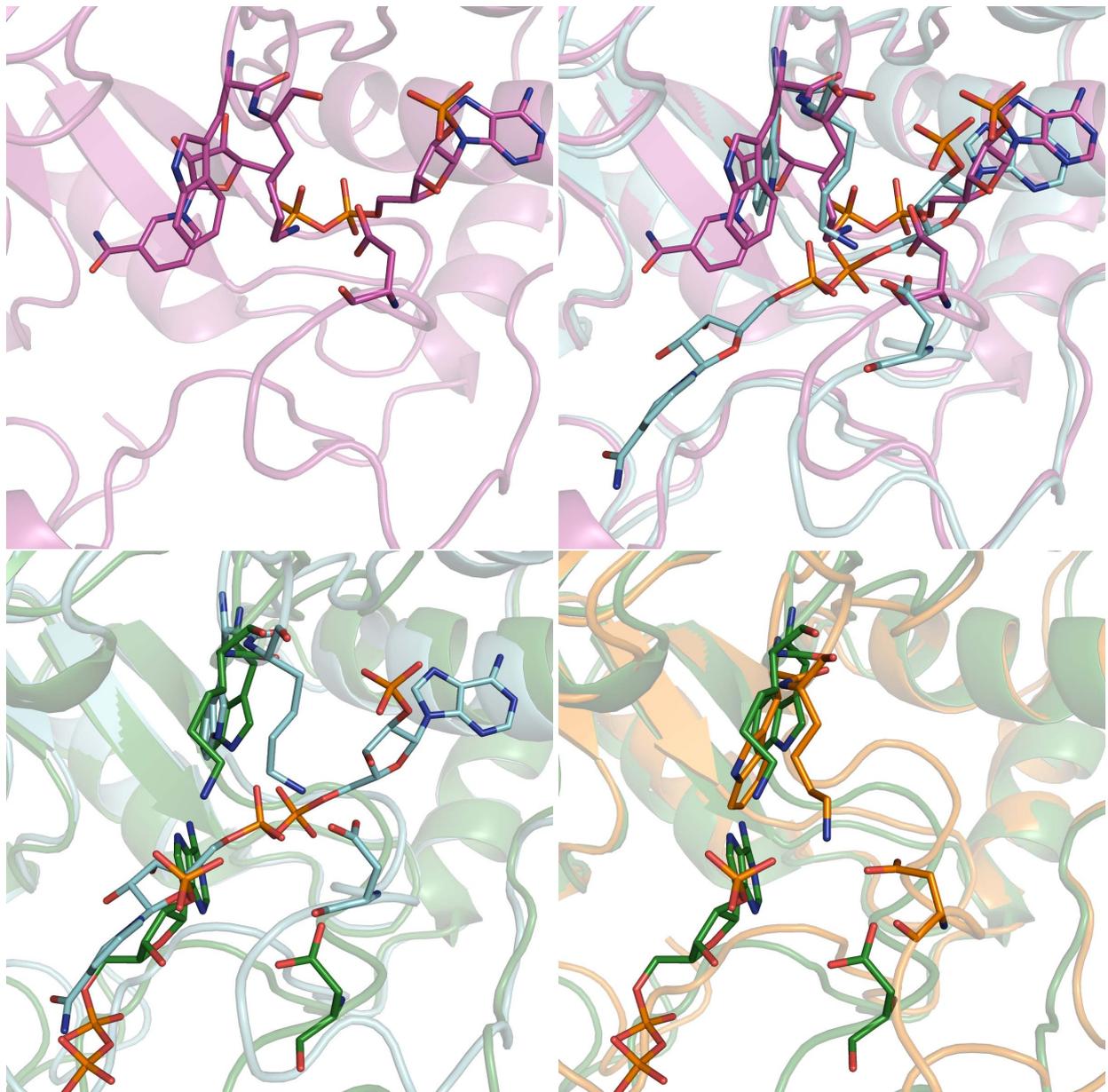


**Abbildung 6.6:** Bewegung des „safety-belts“ bzgl. Cys 298 und Arg 293 während der SMD-Simulation nach Pfad A: 1ads (hellgrün), 1xgd (dunkelblau), 600 ps (pink), 900 ps (orange) und 1400 ps (cyan).

Eine entscheidende Veränderung beim Austritt des Kofaktors betrifft Lys 21, welches in der ursprünglichen Kristallstruktur 1ads eine H-Brücke sowohl zu einem Phosphatsauerstoff des Kofaktors als auch zu einem Carboxylatsauerstoff von Asp 216 ausbildet. Nach etwa 880 ps Simulationszeit ändert Lys 21 seinen  $\chi_1$ -Winkel, was von einer Änderung des  $\chi_2$ -Winkels am Trp 20 begleitet wird. Durch die Änderung der Orientierung an Lys 21 ist der Austritt des Kofaktors erst möglich. Die H-Brücke wird gebrochen, was sich in einem rasanten Anstieg des Abstandes zwischen dem N $\epsilon$ -Atom von Lys 21 und dem Carboxylat-O von Asp 216 zeigt. Der Kofaktor verlässt in der Folge die Bindetasche. Sobald Lys 21 seinen ursprünglichen  $\chi_1$ -Winkel zurückgewinnt, wird erneut eine H-Brücke mit Asp 216 eingegangen, wodurch eine weitere Bewegung des „safety-belts“ verhindert wird. Abb. 6.7 veranschaulicht in Kombination mit Abb. 6.8 diese Beobachtungen.

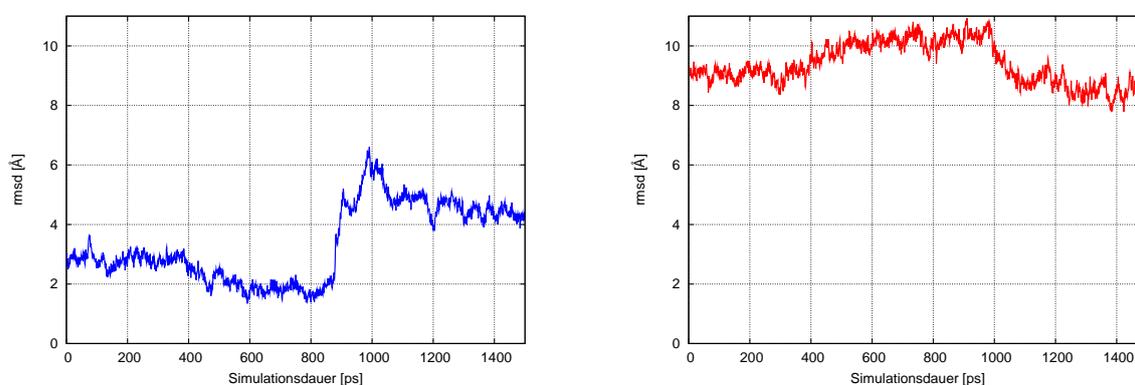


**Abbildung 6.7:** Charakteristika der SMD-Simulation nach Pfad A als Funktion der Zeit: *Links oben:*  $\chi_1$ -Winkel von Lys 21; *Rechts oben:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20; *Links unten:* Abstand zwischen Lys 21 Nε und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts unten:* Cα-RMSD-Werte für das gesamte Protein relativ zu 1ads.



**Abbildung 6.8:** Sequenz verschiedener Snapshots aus der SMD-Simulation nach Pfad A zur Erklärung des Kofaktoraustritts, mit Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP<sup>+</sup> als Stabmodell: *Links oben:* nach 875 ps: Lys 21, Trp 20 und Asp 216 vor dem Kofaktoraustritt; *Rechts oben:* nach 885 ps: Trp 20 und Lys 21 ändern ihre Seitenkettenorientierung, der Kofaktoraustritt wird ermöglicht; *Links unten:* nach 1025 ps: Der Bruch der H-Brücke zwischen Lys 21 und Asp 216 ermöglicht den weiteren Austritt; *Rechts unten:* nach dem Austritt des Kofaktors wird die H-Brücke wieder rückgebildet (1500 ps).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Lys 21 und Trp 20 ihre Seitenkettenorientierung ändern und dem Kofaktor damit den Austritt ermöglichen. Allerdings bleibt der Bereich von Ser 214-Ser 226 von den strukturellen Veränderungen nahezu unberührt. Der Graph der  $C\alpha$ -RMSD-Werte der Aminosäuren im „safety-belt“ (Abb. 6.9) zeigt daher auch einen konstant hoch bleibenden Wert relativ zur apo-1xgd-Struktur (rechts). Die entsprechenden  $C\alpha$ -RMSD-Werte relativ zu holo-1ads-Struktur sind viel kleiner (links) und zeigen dann einen Anstieg, wenn die strukturellen Veränderungen rund um Lys 21 passieren sowie der Kofaktoraustritt beginnt. Auch im  $C\alpha$ -RMSD Plot über das gesamte Protein in Abb. 6.7 ist dieser Anstieg erkennbar.

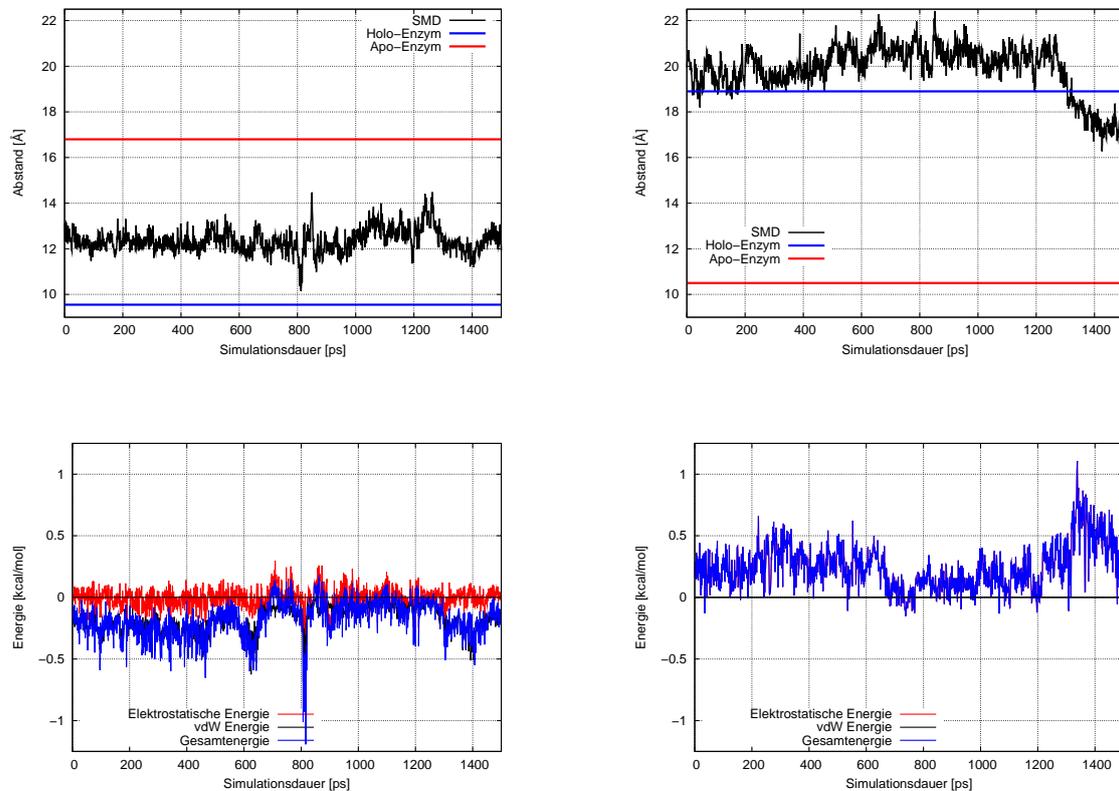


**Abbildung 6.9:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte des „safety-belts“ im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad A: *Links*: relativ zu 1ads; *Rechts*: relativ zu 1xgd.

## 6.3 Pfad B

Aus der Berechnung eines möglichen Austrittsweges des Kofaktors aus der ALR2-Bindetasche mit Hilfe von CAVER 2.0 resultiert auch ein zweiter hypothetischer Tunnel (grün in Abb. 6.2 und Abb. 6.3). Um diesem Vorschlag Folge zu leisten, wurde in diesem SMD-Versuch ein Vektor ermittelt, der das  $C\alpha$ -Atom von His 110 mit dem Purin-N9-Atom des Kofaktors verknüpft. Analog zu den Analysen bzgl. Pfad A wurden auch hier die  $C\alpha$ -Atom Distanzen und Interaktionsenergien im Verlauf der 1,5 ns SMD-Simulation verfolgt. Diese Analysen resultierten aber in keinerlei entscheidenden Veränderungen. Der Cys 298-Trp 219 Abstand bleibt bis auf ein plötzliches Absinken mit darauffolgendem Anstieg bei ca. 800 ps immer in ungefähr demselben Bereich von 12 Å, was mit jenem der holo-Struktur übereinstimmt. Diese Beobachtung korrespondiert mit der Ausbildung eines intermediär stabilisierten Zustandes kurz nach 800 ps (Abb. 6.10).

## 6 SMD-Simulationen: Übergang der Holo- in die Apo-Form der Aldose Reduktase



**Abbildung 6.10:** Abstände und Energien im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad B: *Obere Reihe:* Abstand zwischen  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts); *Untere Reihe:* Wechselwirkungsenergie (van der Waals (schwarz), elektrostatische (rot) und Gesamtenergie (blau)) zwischen Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts).

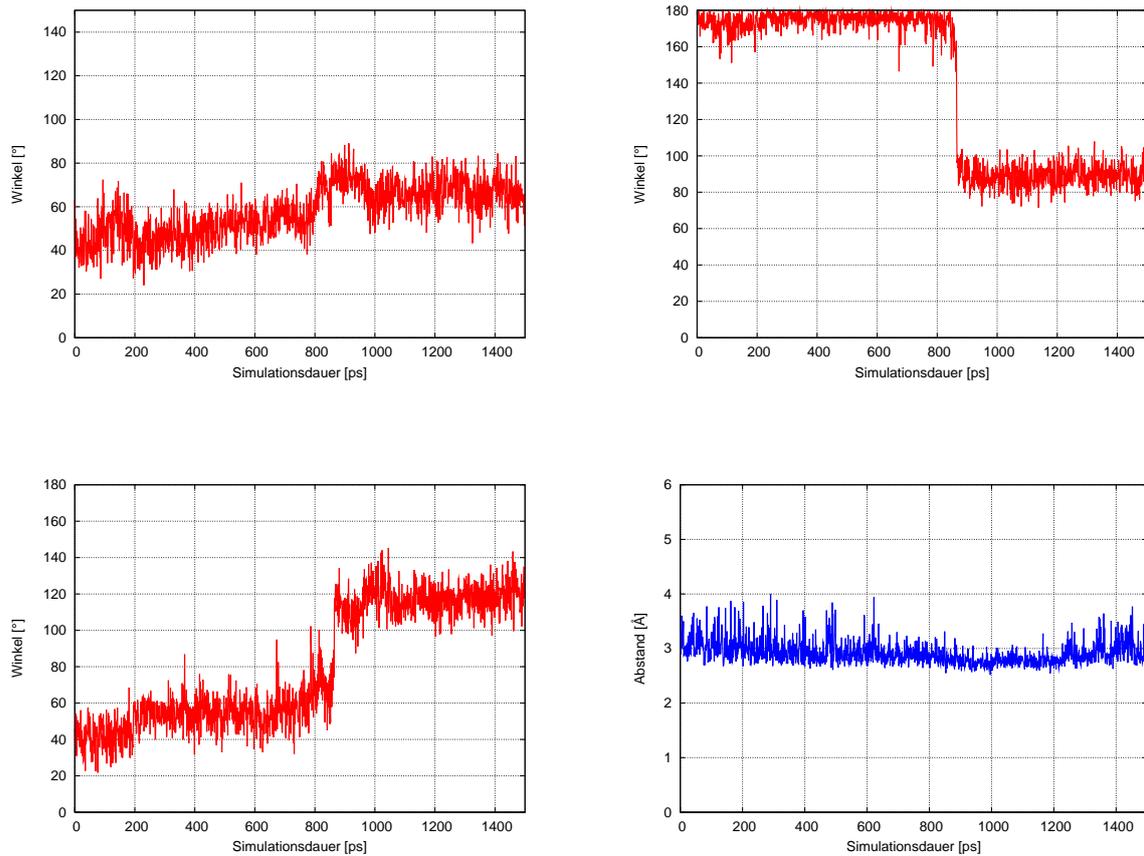
Die Darstellungen diverser Snapshots aus der SMD-Simulation in Abb. 6.11 illustrieren auch diesen Zustand (Snapshot nach 809 ps). Weitere Snapshots nach 850 und 1400 ps spiegeln das Distanz- und Energieverhalten wider, indem sie eine Annäherung der Indoleinheit von Trp 219 nach 1250 ps in Richtung Arg 293 unterstreichen.



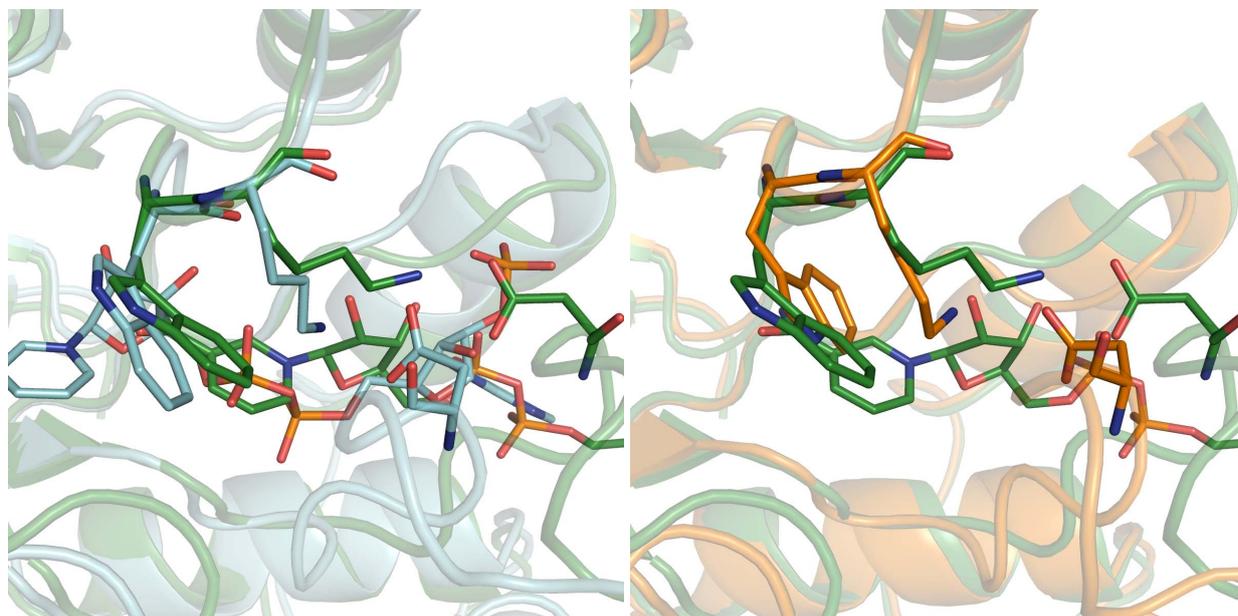
**Abbildung 6.11:** Bewegung des „safety-belts“ bzgl. Cys 298 und Arg 293 während der SMD-Simulation nach Pfad B: 1ads (hellgrün), 1xgd (dunkelblau), 809 ps (pink), 850 ps (orange) und 1400 ps (cyan).

Im Laufe dieser SMD-Simulation ändert Trp 20 seine Seitenkettenorientierung, was sich in der Auftragung seines  $\chi_1$ - und  $\chi_2$ -Winkels (siehe Abb. 6.12) zwischen 800 und 900 ps Simulationsdauer zeigt. Der  $\chi_1$ -Winkel von Lys 21 bleibt dagegen unverändert.

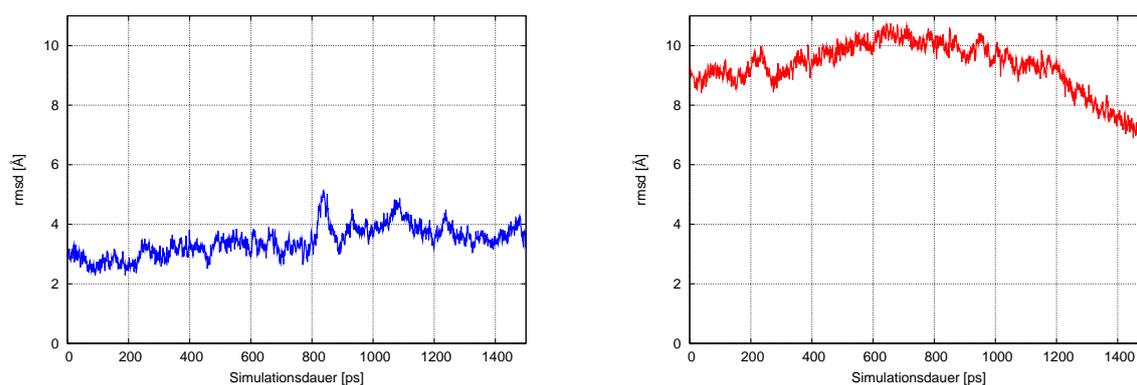
Abb. 6.13 zeigt eine Abfolge verschiedener Snapshots aus der SMD-Simulation und das Verhalten der beiden Aminosäuren im Laufe der SMD. Dabei ist erkennbar, dass der Kofaktor die Bindetasche ohne große Einflüsse auf das „safety-belt“ verlässt. In der Darstellung nach 840 ps (grün) zeigt sich zwar, dass der Loop von Aminosäure 214 bis 226 der Bewegung des Kofaktors etwas nachgeht, nach 1000 ps (orange) driftet er aber wieder in Richtung der Ausgangsposition zurück. Einen Einfluss auf die ausgebildete H-Brücke zwischen dem Ne von Lys 21 und dem Carboxylat-O von Asp 216 hat der Kofaktorausritt nicht, sie bleibt durch kongruente Bewegungen von Lys 21 relativ zum „safety-belt“ immer bestehen, was sich in der Abstandsmessung zwischen beiden Atomen bestätigt. Interessanterweise sind Veränderungen in der „safety-belt“Region um 840 ps auch im  $C\alpha$ -RMSD Plot in Abb. 6.14 relativ zu 1ads durch einen Peak erkennbar. Zudem stimmt dieses Maximum mit einer Zunahme des  $C\alpha$ -Atomabstandes zwischen Trp 219 und Cys 298 in Abb. 6.10 überein. Nach dem Austausch des Kofaktors bleibt Trp 20 mit veränderter Seitenkettenorientierung bestehen.



**Abbildung 6.12:** Charakteristika der SMD-Simulation nach Pfad B als Funktion der Zeit: *Links oben:*  $\chi_1$ -Winkel von Lys 21; *Rechts oben:*  $\chi_1$ -Winkel von Trp 20; *Links unten:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20; *Rechts unten:* Abstand zwischen Lys 21 N $\epsilon$  und Carboxylat-O von Asp 216.



**Abbildung 6.13:** Sequenz verschiedener Snapshots aus der SMD-Simulation nach Pfad B zur Erklärung des Kofaktoraustritts, mit Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP<sup>+</sup> als Stabmodell: *Links:* Eine Veränderung des  $\chi_1$ - und  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 nach 850 ps (grün) ermöglicht den Kofaktoraustritt begleitet von Bewegungen im „safety-belt“ Bereich, hier im Vergleich mit einer dem Austritt vorgeschalteten Struktur nach 250 ps (cyan); *Rechts:* Weitere Veränderung der  $\chi$ -Winkel von Trp 20 und Rückbewegung des „safety-belts“ nach 1000 ps (orange).

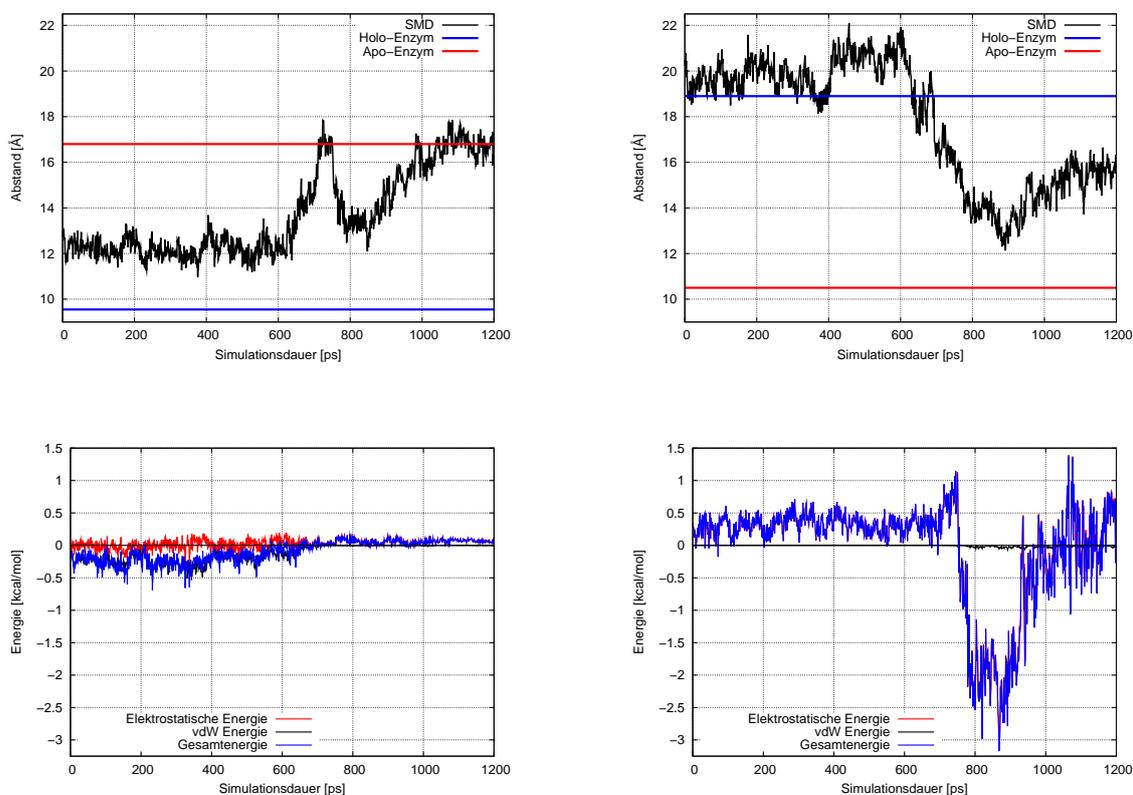


**Abbildung 6.14:**  $\alpha$ -RMSD-Werte des „safety-belts“ im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad B: *Links:* relativ zu 1ads; *Rechts:* relativ zu 1xgd.

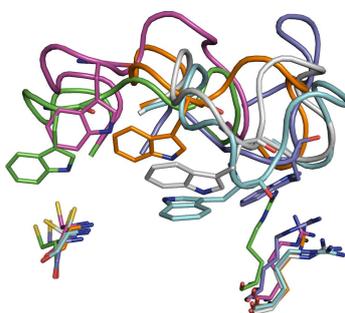
## 6.4 Pfad C

Neben den mittels CAVER 2.0 ermittelten Austrittswegen wurde die Bindetasche auch visuell inspiziert und ein möglicher Tunnel für die Kofaktorbewegung ins Solvens auf diese Weise bestimmt. In dem hier beschriebenen Fall wurde zur Festlegung der Kofaktorbewegung aus der Tasche ein das C $\alpha$ -Atom von Pro 261 mit dem Massenschwerpunkt von NADP<sup>+</sup> verbindender Vektor gewählt und damit versucht, den Kofaktor direkt in Richtung des „safety-belts“ zu bewegen. In Abb. 6.3 ist Pro 261 in cyan dargestellt. Wie bereits beschrieben, wurde für diesen Pfad eine Federkonstante von 7 kcal/mol/Å<sup>2</sup> angewandt, was zu einem schnelleren Kofaktorausritt und gleichzeitig zu vielversprechenden Resultaten im Vergleich mit den bisher beschriebenen Pfaden führte, die mit k=3 kcal/mol/Å<sup>2</sup> durchgeführt wurden. Wie in den vorangegangenen Unterkapiteln wurde auch hier der Kofaktorausritt anhand des Distanz- und Wechselwirkungsverhaltens der C $\alpha$ -Atome von Trp 219, Cys 298 und Arg 293 zueinander beleuchtet. In den ersten 600 ps der SMD-Simulation sind keine einschneidenden Veränderungen beobachtbar (siehe Abb. 6.15). In den darauffolgenden 150 ps steigt der Cys 298-Trp 219 Abstand steil an, kehrt kurz darauf aber wieder in die Nähe des ursprünglichen Wertes wieder zurück, um nach 800 ps erneut auf ca. 17 Å anzusteigen. Sobald der Kofaktor die Bindetasche vollständig verlassen hat, wird somit ein Abstand erreicht wie er in der apo-Kristallstruktur vorfindbar ist. Wird der C $\alpha$ -Abstand zwischen Arg 293 und Trp 219 betrachtet, ist ein kontinuierlicher Abfall nach 600 ps hin zu dem Wert der 1xgd-Kristallstruktur beobachtbar. Nach einem minimalen Abstand von ca. 12 Å bei 900 ps steigt der Abstand wieder geringfügig an.

All diese Entwicklungen im Laufe der SMD-Simulation werden durch die Energieauftragungen bestätigt. Nach 600 ps zeigt sich eine Destabilisierung in der Cys 298-Trp 219 Wechselwirkung. Zusätzlich zeigen auch die Arg 293-Trp 219 Interaktionsenergien ein Minimum und damit eine Stabilisierung zwischen 800 und 1000 ps, sobald die entsprechende Distanz ebenfalls ein Minimum findet. Eine Illustration des „safety-belts“ im Verlauf der SMD-Simulation ist in Abb. 6.16 in Cartoon-Darstellung mit den interessierenden Aminosäuren 219, 293 und 298 als Stabmodell abgebildet.

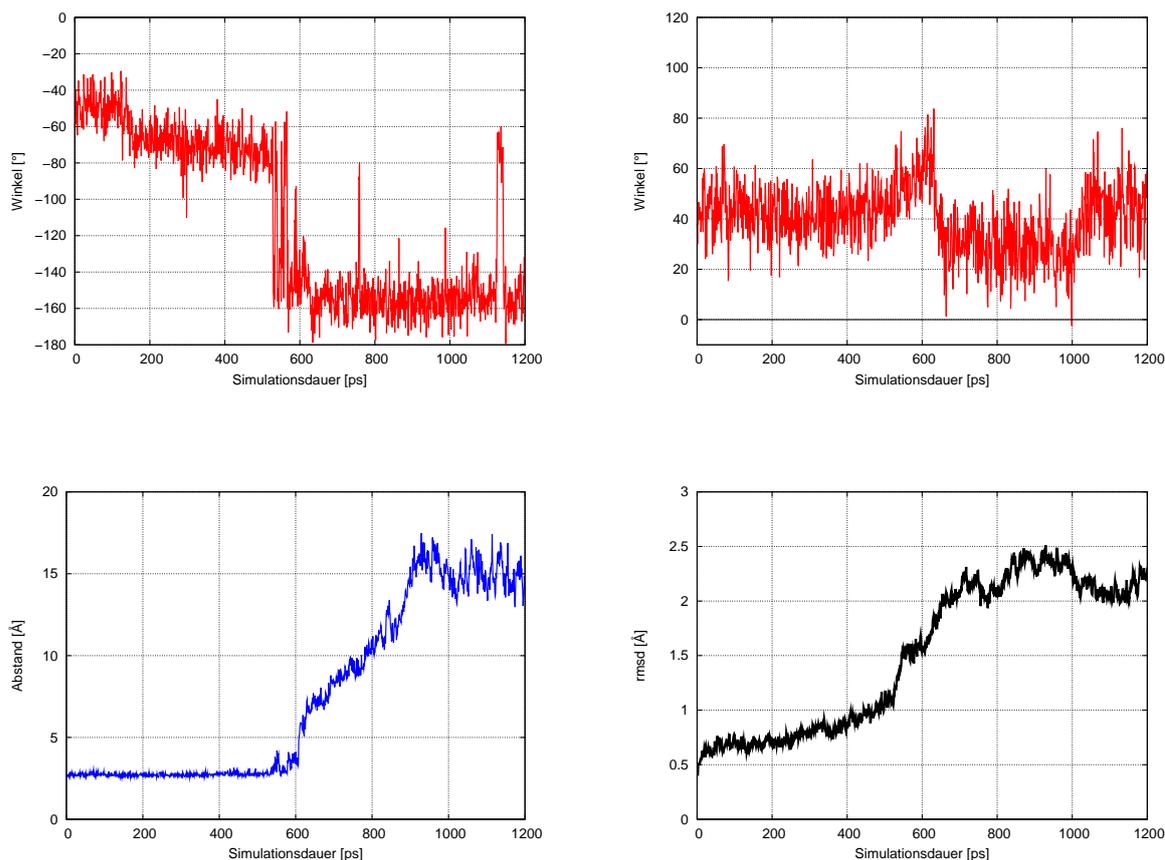


**Abbildung 6.15:** Abstände und Energien im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad C: *Obere Reihe:* Abstand zwischen  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts); *Untere Reihe:* Wechselwirkungsenergie (van der Waals (schwarz), elektrostatische (rot) und Gesamtenergie (blau)) zwischen Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts).

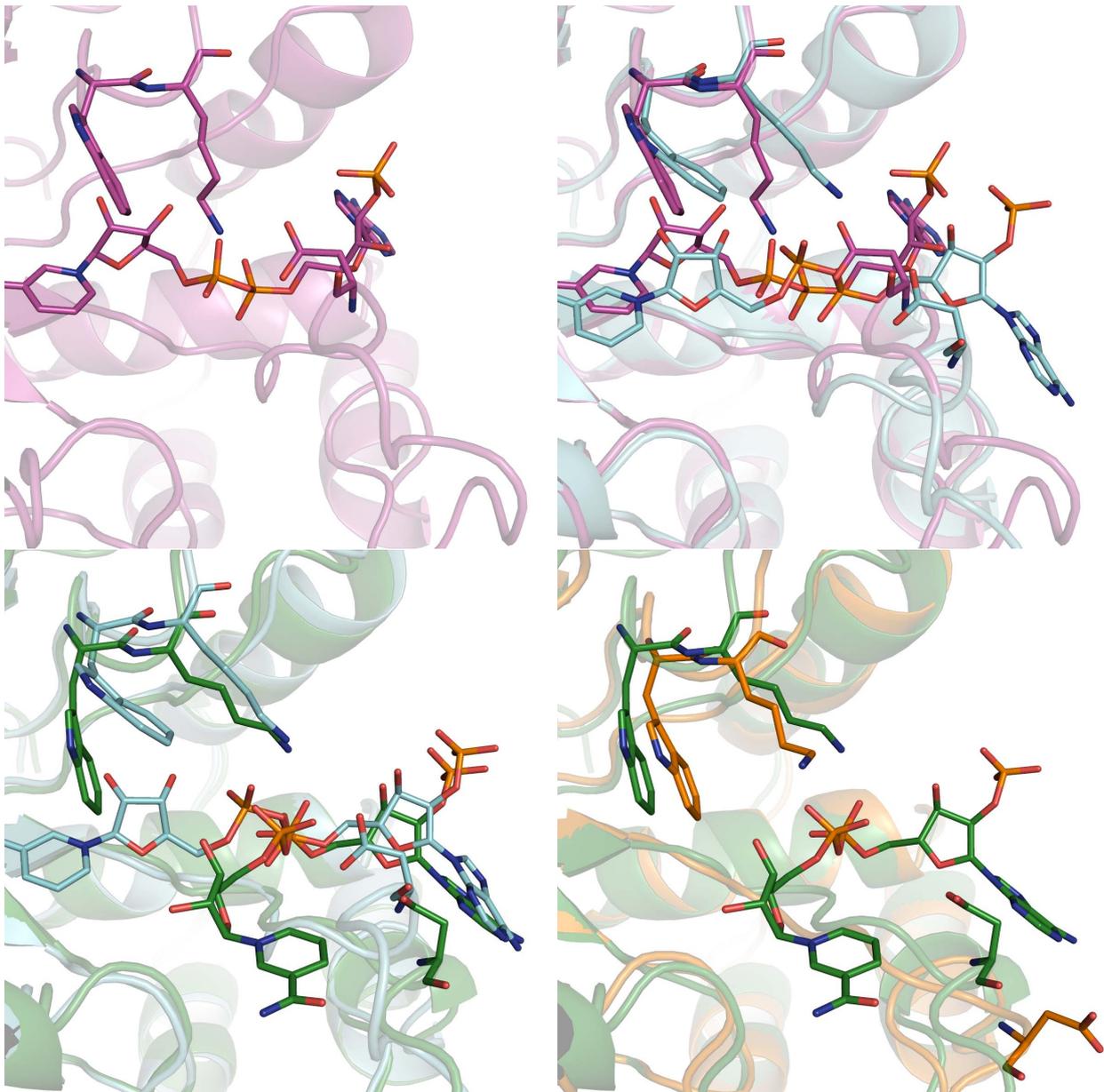


**Abbildung 6.16:** Bewegung des „safety-belts“ bzgl. Cys 298 und Arg 293 während der SMD-Simulation nach Pfad C: 1ads (hellgrün), 1xgd (dunkelblau), 500 ps (pink), 650 ps (orange), 900 ps (cyan) und 1200 ps (grau).

Der Austritt des Kofaktors  $\text{NADP}^+$  spielt sich bei einer Bewegung in Richtung des für diesen Pfad C ermittelten Vektors folgendermaßen ab: Lys 21 ändert nach ungefähr 600 ps seinen  $\chi_1$ -Winkel, dem auch Trp 20 mit einer gleichzeitigen, verhältnismäßig aber kleineren Änderung am  $\chi_2$ -Winkel nachkommt. Abb. 6.17 zeigt die Änderungen der Winkel, die in Abb. 6.18 rechts oben eindeutig erkennbar sind.



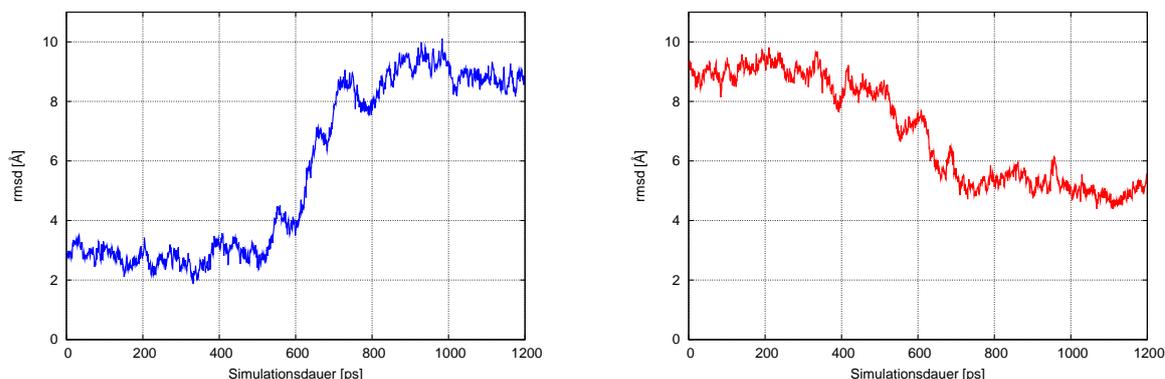
**Abbildung 6.17:** Charakteristika der SMD-Simulation nach Pfad C als Funktion der Zeit: *Links oben:*  $\chi_1$ -Winkel von Lys 21; *Rechts oben:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 20; *Links unten:* Abstand zwischen Lys 21 N $\epsilon$  und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts unten:* C $\alpha$ -RMSD-Werte für das gesamte Protein relativ zu 1ads.



**Abbildung 6.18:** Sequenz verschiedener Snapshots aus der SMD-Simulation nach Pfad C zur Erklärung des Kofaktoraustritts, mit Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP<sup>+</sup> als Stabmodell: *Links oben:* nach 540 ps: Lys 21, Trp 20 und Asp 216 vor dem Kofaktoraustritt; *Rechts oben:* nach 612 ps: Trp 20 und Lys 21 ändern ihre Seitenkettenorientierung, der Kofaktoraustritt wird ermöglicht; *Links unten:* nach 659 ps: Trp 20 rotiert zurück und der Kofaktor drückt auf seinem Weg das safety-belt vor sich hin; *Rechts unten:* nach dem Austritt des Kofaktors bleibt das „safety-belt“ in der Position (1200 ps).

Die Darstellung nach 612 ps (cyan) gibt eindeutig Aufschluss darüber, wie sich diese beiden Aminosäuren bewegen, um dem Kofaktor den Weg ins Solvens frei zu geben. In-

interessant ist dabei die Rotation von Trp 20 um seinen  $\chi_2$ -Winkel, der an die Öffnung der Untertasche aus der in Kapitel 5.4 beschriebenen Subtasche in der 2nvd Kristallstruktur erinnert. Der Kofaktor drückt auf seinem Weg das „safety-belt“ nach 600 ps nach außen, was die beschriebenen Änderungen in den  $C\alpha$ -Abständen ab diesem Zeitpunkt erklärt. In der Folge bricht auch die H-Brücke zwischen Lys 21 und Asp 216, die sich auch im weiteren Simulationsverlauf nicht mehr ausbilden kann. Sobald sich der Kofaktor an Trp 20 vorbeibewegt hat, rotiert dieses zurück in seine ursprüngliche Position und sogar noch etwas darüber hinaus. Der „safety-belt“-Bereich bleibt in der neu induzierten Orientierung, stimmt allerdings nicht mit der aus der 1xgd-Struktur überein (siehe graue Struktur in Abb. 6.16). Die Näherung hin zu einer apo-ähnlichen Struktur ist aber erkennbar, was auch durch den Verlauf der  $C\alpha$ -RMSD-Werte relativ zu 1ads und 1xgd in Abb. 6.19 verdeutlicht wird. Die RMSD-Werte relativ zu der 1ads holo-Struktur steigen beständig und jene relativ zu der 1xgd apo-Struktur sinken.

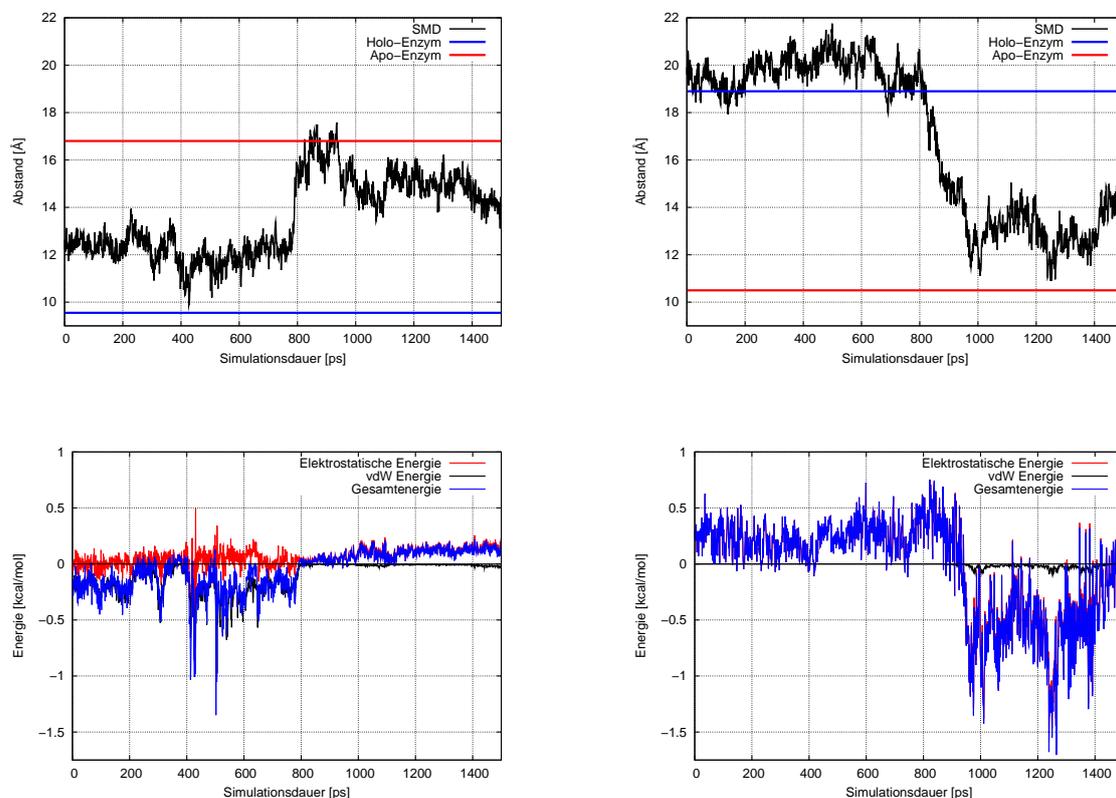


**Abbildung 6.19:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte des „safety-belts“ im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad C: *Links:* relativ zu 1ads; *Rechts:* relativ zu 1xgd.

## 6.5 Pfad D

Da in dem vorhergehenden Unterkapitel bei einem Ziehen des Kofaktors direkt in Richtung des „safety-belts“ zumindest ansatzweise eine Bewegung des Loops und eine damit in Zusammenhang stehende Annäherung von Trp 219 an Arg 293, wie für einen holo-apo Übergang erwartet, beobachtbar war, wurde in einem weiteren Ansatz ein erneutes Ziehen von NADP<sup>+</sup> direkt auf den interessanten Rest Trp 219 hin versucht. Dabei wurde die Kraftkonstante erneut auf  $3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  reduziert und die Richtung der Kofaktorbewegung als Vektor zwischen dem  $C\alpha$ -Atom von Trp 219 und dem Massenschwerpunkt des Kofaktors bestimmt. Der Vektor wurde dabei natürlich invertiert, um eine Bewegung hin zum Ser 214-Ser 226 Loop zu ermöglichen und strukturelle Veränderungen in ihm zu induzieren. In

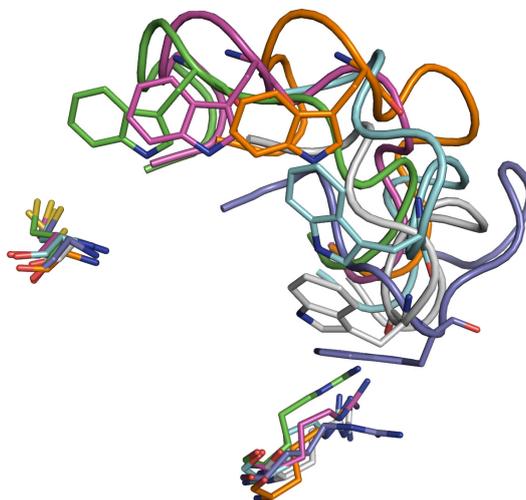
Abb. 6.3 ist die gewählte Richtung blau koloriert.



**Abbildung 6.20:** Abstände und Energien im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad D: *Obere Reihe:* Abstand zwischen  $C\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts); *Untere Reihe:* Wechselwirkungsenergie (van der Waals (schwarz), elektrostatische (rot) und Gesamtenergie (blau)) zwischen Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts).

In diesem vierten Ansatz ergibt sich bei Betrachtung der Trp 219 - Cys 298/Arg 293 Distanzplots (siehe Abb. 6.20) ein sehr interessantes Verhalten: Nach ca. 800 ps steigt der Cys 298-Trp 219 Abstand an und gleichzeitig fällt jener zwischen Arg 293 und Trp 219. Diese Beobachtung wird dem Kofaktorausritt zugeschrieben und beschreibt insgesamt den Übergang der Aldose Reduktase von dem holo- in den apo-Zustand. Werden Snapshots aus der SMD-Simulation extrahiert, so bestätigt sich tatsächlich ein kontinuierliches Fortschreiten der Loopbewegung (Abb. 6.21), welches sehr gut ein Öffnen der „safety-belt“-Region zwischen Ser 214 und Ser 226 reproduziert, sobald der Kofaktor die Bindetasche verlässt. Diese visuelle Beobachtung wird von den Graphen der Interaktionsenergien in Abb. 6.20 unterstützt. Sobald ab 600 ps der Abstand zwischen den  $C\alpha$ -Atomen von Cys 298 und Trp 219 steigt, verschwindet der stabilisierende Energiebeitrag zwischen den beiden zugehörigen

gen Resten, während der Arg 293-Trp 219 Energieplot nach ca. 900 ps stabilisierende Werte zeigt, die von der Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen diesen beiden Aminosäuren stammen.



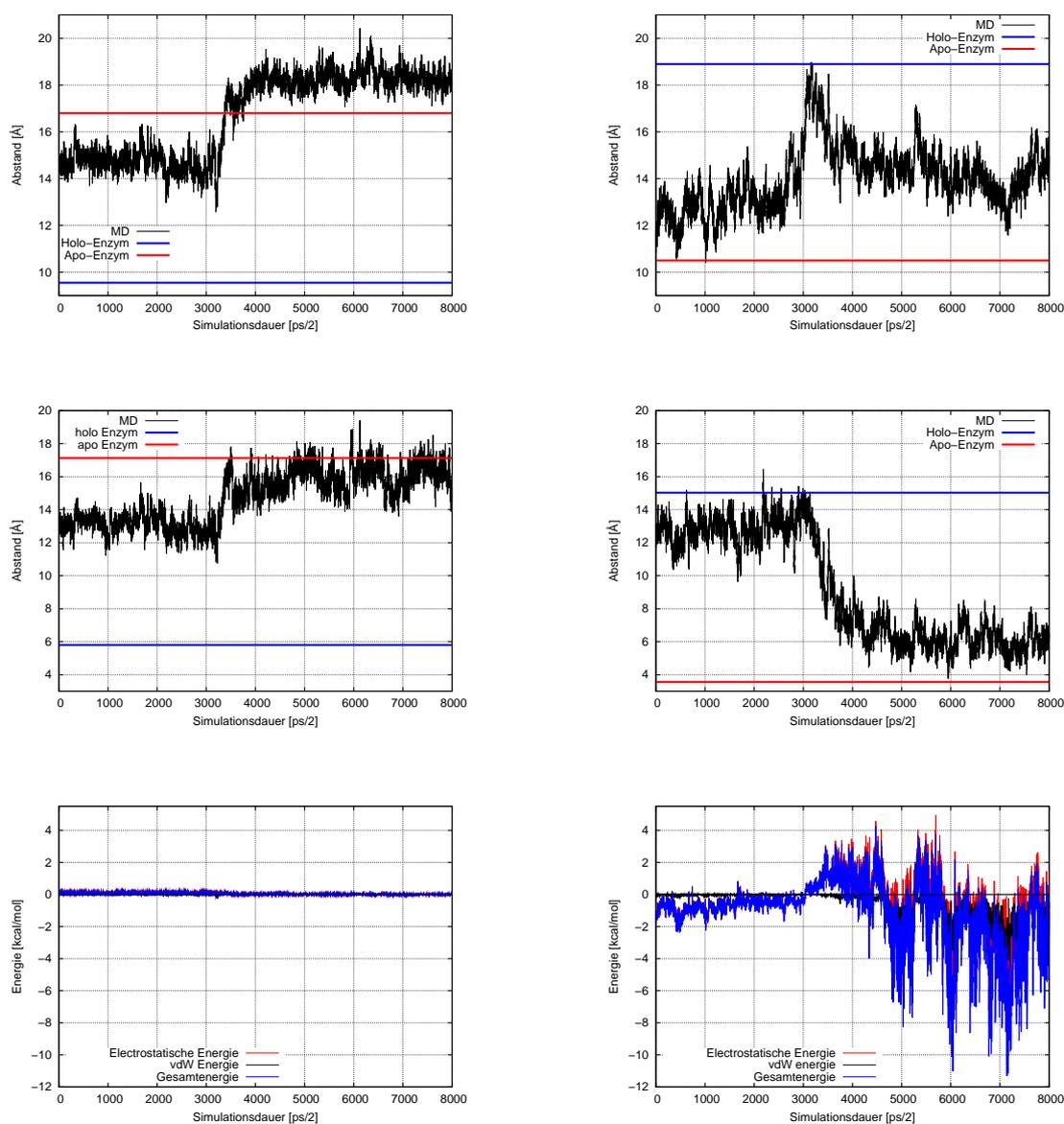
**Abbildung 6.21:** Bewegung des „safety-belts“ bzgl. Cys 298 und Arg 293 während der SMD-Simulation nach Pfad D: 1ads (hellgrün), 1xgd (dunkelblau), 650 ps (pink), 800 ps (orange), 900 ps (cyan) und 1254 ps (grau).

Das erkennbare Minimum im Arg 293-Trp 219 Abstand wird nach 1254 ps SMD-Simulation erreicht und liegt bei 10,90 Å. Dieser Wert ist damit nur 0,40 Å größer als der experimentell beobachtbare. Außerdem ist für die Struktur zu diesem Zeitpunkt die Interaktionsenergie zwischen beiden Resten deutlich günstig. Aus diesem Grund wird der Snapshot nach 1254 ps als Startstruktur für eine nachfolgende 4 ns klassische MD-Simulation herangezogen. Da SMD-Simulationen aufgrund der Einwirkung externer Kräfte als Nicht-Gleichgewichtsprozesse angesehen werden müssen, sollte während dieser Zeit dem System eine Relaxation in ein Gleichgewicht ermöglicht werden. Diese MD-Simulation wird im nächsten Unterkapitel beschrieben.

### 6.5.1 MD-Simulation nach Pfad D

Nachdem der Kofaktor die Bindetasche entlang Pfad D verlassen hat, wurde untersucht, ob für den „safety-belt“-Bereich während der darauffolgenden, klassischen MD-Simulation von 4 ns eine weitere Annäherung an die offene apo-Konformation beobachtet werden kann. Tatsächlich zeigt sich in den Abstandsauftragungen (siehe Abb. 6.22) eine weitere Abnahme des Abstands. Somit erfolgte eine Vervollständigung des durch die SMD-Simulation initiierten Überganges zwischen holo- und apo-Form der Aldose Reduktase.

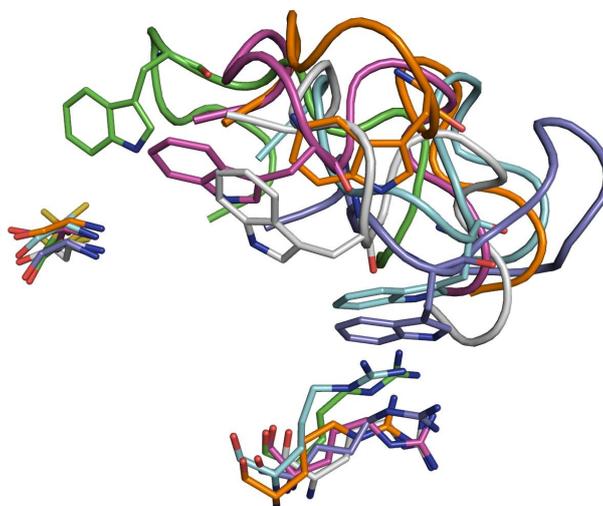
Die Distanzplots in Abb. 6.22, welche den Abstand der C $\alpha$ -Atome illustrieren, zeigen für den Cys 298-Trp219 Fall eine erwartete Zunahme, während der Arg 293-Trp 219 Abstand



**Abbildung 6.22:** Abstände und Energien im Verlauf der der SMD-Simulation nach Pfad D nachgeschalteten klassischen MD-Simulation: *Obere Reihe:* Abstand zwischen C $\alpha$ -Atomen von Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts); *Mittlere Reihe:* Abstand zwischen Indol-N-Atom von Trp 219 und S-Atom von Cys 298 (links) sowie zwischen Indol-N-Atom von Trp 219 und Guanidinium-C-Atom von Arg 293 (rechts); *Untere Reihe:* Wechselwirkungsenergie (van der Waals (schwarz), elektrostatische (rot) und Gesamtenergie (blau)) zwischen Trp 219 und Cys 298 (links) sowie zwischen Trp 219 und Arg 293 (rechts).

zwischen dem Wert der holo- und apo-Struktur liegt. Zusätzlich sind hier nun aber auch die aussagekräftigeren Abstände zwischen dem Indol-Stickstoffatom von Trp 219 und dem Schwefelatom von Cys 298 sowie zwischen dem Indol-Stickstoffatom von Trp 219 und dem Guanidinium-Kohlenstoffatom von Arg 293 vermessen worden. Für erstgenannten Abstand lässt sich in der geschlossenen 1ads-Kristallstruktur ein Wert von 5,80 Å und in der offenen 1xgd-Kristallstruktur ein Wert von 17,30 Å abmessen, bei zweitgenanntem ergeben sich jeweils Werte von 15,03 Å und 3,57 Å. Für diese Abstände zeigt sich nun ganz klar ein Anwachsen des Cys 298-Trp 219 Abstandes bis zu einem Wert nahe dem der 1xgd-Kristallstruktur bei etwa 2 ns Simulationsdauer. Bis zum Ende der 4 ns bleibt der Abstand stabil. Das Betrachten der Energiewerte bestätigt dies. Bei dem Übergang von der holo- in die apo-Struktur wird in Folge der Bewegung des „safety-belts“ die erwartete Wechselwirkung zwischen Arg 293 und Trp 219 ausgebildet, was sich in negativen Energiewerten ab dem Zeitpunkt von 2 ns ausdrückt.

Die Abbildung des Loopbereiches zwischen Ser 214 und Ser 226 veranschaulicht die Vervollendung des Übergangs zwischen beiden Zuständen im Laufe der MD (siehe Abb. 6.23). Die Struktur nach 3548 ps zeigt eine Orientierung, welche der aus der apo-Enzymform sehr nahe kommt.



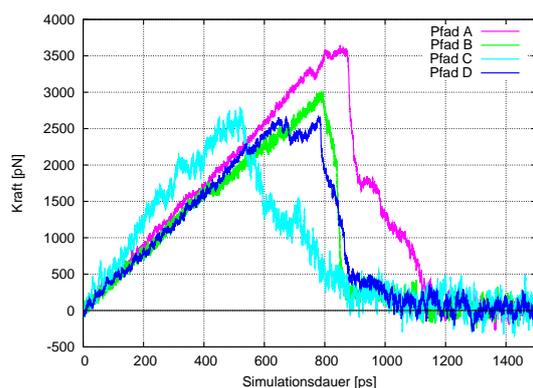
**Abbildung 6.23:** Bewegung des „safety-belts“ bzgl. Cys 298 und Arg 293 während der SMD-Simulation nach Pfad D nachgeschalteten klassischen MD-Simulation: 1ads (hellgrün), 1xgd (dunkelblau), 2500 ps (pink), 3500 ps (orange), 3548 ps (cyan); Snapshot nach 1254 ps (grau) SMD-Simulation zum Vergleich.

## 6.6 Diskussion

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 erklärt, wirkt in Steered Molekulardynamik-Studien eine externe Kraft auf ein Atom oder eine definierte Gruppe von Atomen. In dem hier beschriebenen Fall handelt es sich dabei um den Kofaktor  $\text{NADP}^+$ , der aus der ALR2-Bindetasche hinausgezogen wird. Ein Betrachten der gemessenen Kräfte für Pfad A-D und die Ermittlung ihrer Kraftprofile sollte daher einen Einblick in die Proteinantwort auf den Kofaktorausritt geben. Zudem ist es möglich, die externe Arbeit  $W$  durch Integration der Kraft  $F$  entlang des Pfades aus der SMD Trajektorie [343] zu bestimmen:

$$W(r(t)) = \int_0^{r(t)} F(t) dr(t)$$

Die dabei für diese vier Pfade ermittelten Kraftprofile sind in Abb. 6.24 eingezeichnet, die daraus berechneten Werte der Arbeit  $W$  sind in Tabelle 6.2 aufgelistet.



**Abbildung 6.24:** Vergleich der für den Kofaktorausritt ermittelten Kraftprofile entlang der 4 verschiedenen Pfade: Pfad A (pink), Pfad B (grün), Pfad C (cyan) und Pfad D (blau).

Allen behandelten Möglichkeiten des Kofaktoraustritts ist ein stetiger Anstieg der Kraft gemeinsam, die zum Ziehen benötigt wird, während der Kofaktor noch fest in der Tasche verankert ist. Der erste Peak von ca. 2500 pN wird nach etwa 500 ps in Pfad C erreicht, in welchem eine um  $4 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$  größere Federkonstante angewandt wurde. Dies führt natürlich zu einem schnelleren Entweichen des Kofaktors, und die benötigte Kraft sowie Arbeit müssen getrennt bewertet werden. Das zugehörige Kraftprofil zeigt zudem auch größere Fluktuationen als jenes entlang der drei anderen Pfade. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens besteht darin, dass für Pfad A, B und D die Umordnung des Proteins als Reaktion auf den erzwungenen Kofaktorausritt dominiert und zu einem sanfteren Kraftprofil führt. Diese drei Kraftprofile erreichen ihren Maximalwert zwischen 700 und 900 ps und sind in ihrer Form untereinander ähnlich. Entlang Pfad A wird ein Maximum von 3600 pN nach 900 ps erreicht. Die entsprechenden Werte für Pfad B und D liegen jeweils bei 3000 und 2600 pN.

**Tabelle 6.2:** Überblick über die ermittelte Arbeit [kcal/mol] für alle vier verschiedenen Möglichkeiten des Kofaktoraustritts.

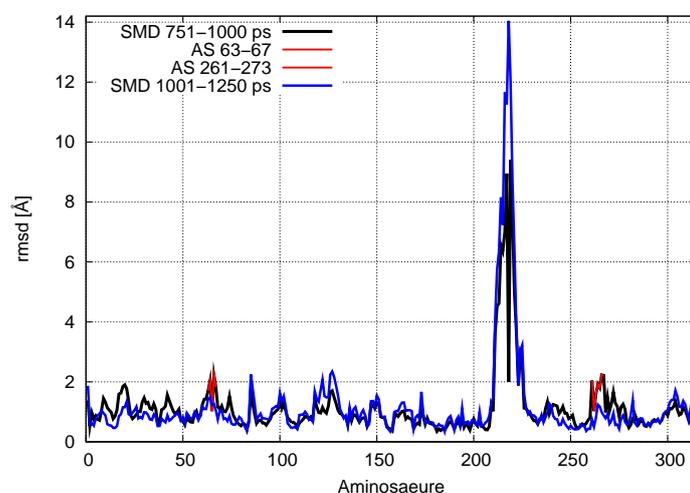
Pfad	Arbeit W [kcal/mol]
Pfad A	73.19
Pfad B	50.49
Pfad C	44.96*
Pfad D	50.25

\* mit unterschiedlicher Kraftkonstante ( $k=7$  kcal/mol/Å<sup>2</sup>)

Dementsprechend liegt auch der für diese Pfade ermittelte Wert für die Arbeit W deutlich unter jener aus Pfad A. Bei einem Vergleich der Daten wird klar, dass ein Kofaktorausritt entlang Pfad D, entlang welchem die akkumulierte Arbeit am geringsten ist, am wahrscheinlichsten ist.

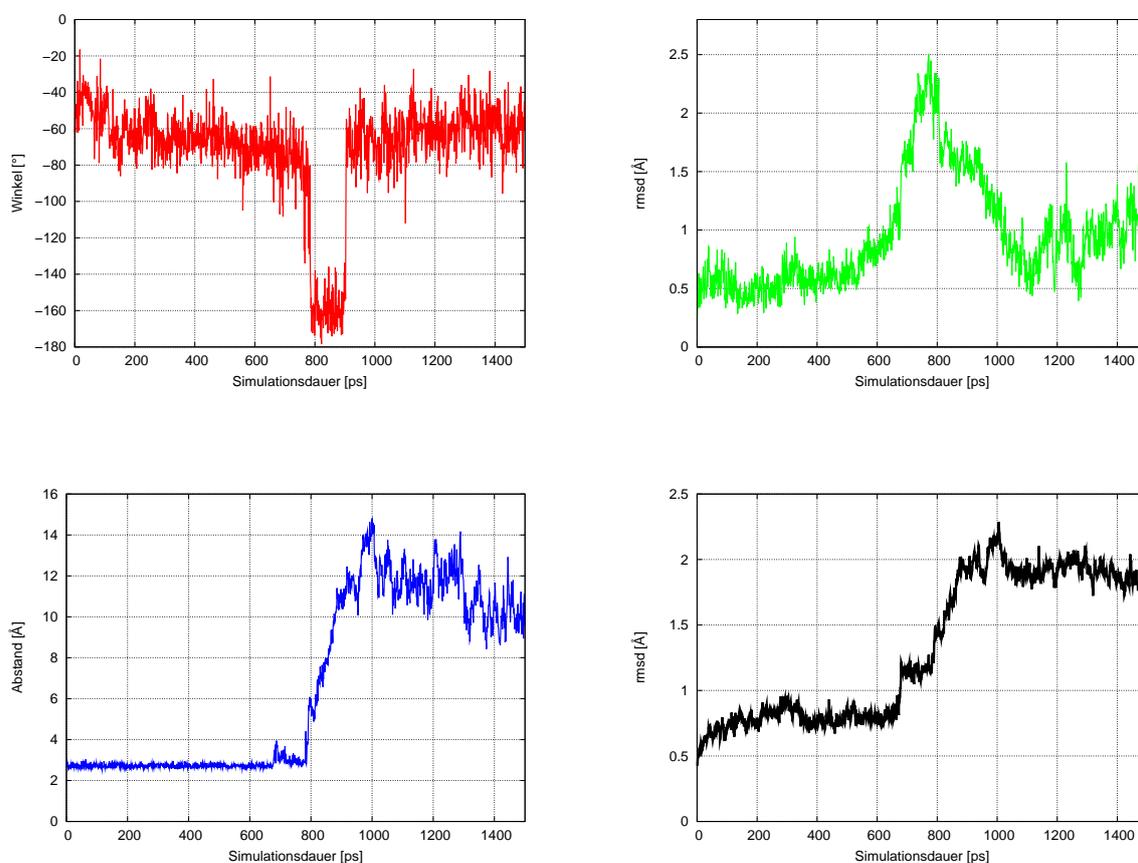
Ein weiterer interessanter Aspekt der Kraftprofile betrifft den Plateaubereich in Pfad D, der nun folgend noch genauer beschrieben wird. Ein Ziehen des Kofaktors gemäß diesem Pfad führte nämlich zu den vielversprechendsten Resultaten (siehe zugehöriges Unterkapitel 6.5). Abbildungen 6.25-6.30 zeigen die durchgeführten strukturellen Analysen auf und helfen die beschriebenen Ergebnisse besser zu verstehen.

Bei Berücksichtigung der strukturellen Antwort des Enzyms im Laufe des Austrittsprozesses kann dieser in drei verschiedene Abschnitte unterteilt werden. Ein Kraftplateau ist in Abb. 6.24 zwischen 620 und 800 ps ersichtlich. In etwa diesem Zeitintervall erfährt der Bereich zwischen Pro 261 und Phe 273 sowie zwischen Arg 63 und Val 67 größere Veränderungen, was sich in erhöhten RMSD-Werten relativ zur Startstruktur nach 1 ns Equilibrationsdauer äußert und in Abbildung 6.25 für das Zeitfenster von 751-1000 ps dargestellt ist. Abb. 6.28 zeigt die auf einer relativen Skala nach ihren C $\alpha$ -RMSD-Werten farbkodierte ALR2 (von blau nach rot hin zu höheren RMSD-Werten). Die erwähnten Bereiche (von Aminosäure 261-273 und 63-67) sind rot koloriert in dem Bereich zwischen 751 und 1000 ps Simulationsdauer. Da es in diesen Proteinbereichen zu den größten Abweichungen in Folge der Krafteinwirkung kommt, handelt es sich vermutlich auch um die flexibelsten (bzw. anpassungsfähigsten oder „plastischsten“). Dieser beschriebene erste Abschnitt bereitet den Kofaktorausritt vor. Zusätzlich gibt Abb. 6.25 einen Überblick über die analysierten zeitlichen Simulationsabschnitte mit den zugehörigen C $\alpha$ -RMSD-Werten aller Aminosäuren. Natürlich zeigt der Abschnitt des „safety-belt“-Loops zwischen den Aminosäuren Ser 214 und Ser 226 die höchsten Werte, aber es kommt auch zur Geltung, dass die ALR2 Regionen um Phe 273 und Val 67 (in rot dargestellt) höhere RMSD-Werte im hier beschriebenen ersten SMD-Abschnitt besitzen.



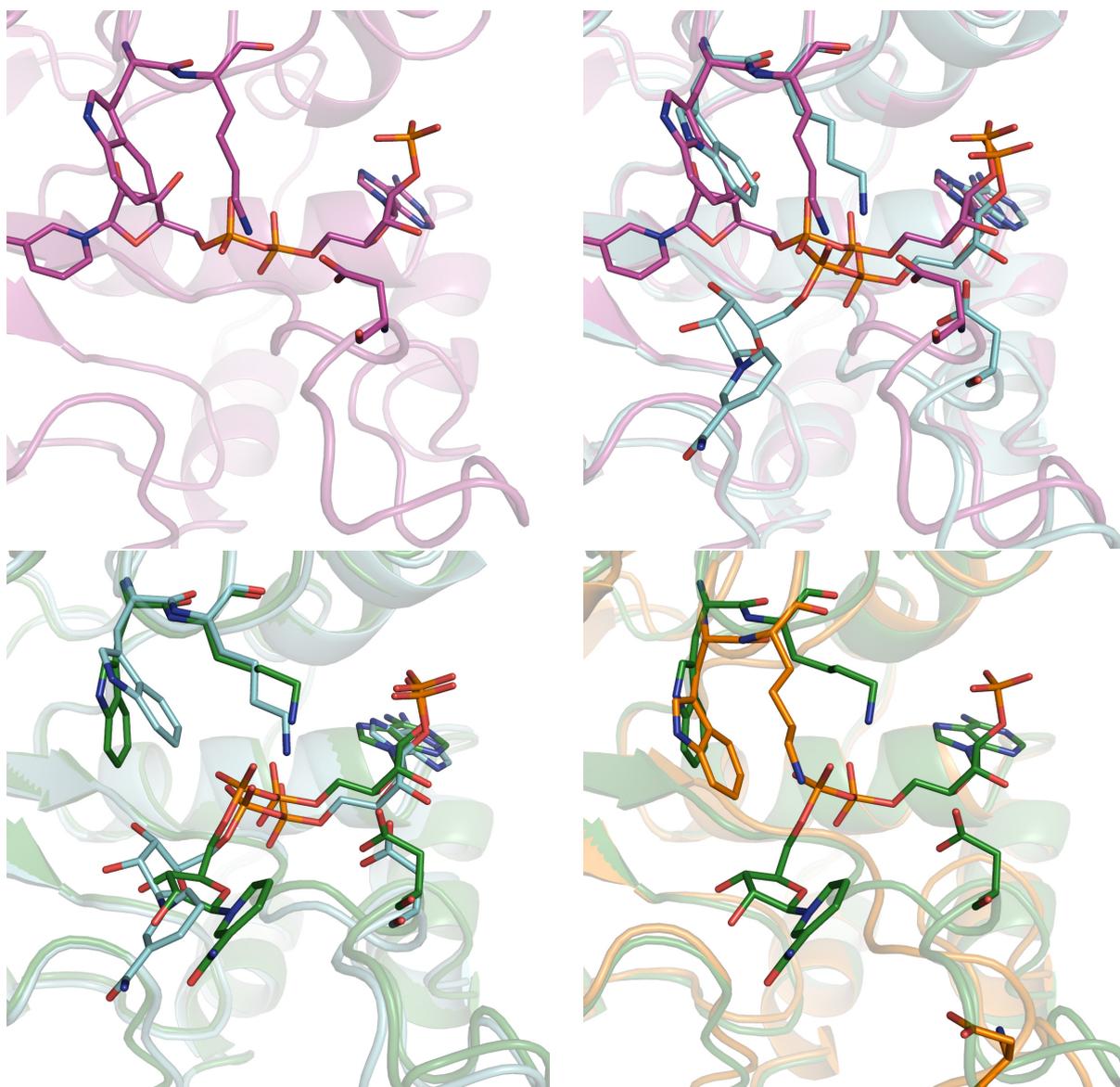
**Abbildung 6.25:**  $C\alpha$ -RMSD Werte in verschiedenen Zeitabschnitten der SMD-Simulation nach Pfad D, relativ zur Struktur nach 1 ns Equilibrierung: 751-1000 ps in blau, Aminosäuren 63-67 und 261-273 in rot; 1001-1250 ps in schwarz.

Wird das Kraftprofil in Abb. 6.24 zur Auswertung herangezogen, kann der klar erkennbare Peak durch das Aufbrechen zweier H-Brücken zu diesem Zeitpunkt der SMD erklärt werden, was hier als zweiter notwendiger Abschnitt des Kofaktoraustritts behandelt wird. In allen Kristallstrukturen der ALR2 (Ausnahme 2nvd) bestehen zwei Salzbrücken ausgehend von Lys 21. Eine reicht zu einer der Phosphatgruppen des Kofaktors  $\text{NADP}^+$  hin, die andere zur Carboxylatseitenkette von Asp 216. Ein Bruch dieser ist für den Kofaktoraustritt essentiell und ermöglicht ihn erst. In diesem Kontext kann Lys 21 zusammen mit Trp 20 auch als „gate-keeper“ für den Austritt von  $\text{NADP}^+$  angesehen werden. Sobald Lys 21 seinen  $\chi_1$ -Winkel ändert, kann die H-Brücke zum Asp 216-Carboxylat nicht mehr aufrecht erhalten werden (siehe Abb. 6.26, Winkel- und Distanzplots). Konsequenterweise ändert auch Trp 20 seine Orientierung und erlaubt den Kofaktoraustritt. Nachdem  $\text{NADP}^+$  die beiden „gate-keeper“-Aminosäuren passiert hat, kann ein Absinken der Kraft beobachtet werden. Dieses Verhalten wird auch für Pfad C ermittelt, welcher durch eine ausgiebigere Loop-Bewegung charakterisiert ist (im Gegensatz zu Pfad A und B, siehe Distanzplots in den entsprechenden Kapiteln). Für die beiden Pfade A und B wird die Lys 21-Asp 216 H-Brücke nach einer Simulationsdauer von 1300 bzw. 1000 ps wieder hergestellt und verhindert damit einen weiteren Drift des „safety-belts“ hin zur apo-Konformation.



**Abbildung 6.26:** Charakteristika der SMD-Simulation nach Pfad D als Funktion der Zeit: *Links oben:*  $\chi_1$ -Winkel von Lys 21; *Rechts oben:* C $\alpha$ -RMSD-Werte der Reste 261-273; *Links unten:* Abstand zwischen Lys 21 N $\epsilon$  und Carboxylat-O von Asp 216; *Rechts unten:* C $\alpha$ -RMSD-Werte über das Protein relativ zu lads.

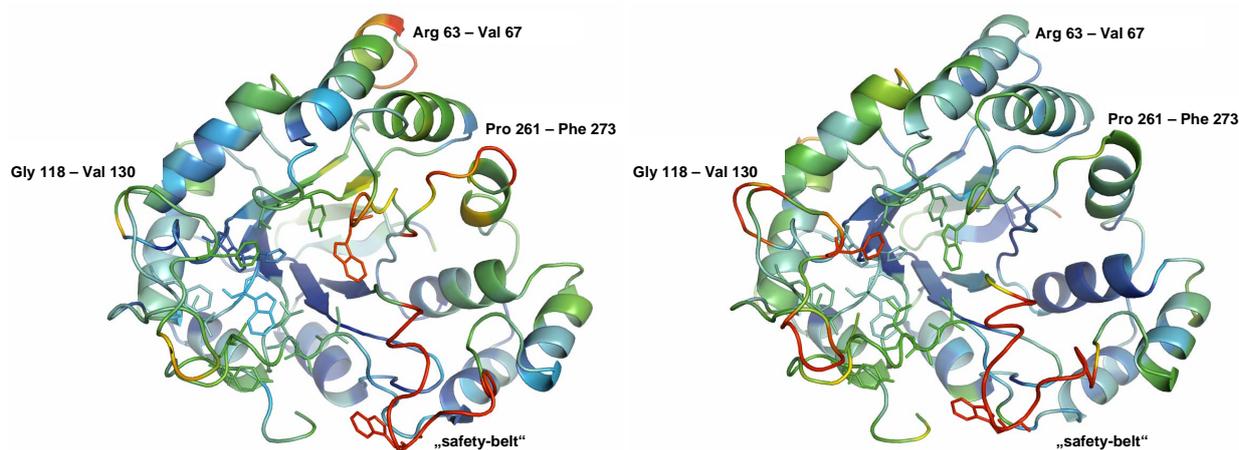
Abb. 6.27 zeigt den Kofaktoraustritt detailliert auf und unterstreicht dabei die Rolle von Lys 21 und Trp 20 als „gate-keeper“. Klar gezeigt wird, dass die Veränderung des  $\chi_1$ -Winkels an Lys 21, gefolgt von einer Rotation an Trp 20 nach 800 ps SMD-Simulation (grüne Struktur in Abb. 6.27) NADP<sup>+</sup> einen schnellen Austritt ermöglicht. Diesem Ereignis geht eine Konformationsänderung am Kofaktor bei 790 ps voraus (cyanfarbene Struktur in Abb. 6.27).



**Abbildung 6.27:** Sequenz verschiedener Snapshots aus der SMD-Simulation nach Pfad D zur Erklärung des Kofaktoraustritts, mit Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP<sup>+</sup> als Stabmodell: *Links oben:* nach 784 ps: Orientierung von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 vor dem Kofaktoraustritt; *Rechts oben:* nach 794 ps: Lys 21 ändert seinen  $\chi_1$ -Winkel, die H-Brücke zu Asp 216 wird gebrochen, der Kofaktoraustritt erfolgt; *Links unten:* nach 800 ps: Trp 20 rotiert in die Position wo vorher der Kofaktor lokalisiert war; *Rechts unten:* nach 905 ps: Lys 21 ändert seinen  $\chi_1$ -Winkel zurück in den ursprünglichen Wert, der Kofaktor hat die Bindetasche verlassen und Asp 216 hat sich als Teil des „safety-belts“ wegbewegt.

Nachdem der Kofaktor die Bindetasche verlassen hat, ereignen sich strukturelle Veränderungen in der Proteinregion zwischen Gly 118 und Val 130. Dies zeigt sich in der Darstellung

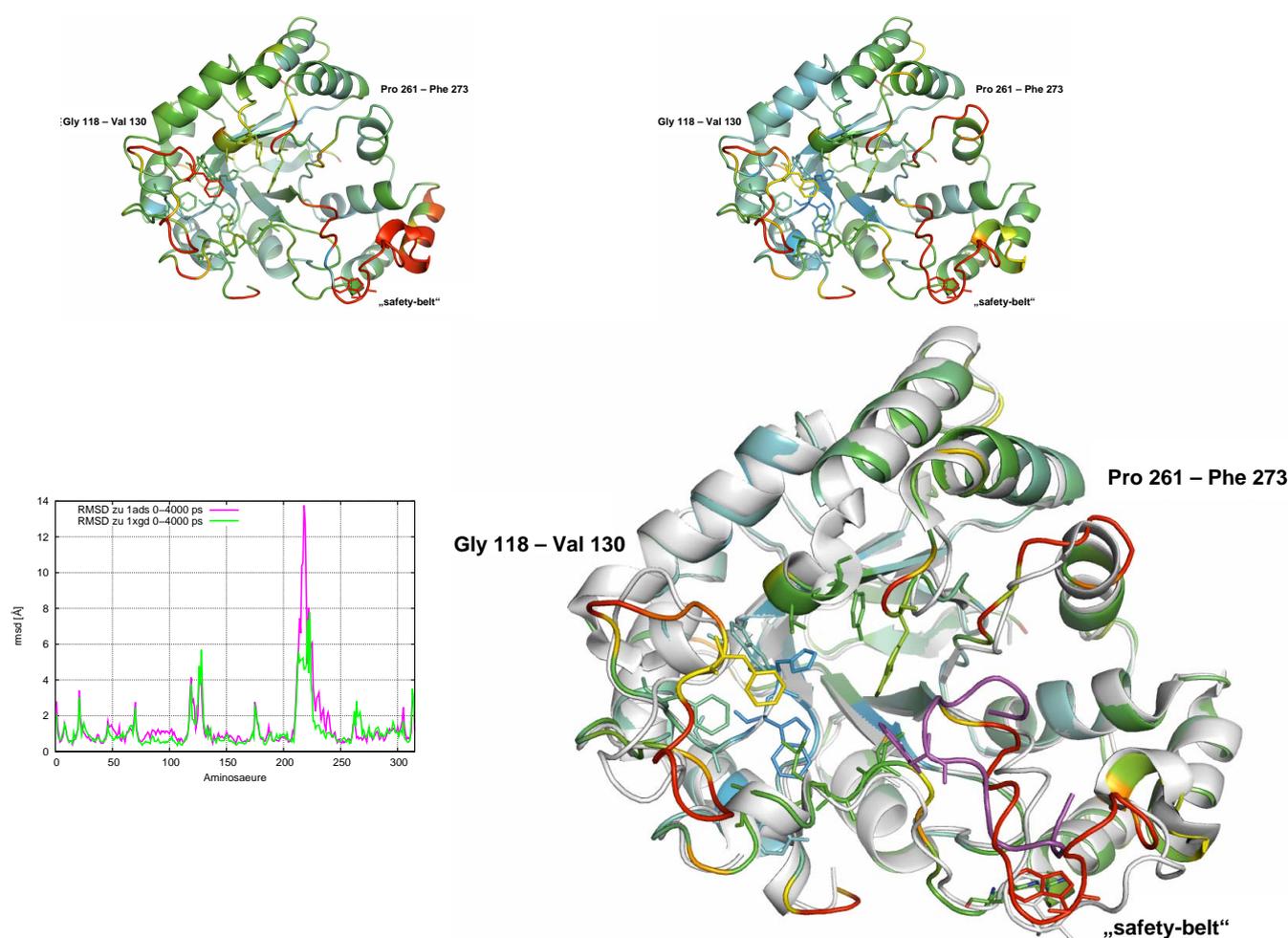
der farbkodierten ALR2 in Abb. 6.28 und dem per-Rest RMSD-Plot in Abb. 6.25. Ein sehr interessanter Aspekt ergibt sich aus Abb. 6.28 bei einem Farbvergleich der verschiedenen Proteinregionen in den beiden Simulationsabschnitten und rechtfertigt eine Unterteilung des Kofaktoraustritts in verschiedene Abschnitte: Wie schon erwähnt sind die Bereiche erhöhter RMSD-Werte zwischen den Resten Arg 63 und Val 67 sowie zwischen Pro 261 und Phe 273 angesiedelt und im Simulationsintervall zwischen 751 und 1000 ps rot eingefärbt. Diese Bereiche sind in der Vorbereitung des Kofaktoraustritts involviert. Zudem ereignet sich in diesem Abschnitt, nach 800 ps, der NADP<sup>+</sup>-Austritt und hat eine Rotation an Lys 21 und Trp 20 zur Folge, welche daher im Zentrum des Proteins in rot erscheinen (Trp 20 ist als Aminosäure der Bindetasche als Stabmodell abgebildet). Nachdem der Kofaktor das Solvens erreicht hat, erfolgen strukturelle Anpassungen in der Region zwischen Gly 118 und Val 130, welche daher in Abb. 6.28, rechts, rot koloriert ist, während die anderen erwähnten Bereiche in blau/grün erscheinen. Sobald der Kofaktor die Bindetasche verlassen hat, relaxieren diese Bereiche der ALR2 zwischen den Aminosäuren 63-67 und 261-173 in der Folge zurück in ihre Ausgangsposition.



**Abbildung 6.28:** Nach  $C\alpha$ -RMSD-Werten relativ zur Struktur nach 1 ns Equilibrierung kolorierte ALR2 nach 1 ns (links) und 1,5 ns SMD-Simulation (rechts) (blau: kleine RMSD-Werte, rot: hohe RMSD-Werte) für verschiedene SMD-Simulationsabschnitte: *Links*: von 751-1000 ps; *Rechts*: von 1251-1500 ps.

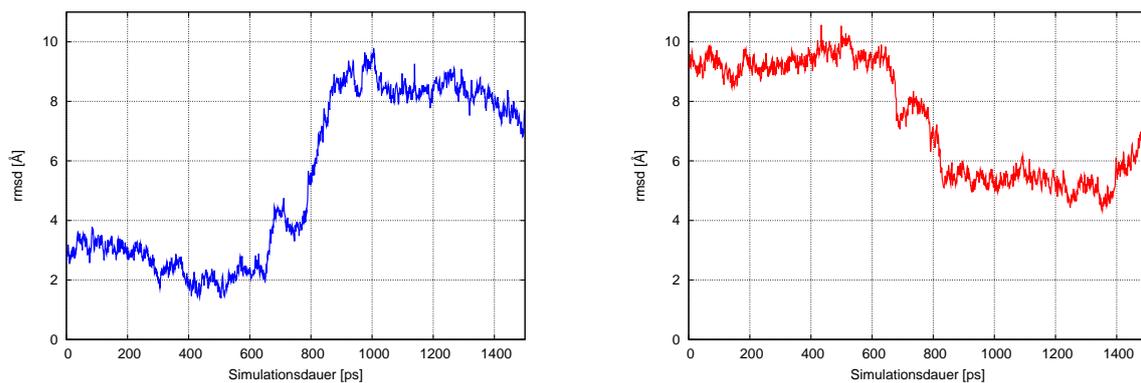
In den nachgeschalteten 4 ns klassischer MD-Simulation kommt es zu strukturellen Anpassungen, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Dies verdeutlicht auch der  $C\alpha$ -RMSD-Plot per Aminosäure in Abb. 6.29. Die Werte sind bzgl. der 1ads und 1xgd Kristallstrukturen berechnet und aufgetragen. Vor allem die Region des „safety-belts“ zeigt noch immer große RMSD-Werte. Die Werte relativ zu 1xgd sind aber nur halb so groß wie jene relativ zu 1ads, was für eine weiterführende Bewegung in Richtung apo-Konformation spricht. Diese RMSD-Beobachtungen werden zusätzlich noch durch eine farbkodierte ALR2-Darstellung unterstrichen (siehe Abb. 6.29). Der rot kolorierte „safety-belt“-Bereich und der Bereich benachbarter Aminosäuren (links oben) entspricht starken

Bewegungen relativ zur holo-1ads Struktur im Laufe der klassischen MD-Simulation, was einem Abweichen von jener Struktur entspricht. Folgerichtig spiegelt die Farbkolorierung relativ zu 1xgd kleinere RMSD-Werte wider, was einer zunehmenden Annäherung an die apo-Struktur entspricht. Der „safety-belt“-Loop Bereich ist hier (rechts oben) nicht so ausgedehnt rot koloriert. In besprochener Abb. 6.29 sind die Strukturen von 1xgd und des „safety-belts“ aus der 1ads Struktur (lila) vergleichend zur resultierenden Struktur der MD-Simulation rechts unten als Cartoon abgebildet. Sie illustrieren gut, wohin sich der Loopbereich mit Trp 219 durch die SMD-Simulation entlang Pfad D und anschließender klassischer MD-Simulation bewegt. Tatsächlich wird ein Übergang dessen von der holo- in die apo-Struktur vollzogen.

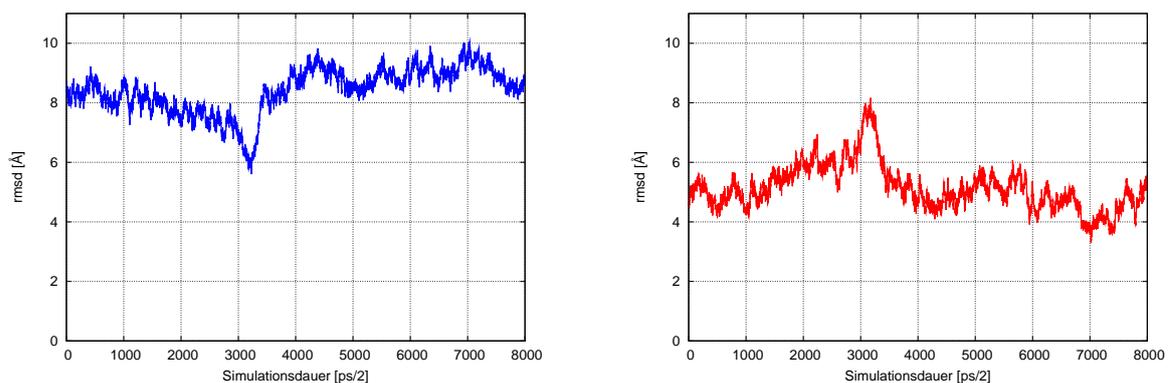


**Abbildung 6.29:** Nach C $\alpha$ -RMSD-Werten kolorierte ALR2 nach 3548 ps MD-Simulation (blau: kleine RMSD-Werte, rot: hohe RMSD-Werte): *Links oben:* relativ zu 1ads; *Rechts oben:* relativ zu 1xgd; *Links unten:* C $\alpha$ -RMSD-Werte aller Aminosäuren relativ zu 1ads (lila) und 1xgd (grün); *Rechts unten:* C $\alpha$ -RMSD-Werte relativ zu 1xgd, 1xgd (grau) verglichen mit dem „safety-belt“ aus 1ads (lila).

All diese Beobachtungen werden noch durch Abb.6.30 und 6.31 abgerundet. Für die reine SMD-Simulation zeigt sich eindeutig, dass die  $C\alpha$ -RMSD-Werte des „safety-belts“ relativ zu 1ads mit fortschreitender Zeit zunehmen und jene relativ zu 1xgd abnehmen. In der darauffolgenden MD-Simulation bleiben die erreichten RMSD-Werte jeweils annähernd konstant auf dem während der SMD erreichten Wert (mit Ausnahme einer kurzen Abweichung bei ca. 3000 ps), weswegen von einer stabilen, apo-nahen Struktur ausgegangen werden kann.



**Abbildung 6.30:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte des „safety-belts“ im Verlauf der SMD-Simulation nach Pfad D: *Links:* relativ zu 1ads; *Rechts:* relativ zu 1xgd.



**Abbildung 6.31:**  $C\alpha$ -RMSD-Werte des „safety-belts“ im Verlauf der der SMD-Simulation nach Pfad D nachgeschalteten MD-Simulation: *Links:* relativ zu 1ads; *Rechts:* relativ zu 1xgd.

In der hier vorgestellten Studie war es somit möglich, unter Zuhilfenahme der Methode der SMD den Übergang von der kofaktorgebundenen Holo-1ads-Struktur in die kofaktorfremde Apo-1xgd-Struktur nachzuvollziehen. Dabei wurden auch strukturelle Charakteristika des den Kofaktorausritt begleitenden Geschehens im Protein erkannt und hervorgehoben. Die Methode der SMD eignet sich somit besonders gut, relativ große molekulare Änderungen in biomolekularen Systemen im ns-Bereich zu induzieren und damit experimentelle Studien zu ergänzen.

Einer möglichen Kritik in der Wahl der Austrittsrichtungen wird hier dadurch entgegengekommen, dass insgesamt vier verschiedene Austrittsrichtungen für den Kofaktor auch hinsichtlich ihres Kraftprofils untersucht wurden. Jener Weg, der den Übergang zwischen der holo- und apo-Struktur vollzieht ist auch tatsächlich der, welcher mit dem geringsten Kraftaufwand verbunden ist und damit der wahrscheinlichste ist.

Unabhängig von der Wahl der Ziehgeschwindigkeit  $\vec{v}$ , der Kraftkonstanten  $k$  und damit unabhängig von den resultierenden Kraftprofilen geben SMD-Studien vor allem aber einen Einblick in das qualitative Geschehen im Zuge eines Liganden-(Kofaktor)ein- und austrittes. Hier wurde dabei Trp 20, allen vier Austrittsrichtungen folgend, als entscheidender Rest identifiziert, der zur Freigabe des Kofaktors in die Umgebung seine Seitenkettenorientierung verändern muss. Für den hier als Pfad D bezeichneten Austrittsweg wurde auch gezeigt, dass die Bewegung von Trp 20 mit jener von Lys 21 gekoppelt ist. Ein Hindurchgleiten des Kofaktors durch diese beiden „gate-keeper“ führt entlang dieser Austrittsrichtung tatsächlich zu einer apo-ähnlichen Endstruktur, die auch experimentell ermittelt vorliegt und deren theoretische Ermittlung durch die Methode der SMD induziert werden konnte.

## 7 SMD-Simulationen am Androgen- und Estrogenrezeptor

In Kapitel 4.2 wurde bereits auf die den NRs inhärente Mikro- und Makro-Flexibilität verwiesen. Die Makro-Flexibilität umfasst eine Veränderung der Orientierung von Helix 12, welche je nach An- und Abwesenheit von Liganden in einer Agonist-, Antagonist- oder Apo-Konformation vorliegen kann. Ein genaues Verständnis der Vorgänge, welche einen Übergang zwischen den durch eine unterschiedliche Helix 12 Orientierung charakterisierten Zustände induzieren, wäre ein Ansatzpunkt für das Design neuer NR-Wirkstoffe. Daneben gäbe ein Sammeln des durch alle möglichen Konformationen definierten Ensembles einen weiteren Einblick in strukturelle Vorgänge im mikro- und makromolekularen Bereich. Dadurch wäre es nämlich möglich, energetisch ungünstigere, bislang nicht kristallisierte, aber die biologische Aktivität beeinflussende Konformationen zu erhalten und zu bewerten.

Trotz der Anstrengungen von Kristallografen ist es bislang nicht gelungen, den Androgenrezeptor als Wildtyp in Komplex mit einem Antagonisten zu kristallisieren und die Struktur aufzuklären. Theoretische, computergestützte Arbeit stellt hier eine optimale Alternative dar, eine solche zu erhalten und einen potenziellen Übergang zwischen der bekannten und kristallografisch ermittelten, geschlossenen Holo-Agonist-gebundenen Form und einer veränderten Helix 12 Orientierung hin zu einer möglichen offenen Holo-Antagonist-gebundenen oder gar Apo-Konformation zu beobachten. Wie in Abb. 4.11 für den Falle des RXR $\alpha$ -Rezeptors gezeigt, unterscheiden sich die beiden letztgenannten in ihrer Orientierung von Helix 12, werden konventionsgemäß aber beide als offen bezeichnet. Weder für den AR noch für den ER sind Apo-Strukturen experimentell ermittelt worden. In diesem Kapitel sollen die bereits beschriebenen SMD-Simulationmethoden auf das System des Androgen- und Estrogenrezeptorkomplexes angewandt werden, um im Zuge der Ligandenentfernung erste Hinweise auf die Mobilität in Helix 12 zu erhalten und strukturelle Einblicke in die Funktionsweise des Ligandenaustritts zu erhalten. Außerdem soll bewertet werden, ob durch Verwendung der Methode der SMD ein Übergang zwischen der agonistischen Konformation dieser NRs und einer antagonistischen oder Apo-Konformation erhaltbar ist.

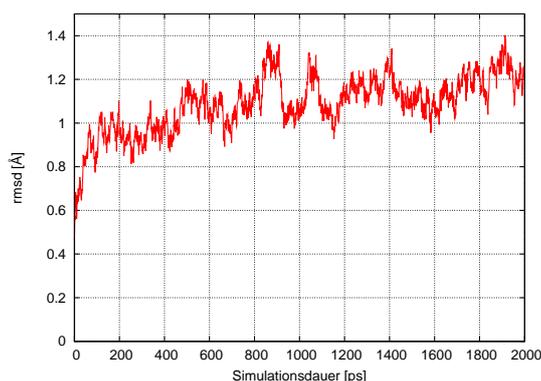
Analoge Studien an beiden Rezeptoren sollen daher aufdecken, ob die für das AR-System gesammelten Beobachtungen auf den strukturell ähnlichen ER übertragbar sind oder ob sich strukturelle Unterschiede zwischen beiden NR-Vertretern ergeben. Im Gegensatz zum Androgenrezeptor sind für den Estrogenrezeptor Kristallstrukturen aufgelöst worden, die ihn in seiner offenen Holo-Antagonist-gebundenen Form zeigen und in den folgenden strukturellen Analysen der erhaltenen Konformationen als Referenz für eine Verschiebung von Helix 12 herangezogen werden.

## 7.1 Androgenrezeptor

### 7.1.1 Methode

Die röntgenkristallografisch ermittelte Struktur der AR LBD in Komplex mit dem steroidalen Agonisten Testosteron (PDB-Code 2am9 [344]) wurde als Startstruktur für die nachfolgend beschriebenen SMD-Simulationen zum Ligandenaustritt aus dem AR herangezogen.

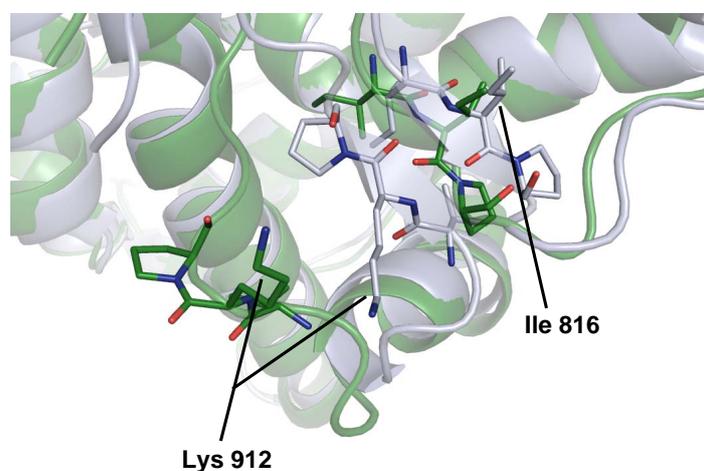
Die Parametrisierung und Minimierung des Komplexes erfolgte mit dem Programmpaket AMBER 10.0 [311] unter Verwendung des Cornell et al. Kraftfeldes [313] in der Variante des parm99SB Parametersatzes [30, 31]. Die Vorbereitung des Systems erfolgte wie in Kapitel 6 beschrieben. Nach einer 200 Schritt langen „steepest descent“ Minimierung und nachfolgender Solvatisierung in einer TIP3P Box von Wassermolekülen mit Positionierung von 5 Gegenionen, wurde ein Equilibrierungsprozess gestartet. Dieser bestand in einer 2 ns langen MD-Simulation des solvatisierten Rezeptor-Ligand-Komplexes unter konstantem Druck bei einer Temperatur von 300 K. Abb. 7.1 zeigt die  $C\alpha$ -RMSD-Werte des Systems im Verlauf dieser Vorbereitungsphase und das Erreichen eines stabilen Zustandes am Ende der 2 ns. Dieser Endzustand war Ausgangspunkt für eine nachfolgende SMD-Simulation, die den AR in eine Struktur überführen sollte, welche als Startstruktur für alle nachfolgenden SMD-Simulationen genutzt werden konnte. Diese sollten den Liganden Testosteron in verschiedenen Richtungen aus der LBD Bindetasche ziehen und dabei eine mögliche Helix 12 Bewegung untersuchen. In jedem Fall wurde diesen Simulationen noch eine 100-Schritt „conjugate gradient“ Minimierung vorangeschaltet. Alle SMD- und MD-Simulationen wurden mit NAMD 2.6 [37] berechnet.



**Abbildung 7.1:**  $C\alpha$  RMSD Werte bezogen auf die Kristallstruktur 2am9 im Verlauf der Equilibrierung des AR-Systems.

In allen AR Kristallstrukturen wird eine Stabilisierung der geschlossenen Konformation durch ein  $\beta$ -Faltblatt beobachtet, welches von dem  $\beta$ -Strang, der Helix 8 und Helix

9 (Aminosäuren 815-817) miteinander verbindet, und jenem am carboxyterminalen Ende (Aminosäuren 911-913) ausgebildet wird. Da eine potenzielle Bewegung von Helix 12, induziert durch den Ligandenaustritt, Ziel dieser Arbeit war, wurde zunächst eine initiale SMD gestartet, welche einen Bruch dieses Faltblattes beabsichtigt. Dadurch sollte die Voraussetzung für eine Veränderung der Orientierung in Helix 12 geschaffen werden, zu welcher es im Zuge des Ligandenaustritts bei Existenz des Faltblattes nur erschwert kommen kann. Im Detail war der Bruch der essentiellen H-Brücke zwischen dem Backbone von Lys 912 und Ile 816 Ziel dieser vorangeschalteten SMD. Zu diesem Zweck wurde das Backbone Carbonylsauerstoffatom von Lys 912 als SMD-Atom deklariert, welches sich entlang des Vektors zwischen dem Backbone Stickstoffatom von Ile 816 und ihm selber immer weiter von dem gegenüberliegenden  $\beta$ -Strang wegbewegt. Um Translationen und Rotationen des Proteins im Zuge dieser und aller nachfolgenden Simulationen zu vermeiden, wurde ein zusätzliches harmonisches Potential ( $k=1 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ ) auf die kartesischen Koordinaten aller Atome der Aminosäuren Val 676, Thr 755, His 789, Leu 812, Met 832, Ile 835, Gln 858 und Ser 865 gesetzt. Diese Aminosäuren liegen im Bereich von Helices, die räumlich dem Geschehen des Ligandenaustritts entfernt liegen. Die 600 ps lange initiale SMD-Simulation resultierte in einem Bruch des  $\beta$ -Faltblattes und ist in Abb. 7.2 in grüner Cartoon-Darstellung im Vergleich mit der ursprünglichen 2am9 Kristallstruktur in grau abgebildet. Diese Struktur diente als Ausgangspunkt für die anschließenden Simulationen zum Testosteronaustritt.



**Abbildung 7.2:** Kristallstruktur der LBD des Androgen Rezeptors (2am9, silber) und des gebrochenen  $\beta$ -Faltblattes nach 600 ps SMD-Simulation (grün).

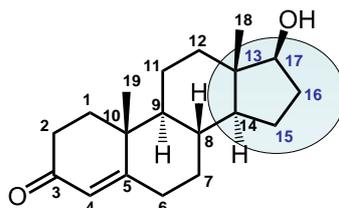
Die für diese SMD-Simulationen gewählten Richtungen des Ligandenaustritts sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Insgesamt wurden 5 verschiedene Pfade gewählt, entlang welcher Testosteron den Komplex verlässt. Die Vektoren hierfür ergeben sich jeweils aus der Verbindung zwischen dem gewählten  $C\alpha$ -Atom im Protein und dem SMD Atom in Liganden. Abb. 7.3 zeigt die Nomenklatur der Atome im Steroidgerüst von Testosteron

zum besseren Verständnis. Die Austrittsmöglichkeiten wurden durch visuelle Betrachtung des Liganden in der LBD Bindetasche und der umliegenden Aminosäuren gewählt.

**Tabelle 7.1:** Überblick über die in den SMD-Simulationen gewählten Vektoren des Testosteronaustritts.

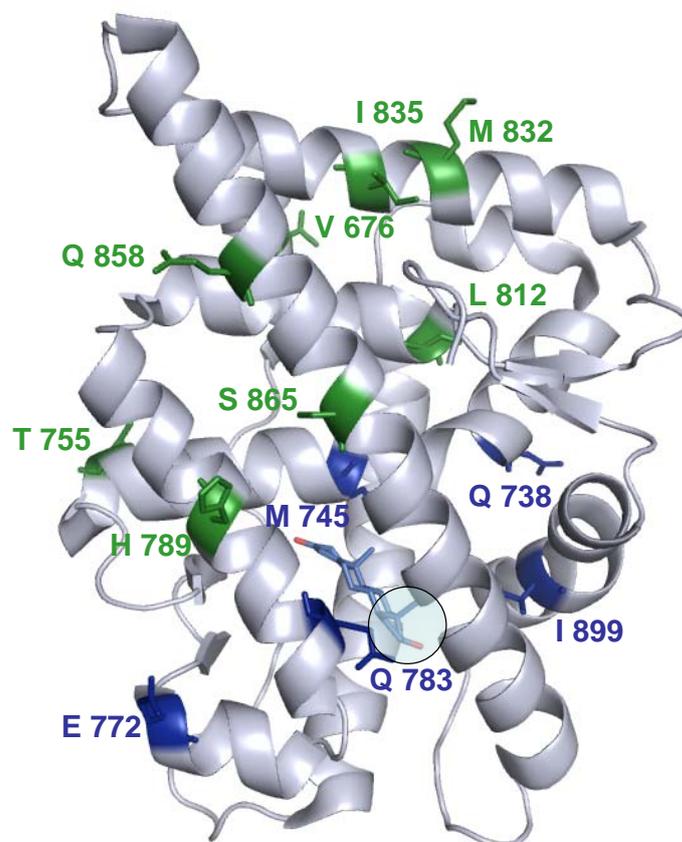
Pfad	C $\alpha$ -Atom von Aminosäure	SMD Atom in Testosteron
Pfad A	Gln 783	C 17
Pfad B	Glu 772	C 15
Pfad C	Met 745	C 16
Pfad D	Gln 738	C 15
Pfad E	Ile 899*	C 13

\* für Pfad E wurde der resultierende Vektor invertiert



**Abbildung 7.3:** Nomenklatur der Atome im Testosterongerüst, zur Richtungsbestimmung relevanter Bereich blau unterlegt, SMD-Atome in blau.

Die SMD-Simulationen wurden mit konstanter Geschwindigkeit von  $0,025 \text{ \AA}/\text{ps}$  und einer Kraftkonstanten von  $3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  in einem NPT-Ensemble mit Langevin-Dynamik durchgeführt. Die nachfolgende Abb. 7.4 hebt die zur Richtungsbestimmung gewählten Aminosäuren in blau und jene mit zusätzlichem harmonischen Potential zur Verhinderung von Rotationen und Translationen des Gesamtproteins in grün hervor.

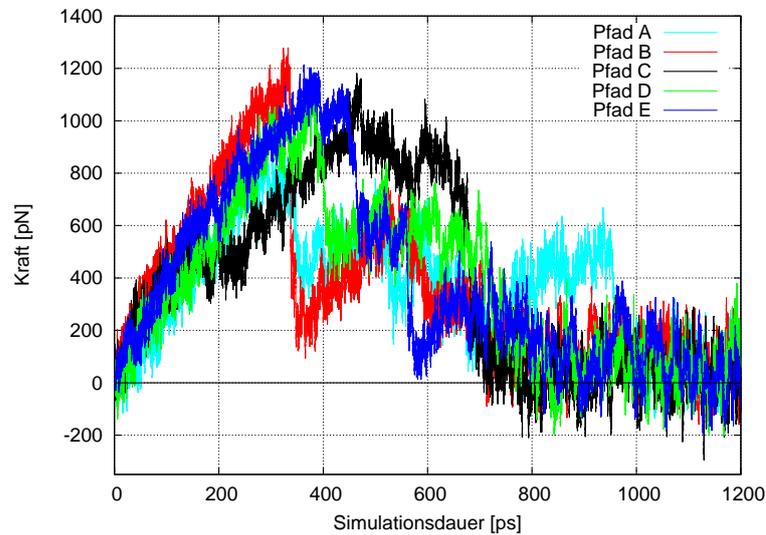


**Abbildung 7.4:** AR LBD als Cartoon-Darstellung: Ausgewählte Aminosäuren mit zusätzlichem harmonischem Potential (grün) und zur Richtungsbestimmung (blau) als Stabmodell; zur Richtungsbestimmung relevanter Bereich in Testosteron blau unterlegt.

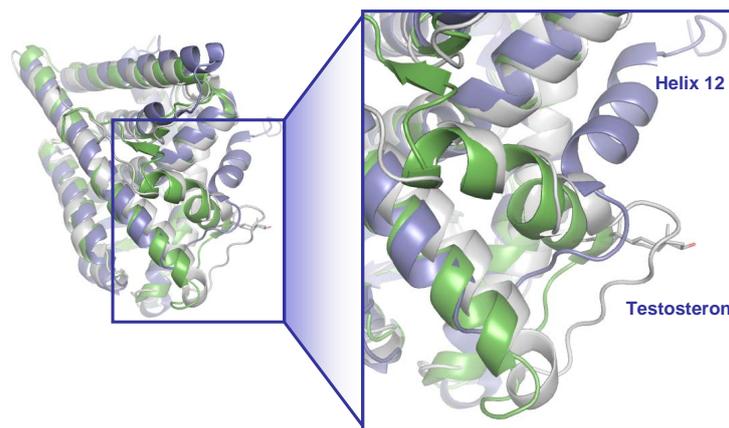
### 7.1.2 Resultate

Gemäß Tabelle 7.1 wurde Testosteron entlang fünf verschiedener Vektoren aus der LBD Tasche gezogen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf einen möglichen Übergang der geschlossenen Konformation von Helix 12 in eine offene gelegt, welcher durch dieses Ereignis induziert wird. Die nachfolgenden Abbildungen 7.5-7.9 geben einen Überblick über die Ergebnisse aus den Simulationen entlang der Pfade A-E. Darin ist der resultierende Snapshot aus der SMD-Simulation in Silber dargestellt und die kristallografisch ermittelte Struktur der AR LBD in Grün. Zusätzlich zeigen die Abbildungen zum Vergleich die ER LBD (1xpc) in offener und damit antagonistischer Konformation von Helix 12 (violett). Eine die offene Apo-Form des AR oder ER repräsentierende Kristallstruktur ist nicht bekannt. Klar ersichtlich ist, dass Pfad C und D keinerlei Effekt auf Helix 12 haben, während der Ligandenausritt entlang Pfad A, B und E eine partielle Verschiebung in gegebener Helix bewirkt und daher nochmal in den entsprechenden Abbildungen in Ausschnitten hervor-

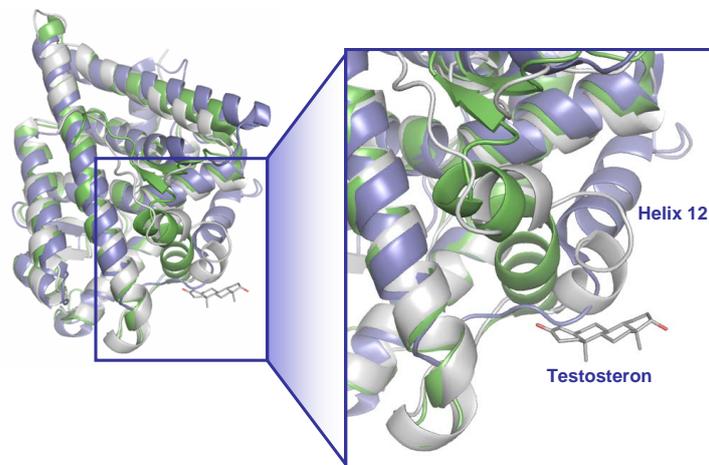
gehoben und genauer betrachtet wird. Zudem zeigt Abb. 7.5 die zugehörigen Kraftprofile aller Pfade A-E.



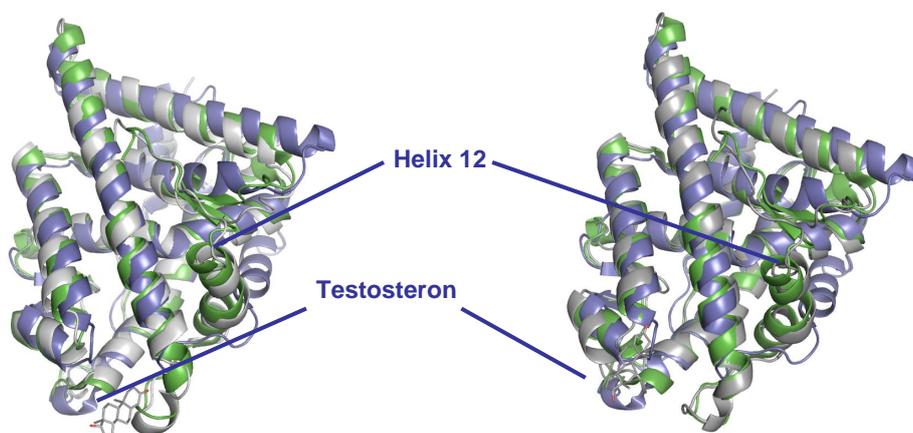
**Abbildung 7.5:** Vergleich der für den Testosteronaustritt ermittelten Kraftprofile entlang der 5 verschiedenen Pfade A-E.



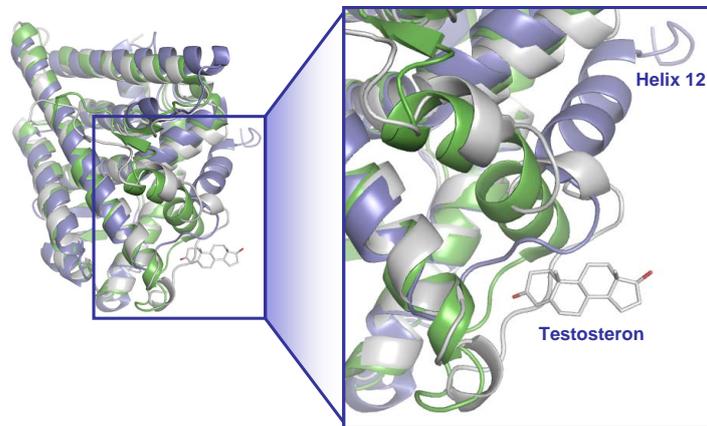
**Abbildung 7.6: SMD-Simulation nach Pfad A:** Snapshot nach 1000 ps SMD-Simulation (silber) im Vergleich mit den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).



**Abbildung 7.7: SMD-Simulation nach Pfad B:** Snapshot nach 900 ps SMD-Simulation (silber) im Vergleich mit den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).

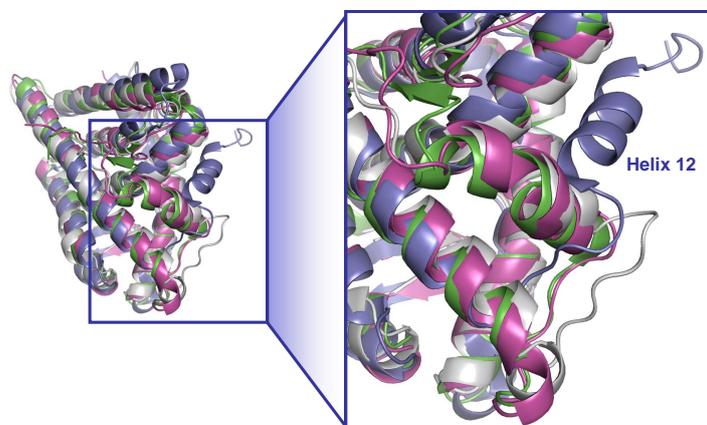


**Abbildung 7.8: SMD-Simulation nach Pfad C und D:** Snapshots aus den SMD-Simulationen (silber) im Vergleich mit den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation): *Links:* nach 800 ps nach Pfad C; *Rechts:* nach 650 ps nach Pfad D.



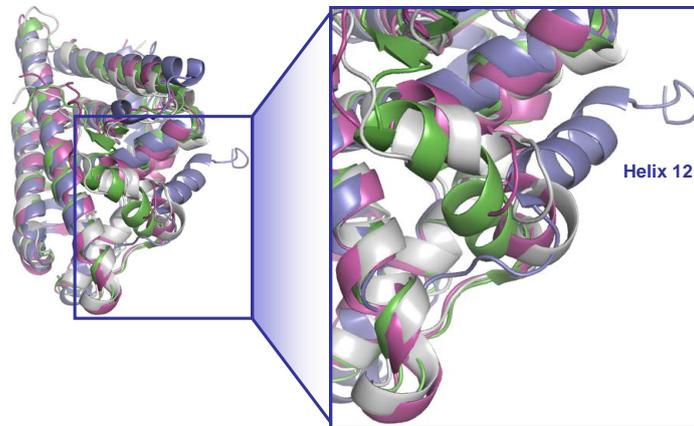
**Abbildung 7.9: SMD-Simulation nach Pfad E:** Snapshot nach 800 ps SMD-Simulation (silber) im Vergleich mit den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).

Bei dem Testosteronaustritt entlang Pfad A, B und E konnte zumindest eine teilweise Konformationsänderung in Helix 12 hin zu einer offenen, antagonistischen und noch nicht röntgenkristallografisch ermittelten Struktur beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde in diesen Fällen den SMD-Simulationen eine klassische MD-Simulation nachgeschaltet, um einen möglichen weiteren Übergang von Helix 12 von der geschlossenen in die offene Konformation zu klären und nach der Nicht-Gleichgewichts- und kraftinduzierten Ligandenentfernung aus der Bindetasche eine Equilibrierung des Systems zu ermöglichen. Die der SMD-Simulation nach Pfad A nachgeschaltete MD ist 12 ns lang. Startstruktur ist der Snapshot nach 1000 ps, welcher in Abb. 7.6 abgebildet ist. Der Ligand Testosteron liegt nach wie vor im System vor, behindert aber bei genauer Betrachtung die Bewegung von Helix 12 nicht. Abb. 7.10 zeigt das Ergebnis nach 12 ns Simulation. Eine vollständige Rückrelaxation in die ursprüngliche Form von Helix 12 ist ersichtlich.



**Abbildung 7.10: Klassische MD-Simulation nach Beschreiten des Pfades A:** Snapshot nach 12 ns klassischer MD-Simulation (pink) im Vergleich mit dem Snapshot nach 1000 ps SMD-Simulation (silber, MD-Startstruktur) und den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).

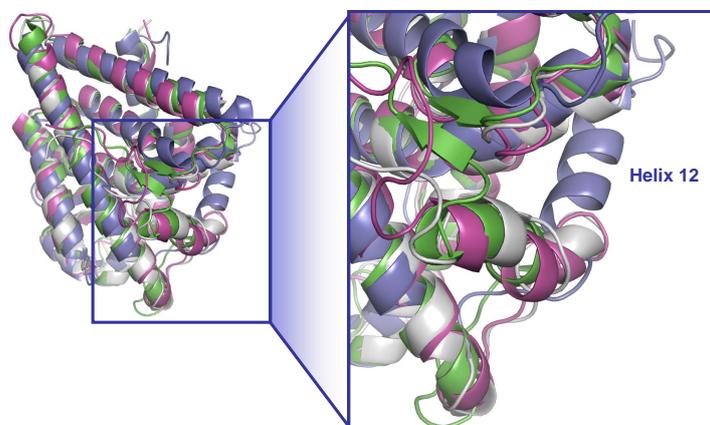
Die klassische MD-Simulation nach Ligandentfernung gemäß Pfad B wurde ebenfalls 12 ns lang ausgeführt. Startstruktur ist der Snapshot nach 900 ps SMD, wobei auch hier Testosteron noch zugegen ist. Da im vorhergehenden Fall eine vollständige Rückrelaxation beobachtet wurde, wird hier versucht dies zu verhindern, indem ein zusätzliches harmonisches Potential ( $k=1 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$ ) auf alle Atome der Reste Pro 892-Ile 899 gesetzt wird, die Teil von Helix 12 sind und den Bereich umfassen, der bereits in der Antagonist-ähnlichen Konformation liegt. Allerdings nähert sich der restliche Bereich von Helix 12, auf den nach wie vor kein zusätzliches Potential angewandt wird, auch nach 12 ns nicht einer möglichen offenen Konformation an, sondern bleibt in der in Abb. 7.11 (pink) gezeigten stabilen Konformation.



**Abbildung 7.11: Klassische MD-Simulation nach Beschreiten des Pfades B:** Snapshot nach 12 ns klassischer MD-Simulation (pink) im Vergleich mit dem Snapshot nach 900 ps SMD-Simulation (silber, MD-Startstruktur) und den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).

Eine weitere klassische MD-Simulation wurde ausgehend von der nach Pfad E erhaltenen Struktur nach 800 ps SMD gestartet. Dabei wurde der Ligand Testosteron allerdings vor der 4 ns langen klassischen MD-Simulation aus dem System entfernt. Der entstandene Hohlraum sollte in einer nachgeschalteten 100 Schritt „conjugate gradient“ Minimierung verschlossen werden. Ein zusätzliches harmonisches Potential ( $k=1 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ ) wird diesmal auf nur zwei Atome im System gesetzt, um artifizielle Kräfte auf das System geringer zu halten: Die  $C\alpha$ -Atome der Aminosäuren Pro 893 und Glu 894, welche am N-terminalen Ende von Helix 12 liegen und die ausgeprägteste Tendenz in Richtung einer offenen Konformation zeigen.

Die in Abb. 7.12 gezeigte Endstruktur (pink) zeigt aber auch hier keine größere Änderung der Orientierung von Helix 12. Auch hier scheint Helix 12 einen stabilen Zustand gefunden zu haben.

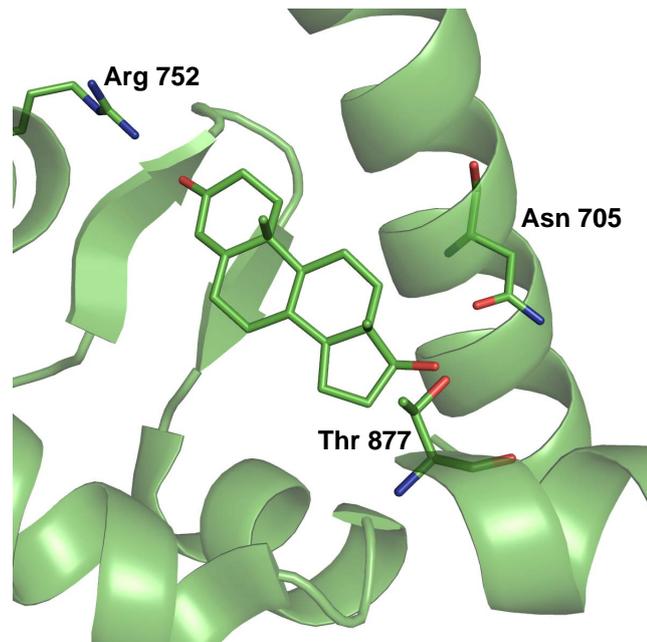


**Abbildung 7.12: Klassische MD-Simulation nach Beschreiten des Pfades E:** Snapshot nach 4 ns klassischer MD-Simulation (pink) im Vergleich mit dem Snapshot nach 800 ps SMD-Simulation (silber, MD-Startstruktur) und den Kristallstrukturen der AR LBD (2am9, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).

Der Einfluss des Ligandenaustritts auf Helix 12 ist durch diese SMD-Studien insgesamt als eher gering einzuschätzen. Auch nachfolgende klassische MD-Simulationen zeigen keinen eindeutigen Übergang zwischen den beiden Hauptkonformationen der NR. Allerdings sollen aus den Testosteronaustrittsmöglichkeiten Rückschlüsse auf strukturell wichtige Ereignisse des Vorgangs der Ligandenbindung gewonnen werden. Aus diesem Grund werden die SMD-Simulationen entlang zweier Pfade im Folgenden näher beleuchtet werden. Aufgrund des ermittelten Kraftprofils in Kombination mit der visuellen Inspektion wurde entschieden, Pfad B und Pfad E vorzustellen, da diese beiden die ausgeprägteste Annäherung an eine offene Konformation von Helix 12 und damit die größten strukturellen Veränderungen aufweisen. Für eine Auswertung in Hinblick auf die inhärente Mikro- und Makro-Flexibilität erscheinen diese als am aussagekräftigsten. Zugleich zeigen die Kraftprofile für diese beiden Wege den höchsten Peak, welcher mit einer Verschiebung von Helix 12 in Zusammenhang gebracht werden kann.

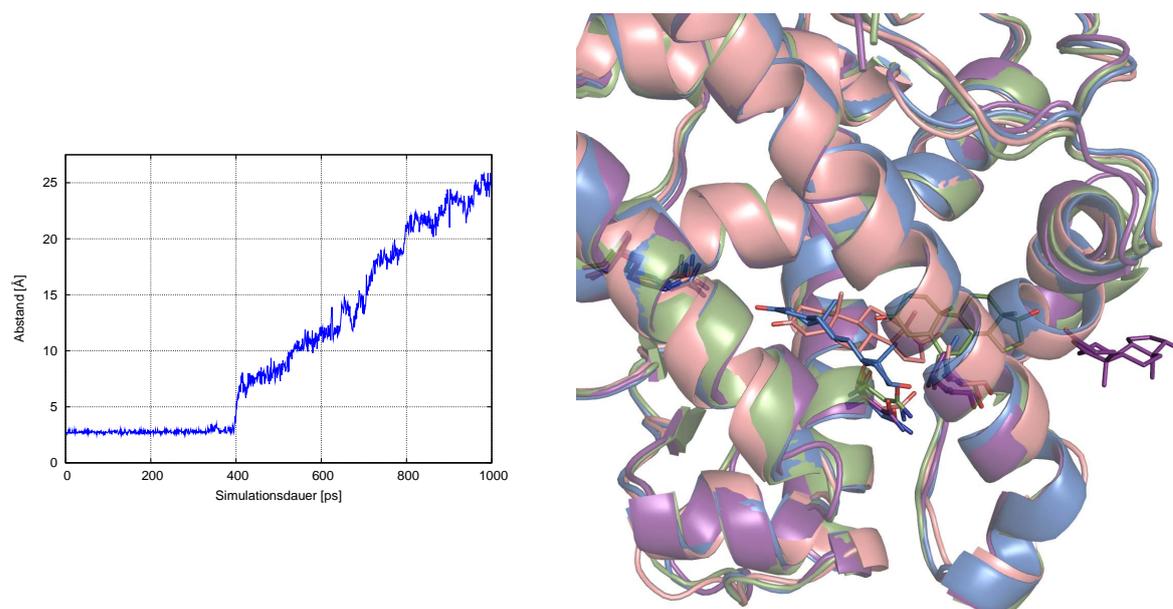
### 7.1.2.1 Pfad B

Der Austritt des Testosterons führt entlang dieses Pfades zu einem Peakmaximum im Kraftprofil von 1200 pN bei ca. 400 ps Simulationsdauer (siehe Abb. 7.5 in rot). Dieses Peakmaximum ist auf einen Bruch aller drei H-Brücken in der LBD Tasche zurückzuführen, welche den Liganden dort fixieren und in Abb. 7.13 gezeigt sind.



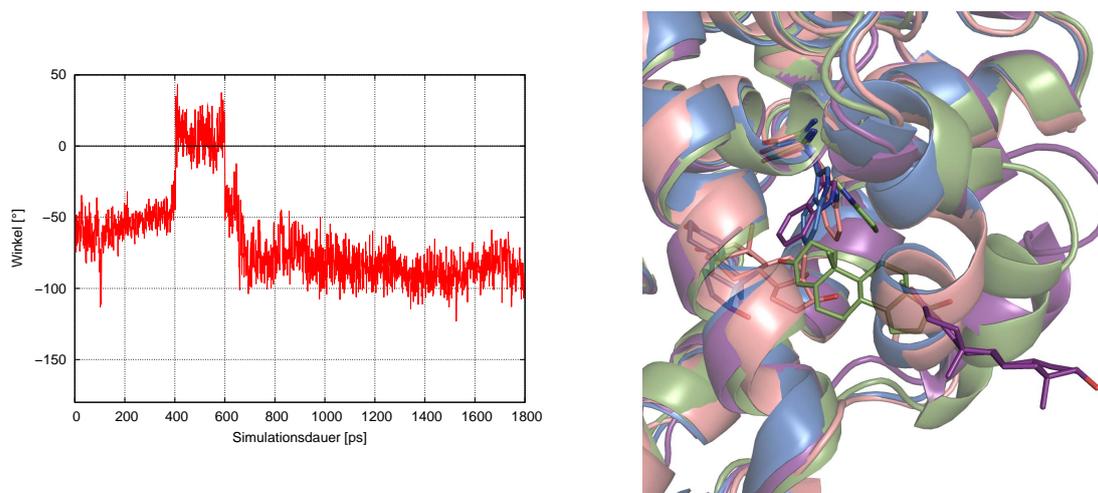
**Abbildung 7.13:** Darstellung der drei H-Brücken zwischen Asn 705, Arg 752, Thr 877 und Testosteron in der AR LBD.

Die Auswertungen der Simulation zeigen ein sukzessives Ansteigen des Abstandes zwischen der Carbonylgruppe im Testosteron und Arg 752, der bei 200 ps bereits einen Wert von 5 Å erreicht hat und einen endgültigen und rapiden Bruch der beiden H-Brücken, die von der Proteinumgebung (Asn 705 und Thr 877) zum gegenüberliegenden Ende des Steroidgerüsts, nämlich der Hydroxylgruppe in C 17 Position, ausgebildet werden. Diese brechen nach 400 ps und somit ist ein fundamentales Hindernis des Austrittes überwunden. Abb. 7.14 zeigt repräsentative Snapshots sowie die drei entscheidenden Aminosäuren der H-Brückenbildung mit Testosteron als Stabmodell.



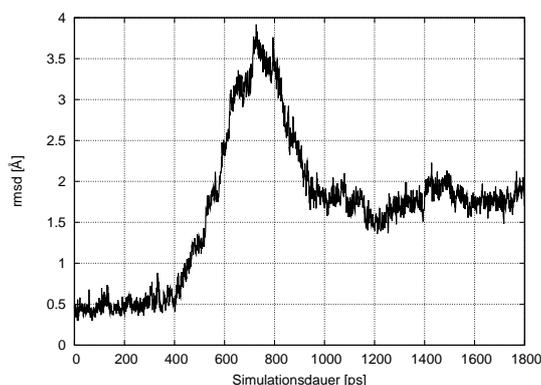
**Abbildung 7.14:** Bruch des H-Brückennetzwerkes nach Pfad B: *Links:* Abstand zwischen Hydroxyl-O von Testosteron und dem Seitenketten-Carbonyl-O von Asn 705; *Rechts:* Bruch des H-Brückennetzwerkes um Testosteron: Repräsentative Snapshots nach 200 (blau), 400 (lachsfarben), 600 (grün) und 800 (violett) ps SMD-Simulation, Testosteron, Arg 752, Asn 705 und Thr 877 als Stabmodell.

Bei Betrachtung des Kraftprofils fällt außerdem ein Plateau zwischen 400 und 600 ps Simulationsdauer auf. Genauere strukturelle Analysen der Testosteron bei seinem Austritt flankierenden Aminosäuren geben den Grund dafür preis. Im Zuge des fortschreitenden Ligandenaustritts öffnet Trp 741 zwischen 400 und 600 ps durch Änderung seines  $\chi_2$ -Winkels nach und nach einen Kanal, entlang welchem Testosteron ins Solvens entweicht. Somit übernimmt diese Aminosäure die Aufgabe eines „gate-keepers“. Abb. 7.15 zeigt die Veränderungen in der Orientierung des Indolringes von Trp 741. Bei 600 ps zeigt der Rest die maximale Auslenkung von seiner ursprünglichen Position und der Weg für Testosteron ist freigegeben. Im Anschluss sinkt folglich die Kraft auf das SMD-Atom und Trp rotiert zurück und verschließt den Weg wieder.



**Abbildung 7.15:** „Gate-keeper“ Funktion von Trp 741: *Links:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 741; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach 200 (blau), 400 (lila), 600 (grün) und 800 (violett) ps SMD-Simulation, Testosteron und Trp 741 als Stabmodell.

Die in Abb. 7.7 beobachtete Bewegung in Helix 12 wurde durch Berechnung des  $C\alpha$ -RMSD-Wertes der Aminosäuren Pro 892- Leu 907 dieser Helix ergänzt und ist in Abb. 7.16 abgebildet. Diese bestätigt durch deutlich erhöhte RMSD-Werte zwischen 500 und 1000 ps entschiedene Änderungen in dieser. Das Maximum liegt knapp nach 700 ps, kurz nachdem Testosteron das durch Trp 741 gebildete Tor passiert hat.



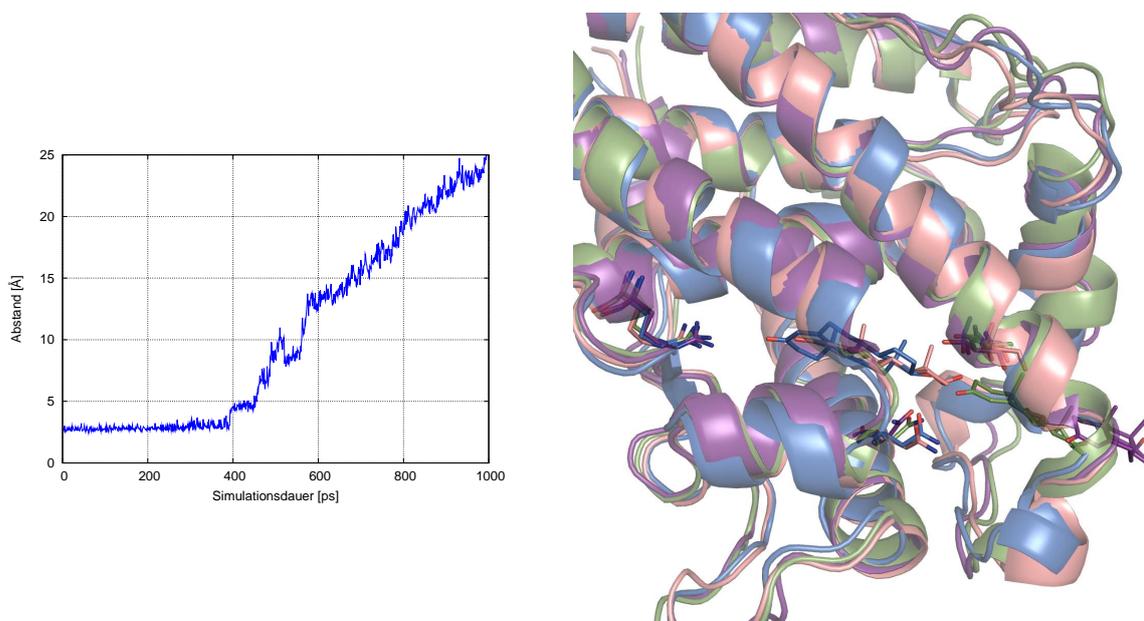
**Abbildung 7.16:**  $C\alpha$ -RMSD Werte von Helix 12 entlang Pfad B relativ zur Startstruktur nach 600 ps initialer SMD zur Öffnung des  $\beta$ -Faltblattes.

Für den Testosteronaustritt entlang dieses Pfades wurde also Trp 741 als „gate-keeper“ identifiziert, durch welches Testosteron die LBD verlassen kann.

## 7.1.2.2 Pfad E

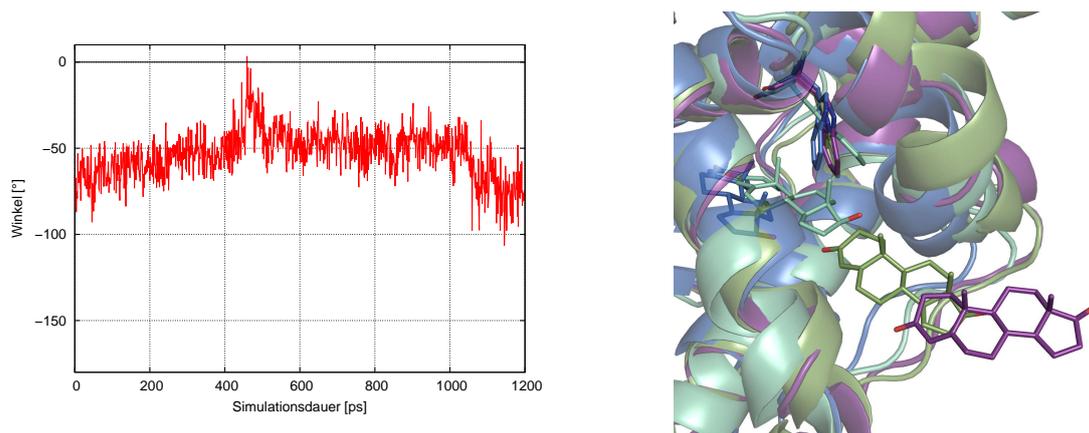
Der für die Testosteronbewegung entlang dieses Pfades ermittelte Vektor zieht das Steroidmolekül in ähnlicher Orientierung wie Pfad B aus der LBD Tasche und direkt auf Helix 12 hin. Bereits die visuelle Inspektion des Snapshots nach 800 ps SMD-Simulation in Abb. 7.9 zeigt eine Verschiebung der Helix nach erfolgtem Austritt des Liganden. Hier soll nun das erhaltene Ergebnis strukturell analysiert werden.

Genau wie im Falle von Pfad B zeigt das Kraftprofil in Abb. 7.5 (blau) ein Peakmaximum bei ca. 400 ps und 1200 pN, welches in dem Bruch dreier H-Brücken zwischen Testosteron und Asn 705, Arg 752 und Thr 877 begründet liegt. Die nachfolgende Abbildung Abb. 7.17 veranschaulicht den Bruch der H-Brücke zwischen Asn 705 und Testosteron. Aufgetragen wird hier der Abstand zwischen dem Hydroxylsauerstoffatom von Testosteron und dem Seitenketten-Carbonylsauerstoffatom von Asn 705. Dieser Abstandsplot soll als repräsentativ für die beiden anderen H-Brücken verstanden werden, die ebenfalls nach ca. 400 ps brechen.



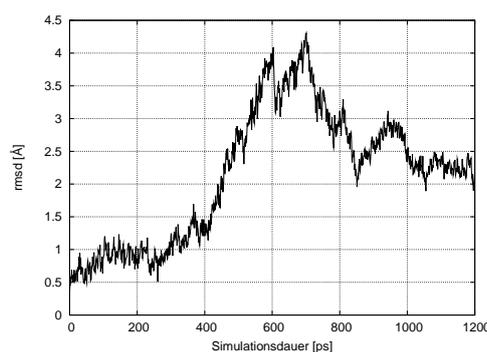
**Abbildung 7.17:** Bruch des H-Brückennetzwerkes nach Pfad E: *Links:* Abstand zwischen Hydroxyl-O von Testosteron und dem Seitenketten-Carbonyl-O von Asn 705; *Rechts:* Bruch des H-Brückennetzwerkes um Testosteron: Repräsentative Snapshots nach 200 (blau), 400 (lachs), 600 (grün) und 800 (violett) ps SMD-Simulation, Testosteron, Arg 752, Asn 705 und Thr 877 als Stabmodell.

Die gewählte Richtung der Bewegung von Testosteron führt auch hier wie in Pfad B zu einer Veränderung des  $\chi_2$ -Winkels an Trp 741. Allerdings ist hier das Zeitfenster sowie das Ausmaß der Öffnung des durch seine Drehung zugänglichen Kanals viel geringer (siehe Abb. 7.18). Ebenso ist auch die dem Peakmaximum bei 1200 pN angeschlossene Schulter weniger ausgeprägt als bei Pfad B und erstreckt sich nur über 100 ps, liegt aber auch hier bei 600 pN.



**Abbildung 7.18:** Gate-Keeper Funktion von Trp 741: *Links:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 741; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach 200 (blau), 460 (cyan), 600 (grün) und 800 (violett) ps SMD-Simulation, Testosteron und Trp 741 als Stabmodell.

Auch hier ergeben sich erhöhte  $C\alpha$ -RMSD Werte für die Aminosäuren (Pro 892- Leu 907) von Helix 12 relativ zur SMD-Simulationsstartstruktur (Abb. 7.19). Der zugehörige Peak ist hier breiter als bei Pfad B.



**Abbildung 7.19:**  $C\alpha$ -RMSD Werte von Helix 12 relativ zur Startstruktur nach 600 ps initialer SMD zur Öffnung des  $\beta$ -Faltblattes.

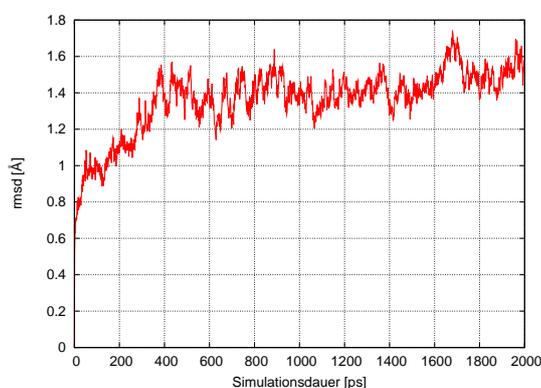
Durch diese zweite Simulation wird die „gate-keeper“ Funktion von Trp 741 bestätigt.

## 7.2 Estrogenrezeptor

### 7.2.1 Methode

Ausgangspunkt der SMD-Simulationen war im Falle des Estrogenrezeptors die LBD, in welche der natürliche Agonist Estradiol bindet (PDB-Code 1ere).

Wie im Falle des in Abschnitt 7.1 besprochenen Androgenrezeptors erfolgte auch hier die Vorbereitung des Komplexes mit dem Programmpaket AMBER 10.0 [311]. Dabei wurde der Solvatisierung eine 10000 Schritt lange „steepest descent“ Minimierung vorgeschaltet, um ein stabiles System zu erhalten. Nach Addition von 6 Gegenionen wurde eine 2 ns lange Equilibrierungsphase des solvatisierten Rezeptor-Liganden-Komplexes unter konstantem Druck und konstanter Temperatur von 300 K gestartet. Abb. 7.20 zeigt die  $C\alpha$ -RMSD-Werte des Systems im Verlauf dieser Vorbereitungsphase: Am Ende der 2 ns ist ein stabiler Zustand erreicht. Dieser ist Ausgangspunkt für zwei SMD-Simulationen, die Estradiol in verschiedene Richtungen aus der LBD entfernen. Diesen wurde jeweils noch 100 Schritte „conjugate gradient“ Minimierung vorangeschaltet. Dabei sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob mit Hilfe der SMD die bekannten ago- und antagonistischen Konformationen des ERs ineinander überführbar sind. Darüber hinaus kann analysiert werden, wie dieser Rezeptor im Vergleich zum AR auf eine derartige Störung reagiert und ob auch hier der Effekt auf die Helix 12 Orientierung eher gering ist. Alle SMD und MD-Simulationen wurden mit NAMD 2.6 [37] berechnet.



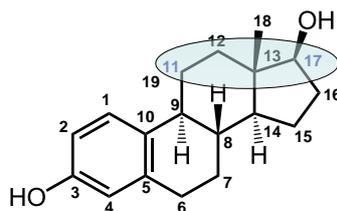
**Abbildung 7.20:**  $C\alpha$ -RMSD Werte bezogen auf die Kristallstruktur 1ere im Verlauf der Equilibrierung des Systems.

**Tabelle 7.2:** Überblick über die in den SMD-Simulationen gewählten Vektoren des Estradiolaustritts.

Pfad	C $\alpha$ -Atom von Rest	SMD Atom in Estradiol
Pfad A	Arg 412	C 17
Pfad B	Leu 541*	C 11

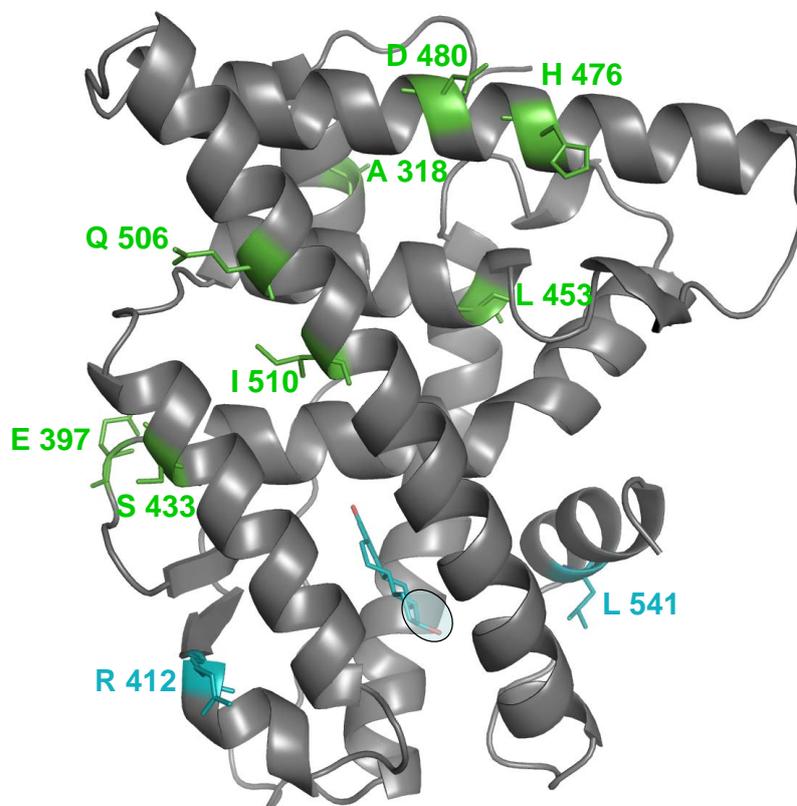
\* für Pfad B wurde der resultierende Vektor invertiert

Die gewählten Richtungen des Ligandenaustritts sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst. Die beiden Pfade sind so gewählt, dass Estradiol die Bindetasche in jenen Richtungen verlässt, die im Falle des Testosteronaustritts aus der AR LBD zu den vielversprechendsten Resultaten führten und dort als Pfad B und Pfad E bezeichnet wurden. Abb. 7.21 zeigt die Nomenklatur der Atome im Steroidgerüst von Estradiol ergänzend zu Tabelle 7.2.



**Abbildung 7.21:** Nomenklatur der Atome im Estradiolgerüst, SMD-Atome in blau.

Die SMD-Simulationen wurden auch hier mit konstanter Geschwindigkeit von  $0.025 \text{ \AA}/\text{ps}$  und einer Kraftkonstanten von  $3 \text{ kcal/mol/\AA}^2$  in einem NPT-Ensemble mit Langevin-Dynamik durchgeführt. Die mit zusätzlichem harmonischem Potential ( $k=1 \text{ kcal/mol/\AA}^2$ ) bedachten Aminosäuren sind hier Ala 318, Glu 197, Ser 433, Leu 453, His 476, Asp 480, Gln 506 und Ile 510. Die nachfolgende Abb. 7.22 zeigt den ER, wobei diese Reste in grün hervorgehoben sind. Die beiden Aminosäuren, deren C $\alpha$ -Atome zur Richtungsbestimmung herangezogen wurden, sind in blau dargestellt.

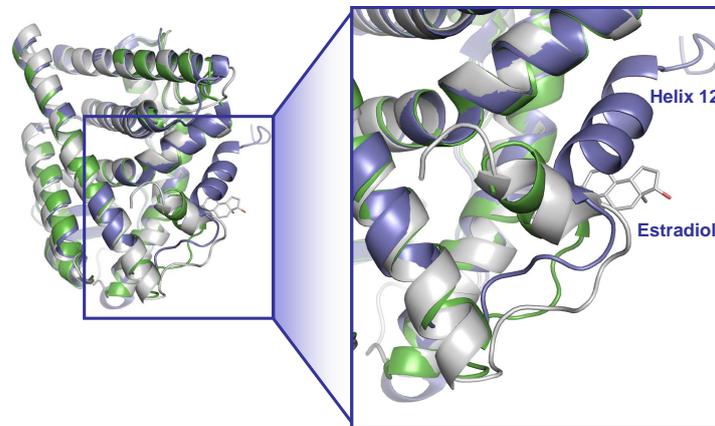


**Abbildung 7.22:** ER LBD als Cartoon-Darstellung: Gewählte Aminosäuren mit zusätzlichem harmonischem Potential (grün) und zur Richtungsbestimmung (blau) als Stabmodell.

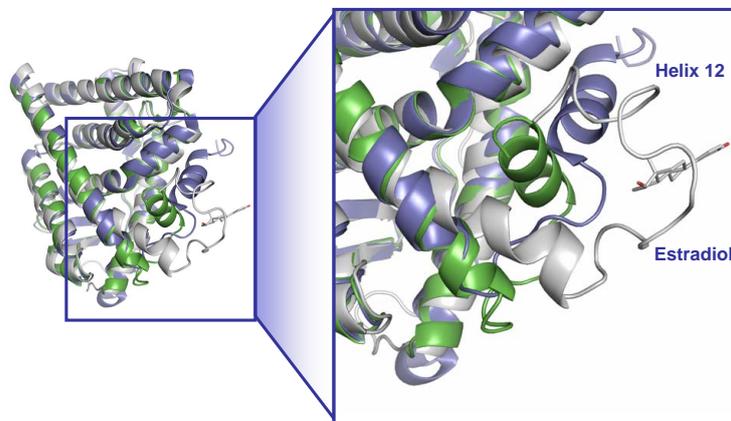
## 7.2.2 Resultate

Wie im Falle des Androgenrezeptors wurde hier zunächst und in besonderem Maße die Bewegung von Helix 12 im Zuge des Fortschreitens der Ligandenbewegung betrachtet. Während sich beim Androgenrezeptor nur leichte Veränderungen ihrer Orientierung bei drei der fünf vorgestellten Pfade ergaben, wird hier im Falle eines Ligandenaustritts gemäß Pfad B eine nicht zu vernachlässigende Veränderung im Bereich von Helix 11 und Helix 12 beobachtet (siehe Abb. 7.24). Pfad A hingegen zeigt diesen Effekt nicht (7.23). Die Kraftprofile entlang beider Wege sind in Abb. 7.25 vorgestellt und zeigen ein bei Pfad B höheres Peakmaximum, was mit der Änderung der Rezeptorstruktur als Antwort auf den Ligandenaustritt in Zusammenhang gebracht werden kann.

Auch hier wurde der vielversprechenderen SMD-Simulation entlang Pfad B eine klassische MD-Simulation nachgeschaltet, um einen möglichen weiteren Übergang von Helix 12 von der geschlossenen in die offene Konformation zu beobachten und eine Equilibrierung des

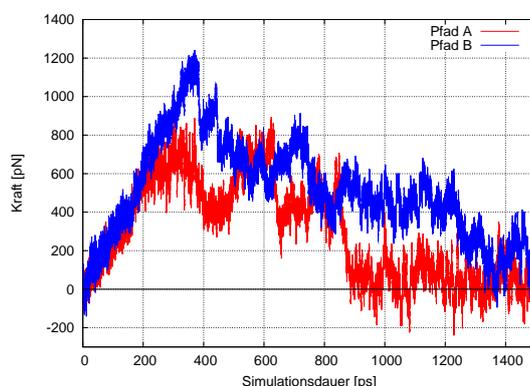


**Abbildung 7.23: SMD-Simulation nach Pfad A:** Snapshot nach 900 ps SMD-Simulation (silber) im Vergleich mit den Kristallstrukturen der ER LBD in geschlossener (1ere, grün) und offener (1xpc, violett) Konformation.



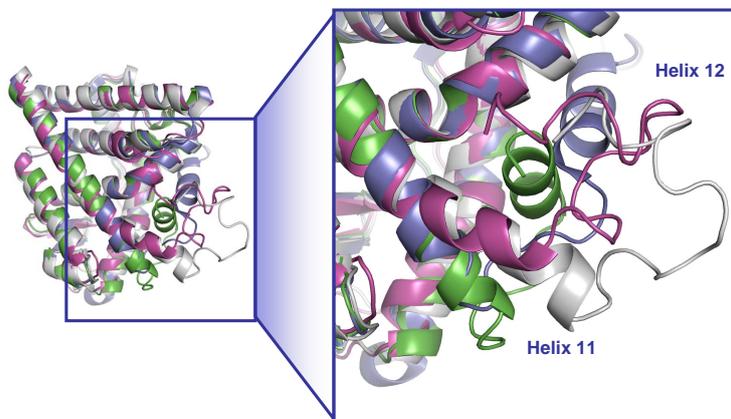
**Abbildung 7.24: SMD-Simulation nach Pfad B:** Snapshot nach 1300 ps SMD-Simulation (silber) im Vergleich mit den Kristallstrukturen der ER LBD in geschlossener (1ere, grün) und offener (1xpc, violett) Konformation.

Systems herbeizuführen. Das Ergebnis dieser 4 ns langen Simulation zeigt Abb. 7.26. Als Startpunkt diente hier die Struktur nach 1300 ps SMD-Simulation, aus welcher Estradiol entfernt wurde. Der entstandene Hohlraum verschwindet im Verlaufe einer nachgeschalteten „conjugate gradient“ Minimierung (100 Schritte), die der 4 ns Simulation vorangeht.



**Abbildung 7.25:** Vergleich der für den Estradiolaustritt ermittelten Kraftprofile entlang der 2 verschiedenen Pfade: Pfad A (rot) und Pfad B (blau).

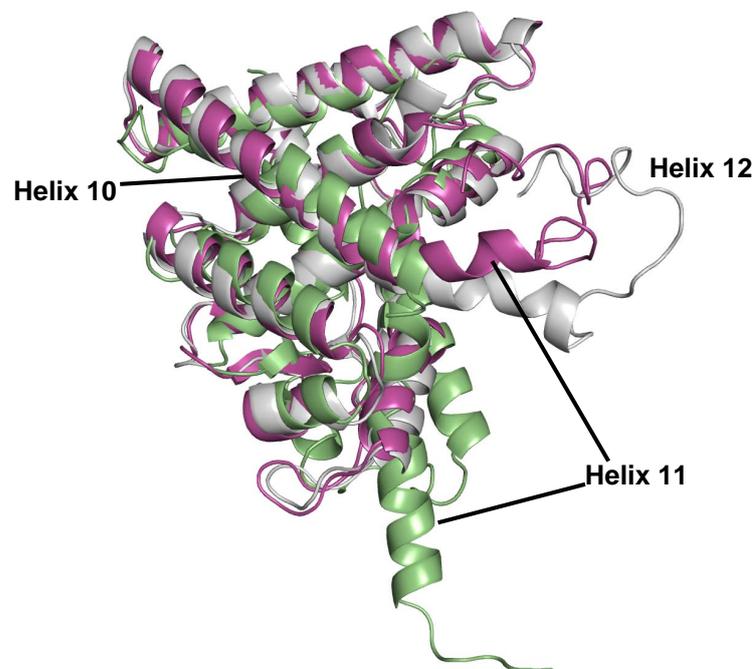
Im Verlauf dieser bleibt Helix 11 geknickt und Helix 12 windet sich weiter auf. Nur die Endstruktur dieser MD-Simulation wird in Abb. 7.26 gezeigt, während die vorangehende SMD im Abschnitt „Pfad B“ strukturell analysiert wird.



**Abbildung 7.26: Klassische MD-Simulation nach Pfad B:** Snapshot nach 4 ns klassischer MD-Simulation (pink) im Vergleich mit dem Snapshot nach 1300 ps SMD-Simulation (silber, MD-Startstruktur) und den Kristallstrukturen der ER LBD (1ere, grün, geschlossene Konformation) und ER LBD (1xpc, violett, offene Konformation).

Da Estradiol die Tasche verlassen hat bzw. in der nachgeschalteten MD nicht mehr in dem System gegenwärtig war und einschneidende Veränderungen in und um Helix 12 beobachtet werden konnten, wird der erhaltene Zustand mit der Liganden-freien Apo-RXR $\alpha$  1lbd

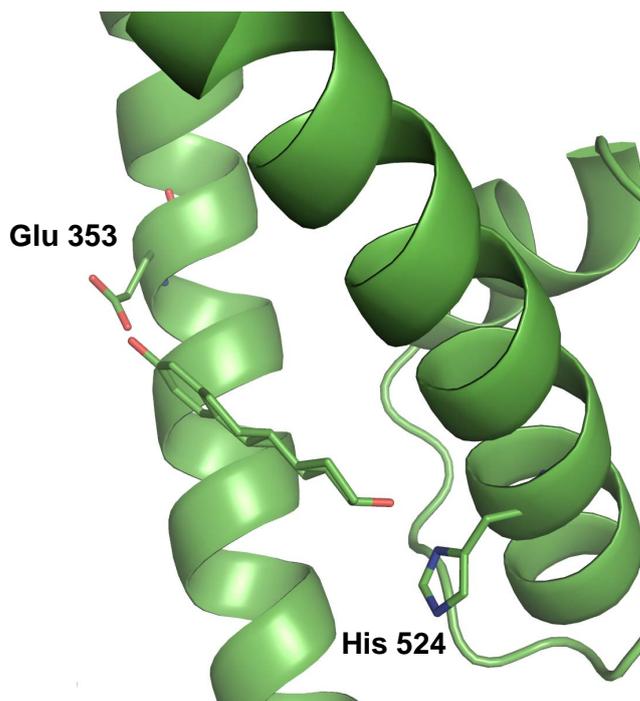
Kristallstruktur verglichen. Der RXR $\alpha$  Rezeptor gehört zwar einer anderen Klasse der NR-Superfamilie an, wird aber aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen allen NR-Klassen dennoch für den Vergleich hier herangezogen (siehe Abb. 7.27). Interessanterweise liegt gerade in dem Bereich, wo in Helix 11 im Zuge der SMD/MD-Studie ein Knick erkannt wurde (in pink bzw. silber), in der Apo-RXR $\alpha$  1lbd Form (hellgrün) ein Loop. Während in der Holo-Agonist-ER Form Helix 10 und Helix 11 kontinuierlich ineinander übergehen, ist dies in 1lbd nicht der Fall. Ein eingeführter Loop, der die beiden Helices voneinander trennt, lässt Helix 11, welche zugleich den C-Terminus darstellt, nach unten gebogen erscheinen. So zeigt sich zumindest ansatzweise ein analoges Verhalten zu einem weiteren Vertreter der NR Familie, indem auch hier nun Helix 10 und Helix 11 nicht entlang eines Stranges liegen, sondern beide eindeutig voneinander abgetrennt werden. Eine kristallografisch ermittelte Apo-Form des ER ist nicht bekannt.



**Abbildung 7.27: Klassische MD-Simulation nach Pfad B:** Snapshot nach 4 ns klassischer MD-Simulation (pink) im Vergleich mit dem Snapshot nach 1300 ps SMD-Simulation (silber, MD-Startstruktur) und der Kristallstruktur der Apo-RXR $\alpha$  LBD (1lbd, hellgrün).

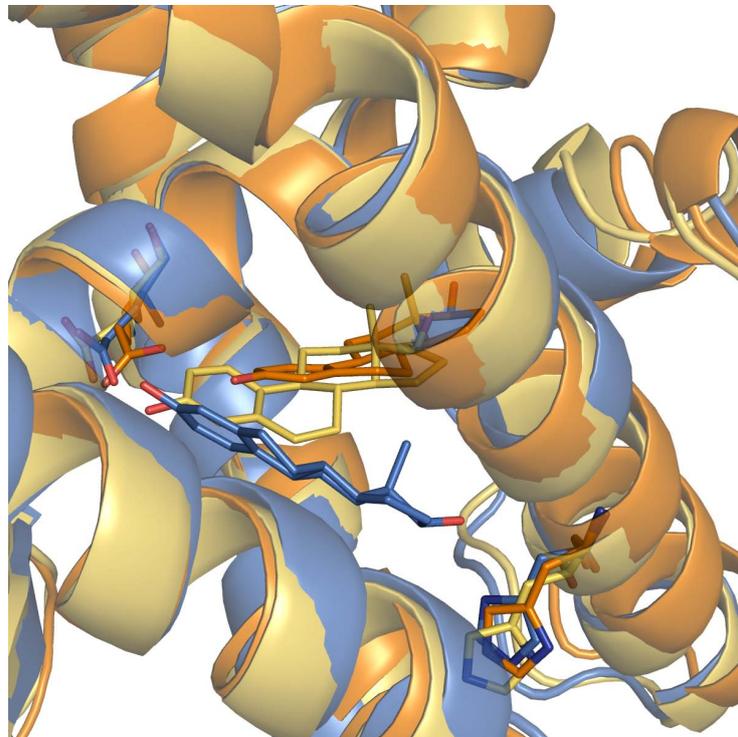
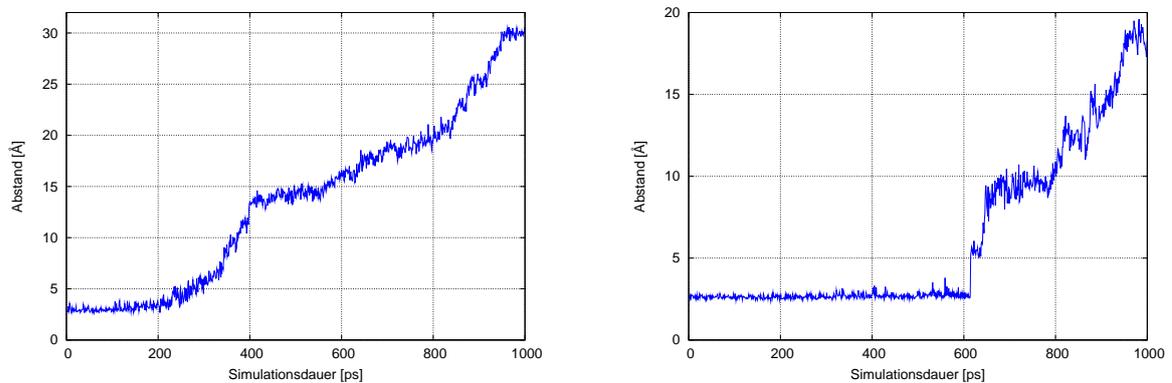
### 7.2.2.1 Pfad A

Estradiol wird in der LBD Tasche durch zwei H-Brücken fixiert. Diese liegen zwischen der Hydroxylgruppe in der 3-Position des Steroids und Glu 353, sowie zwischen jener in der 17 $\beta$ -Position und His 524. Diese müssen gebrochen werden, ehe das Molekül die Rezeptorbindetasche verlassen kann.



**Abbildung 7.28:** Darstellung der zwei H-Brücken zwischen Glu 353, His 524 und Estradiol in der ER LBD.

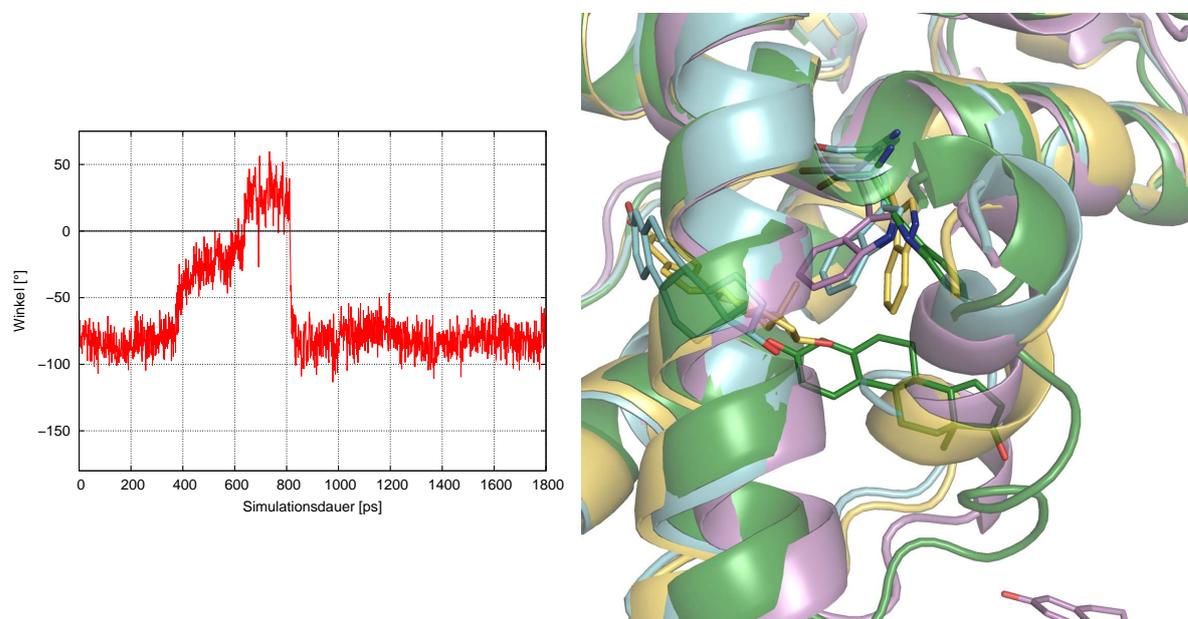
Das Kraftprofil in Abb. 7.25 zeigt eindrucksvoll auf, zu welchem Zeitpunkt der Simulation dies geschieht. Insgesamt drei Peaks sind darin erkennbar. Die ersten beiden liegen bei 300 und 600 ps, der dritte bei 800 ps. Aus den die H-Brückenlänge charakterisierenden Distanzplots in Abb. 7.29 ergibt sich eine Zuweisung der ersten beiden auf den Zeitpunkt, an dem die H-Brücken brechen. Die H-Brücke zwischen His 524 und dem Liganden ist nämlich nach 300 ps faktisch nicht mehr existent, jene ausgehend von Glu 353 nach 600 ps Simulationsdauer, also gerade in dem Bereich, in dem das Kraftprofil zwei Maxima zeigt.



**Abbildung 7.29:** Bruch des H-Brückennetzwerkes nach Pfad A: *Links:* Abstand zwischen  $17\beta$ -Hydroxyl-O von Estradiol und dem  $N\delta$ -Atom von His 524; *Rechts:* Abstand zwischen 3-Hydroxyl-O von Estradiol und dem Carboxylat-O von Glu 353; *Unten:* Repräsentative Snapshots nach 50 (blau), 400 (gelb) und 600 (orange) ps SMD-Simulation; Estradiol, His 524 und Glu 353 als Stabmodell.

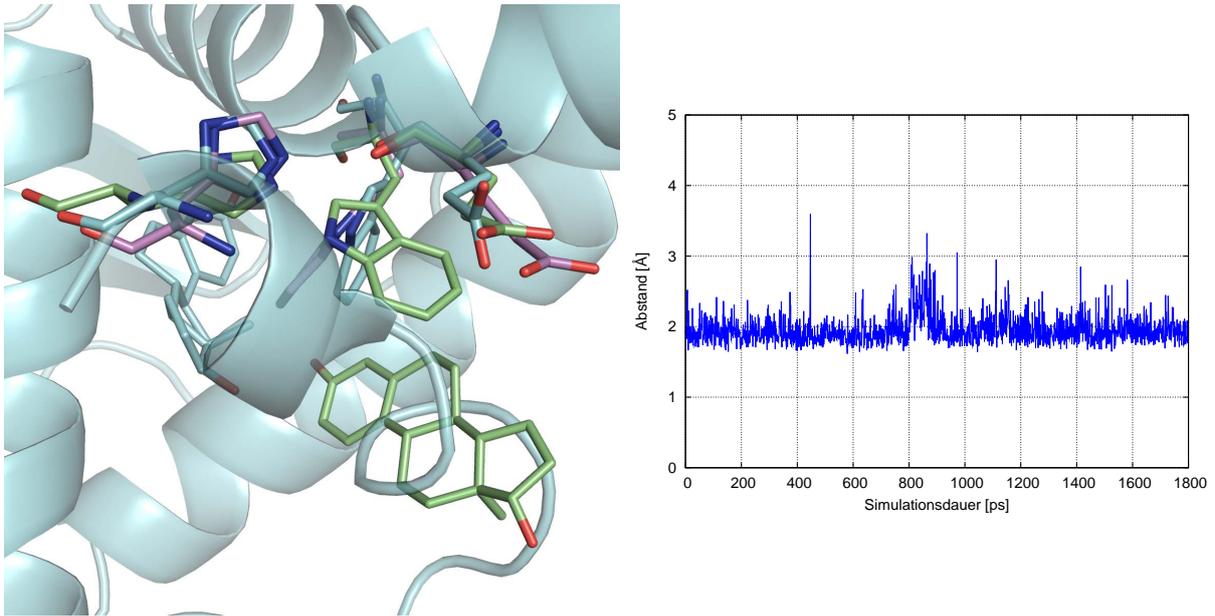
Die Ursache des dritten erkennbaren Kraftpeaks nach 800 ps liegt in der Orientierung von Trp 383 im Laufe der SMD-Simulation. Abb. 7.30 zeigt den zugehörigen  $\chi_2$ -Winkel und interessante Snapshots aus der SMD-Simulation, welche die Gate-Keeper Funktion von Trp 383 für den Ligandenaustritt hervorheben. Zwischen 700 und 800 ps zeigt Trp

383 eine maximale Auslenkung von der ursprünglichen Position, und Estradiol kann die Austrittspforte passieren, welche durch die Rotation um den Indolrest ermöglicht wird. Nachfolgend schwingt Trp sehr schnell zurück und die Kraft auf das SMD-Atom sinkt ab.



**Abbildung 7.30:** „Gate-keeper“ Funktion von Trp 383: *Links:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 383; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach 350 (cyan), 400 (gelb), 800 (grün) und 1200 (violett) ps SMD-Simulation, Estradiol und Trp 383 als Stabmodell.

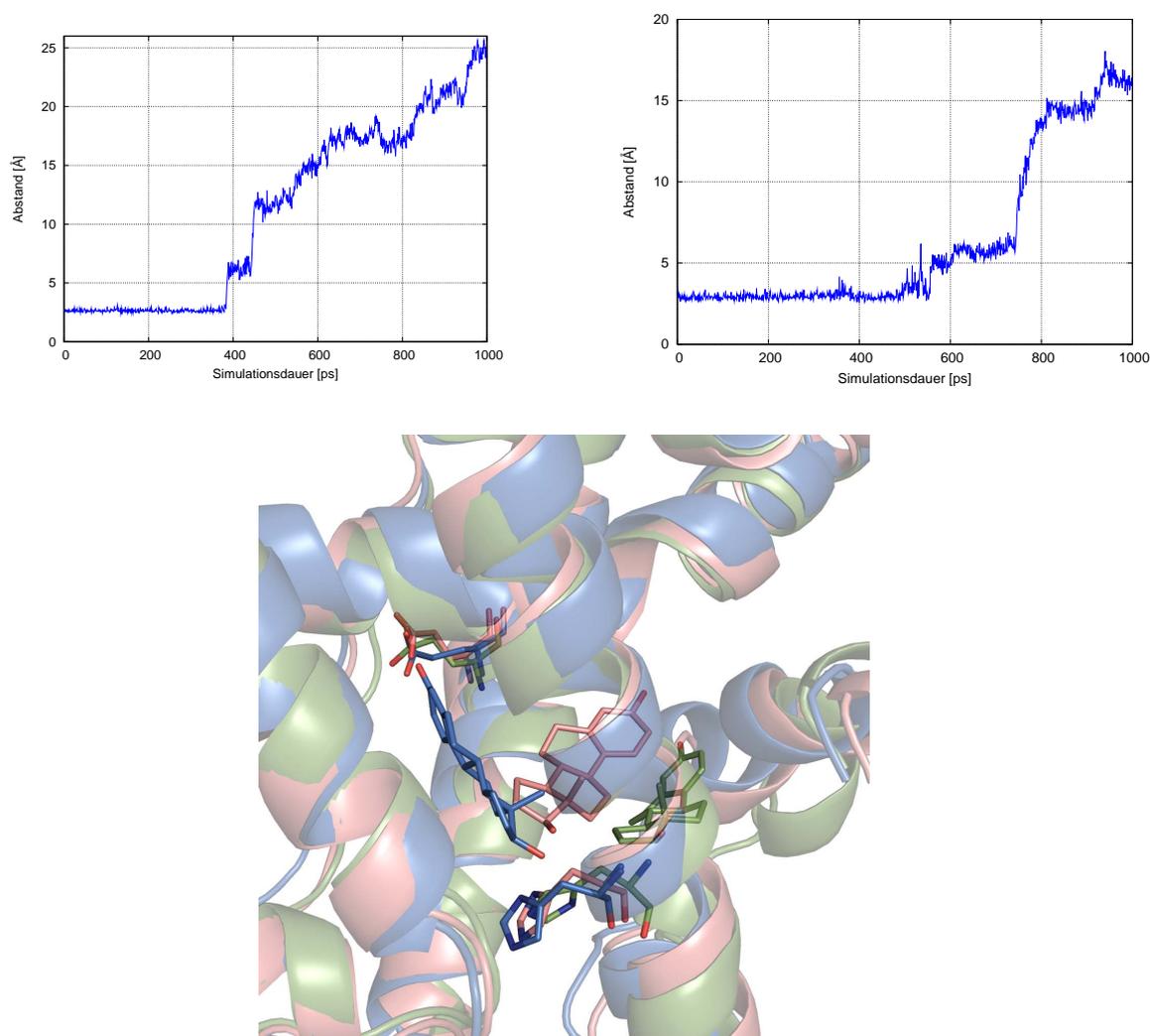
Wie bereits in Abb. 7.23 gezeigt, hat der erfolgte Austritt von Estradiol aus der LBD nahezu keinen Einfluss auf die Position von Helix 12 relativ zum Rezeptor. Trp 383 öffnet einen Kanal, durch welchen Estradiol bequem die Tasche verlassen kann, ohne Helix 12 dazu noch verschieben zu müssen. Helix 12 bleibt durch die H-Brücke zwischen Glu 380 und His 547, deren Länge über die gesamte Simulation konstant bleibt, in seiner Orientierung erhalten (Abb. 7.31) unabhängig von der Rotation von Trp 383.



**Abbildung 7.31:** *Links:* Repräsentative Snapshots des Estradiolaustritts: nach 350 (cyan), 800 (grün) und 1200 (violett) ps SMD-Simulation; Estradiol und entscheidende Aminosäuren Trp 383, Glu 380 und His 547 als Stabmodell; *Rechts:* Abstand zwischen dem Carbonyl-O-Atom von Glu 380 und Ne-Atom von His 547.

### 7.2.2.2 Pfad B

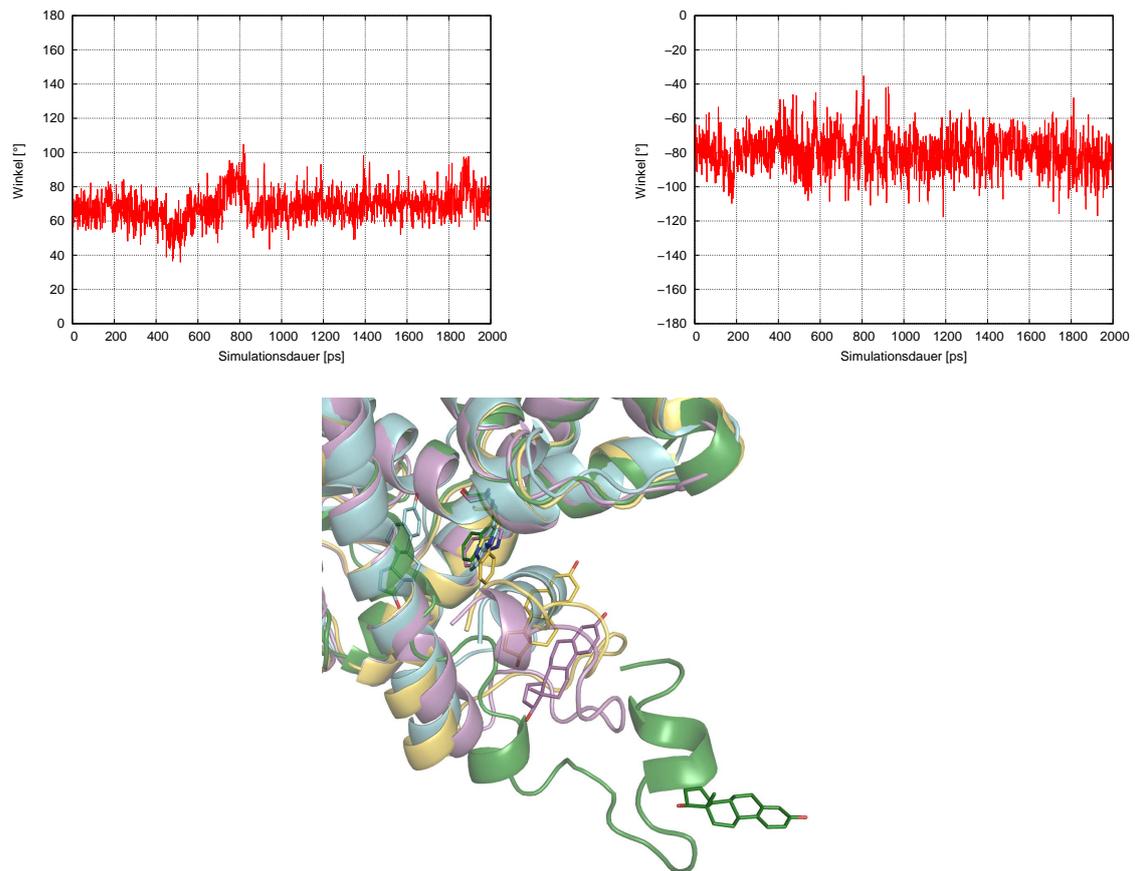
Bei der Estradiolentfernung entlang dieses Pfades sind im Kraftprofil (siehe Abb. 7.25) ebenfalls zwei Peakmaxima bei ca. 400 und 600 ps ersichtlich. Auch in diesem Fall sind diese auf einen Bruch des H-Brückennetzwerkes um Estradiol zurückzuführen, welche gerade dann brechen (siehe Abb. 7.32).



**Abbildung 7.32:** Bruch des H-Brückennetzwerkes nach Pfad B: *Links:* Abstand zwischen  $17\beta$ -Hydroxyl-O von Estradiol und dem  $N\delta$ -Atom von His 524; *Rechts:* Abstand zwischen 3-Hydroxyl-O von Estradiol und dem Carboxylat-O von Glu 353; *Unten:* Repräsentative Snapshots nach 50 (blau), 450 (orange) und 600 (grün) ps SMD-Simulation; Estradiol, His 524 und Glu 353 als Stabmodell.

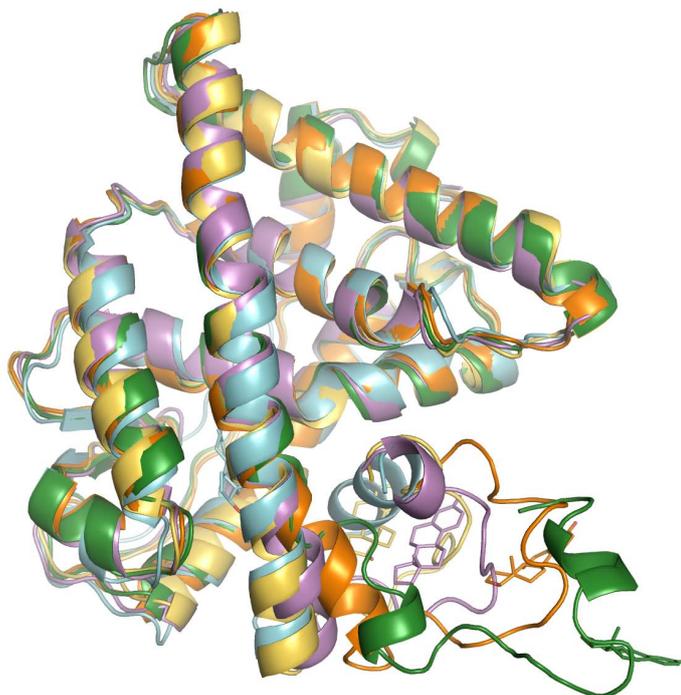
Was die „gate-keeper“ Funktion von Trp 383 betrifft, so ist diese im Falle des Ligandenaustritts entlang Pfad B nicht so stark ausgeprägt wie im vorher geschilderten Fall entlang Pfad A. Abb. 7.33 zeigt das Verhalten von Trp 383 im Verlauf der SMD-Simulation. Der  $\chi_2$ -Winkel bleibt auf einem konstanten Wert von ca.  $-80^\circ$ . Im Bereich zwischen 500 und 800 ps zeigt aber der entsprechende  $\chi_1$ -Winkel Veränderungen, was auch in dem repräsentativen Snapshot nach 800 ps in derselben Abbildung erkennbar ist. Nach 800 ps befindet sich Trp 383 in seiner ursprünglichen Position und der Ligand hat den Rest bereits passiert.

Das Kraftprofil zeigt aber nach wie vor mit 500 pN einen höheren Wert an als im Falle von Pfad A, welcher von 800 bis 1200 ps beibehalten wird. Dies ist auf eine Verschiebung der Helix 12 zurückzuführen, welche von Estradiol vor sich hergeschoben wird. Nach 1200 ps hat Estradiol das Solvens erreicht und die Kraft sinkt dementsprechend.



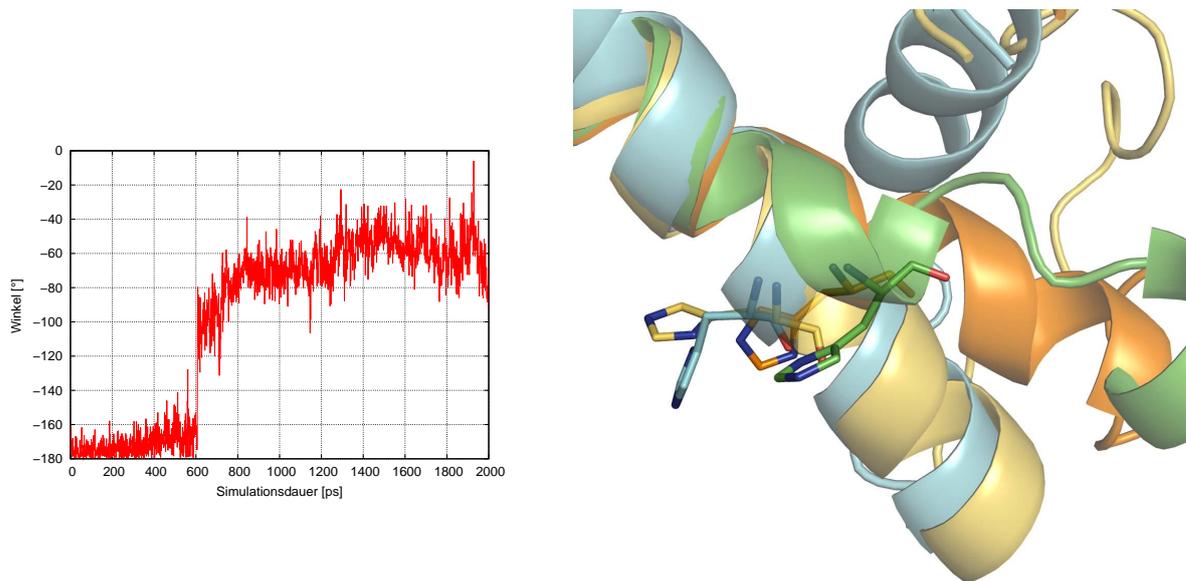
**Abbildung 7.33:** Gate-Keeper Funktion von Trp 383: *Links:*  $\chi_1$ -Winkel von Trp 383; *Rechts:*  $\chi_2$ -Winkel von Trp 383; *Unten:* Repräsentative Snapshots nach 200 (cyan), 800 (gelb), 1000 (lila) und 1600 (grün) ps SMD-Simulation, Estradiol und Trp 383 als Stabmodell.

Wie bereits im vorhergehenden Absatz erwähnt, sind hier im Gegensatz zu den Beobachtungen entlang Pfad A große Einflüsse auf die interessierende Helix 12 zu erkennen. Die nachfolgende Abb. 7.34 gibt einen Überblick über die Auswirkungen des Estradiolaustrittes auf den Rezeptor. Ganz eindeutig zeigt sich hier eine Auflösung der Helix 12 im Laufe des Fortschreitens der Ligandenbewegung und ein Einfluss auf das C-terminale Ende von Helix 11, welche abknickt.



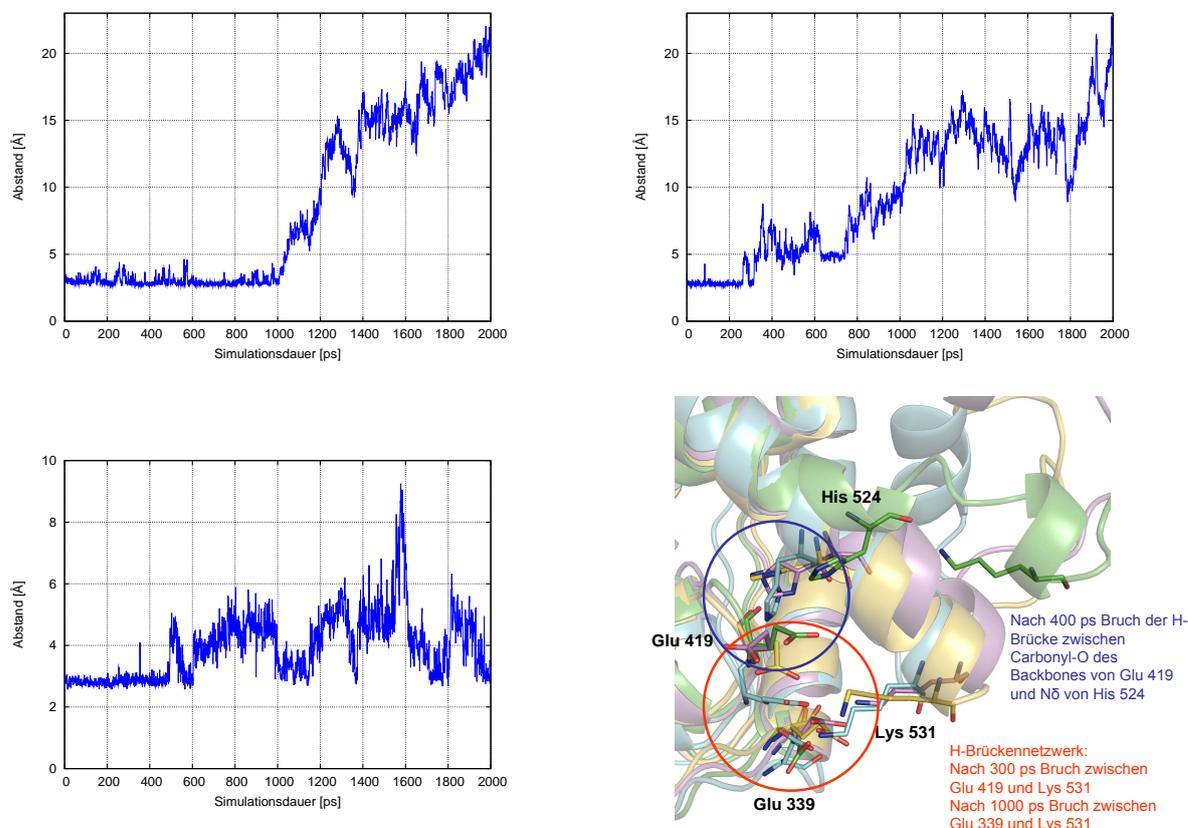
**Abbildung 7.34:** Überblick über den Ligandenaustritt: Repräsentative Snapshots nach 200 (cyan), 800 (gelb), 1000 (lila), 1250 (orange) und 1600 (grün) ps SMD-Simulation, Estradiol als Stabmodell.

Als entscheidender Rest für die Ereignisse in Helix 11 mit Konsequenzen auf Bewegungen in Helix 12 wurde His 524 identifiziert. Dieser Rest ändert nach 600 ps seinen  $\chi_1$ -Winkel von ca.  $-180^\circ$  auf  $-80^\circ$  in Folge des Bruchs seiner H-Brücke zum Liganden (siehe Abb. 7.32) und leitet dadurch ein Abknicken von Helix 11 ein (siehe Abb. 7.35).



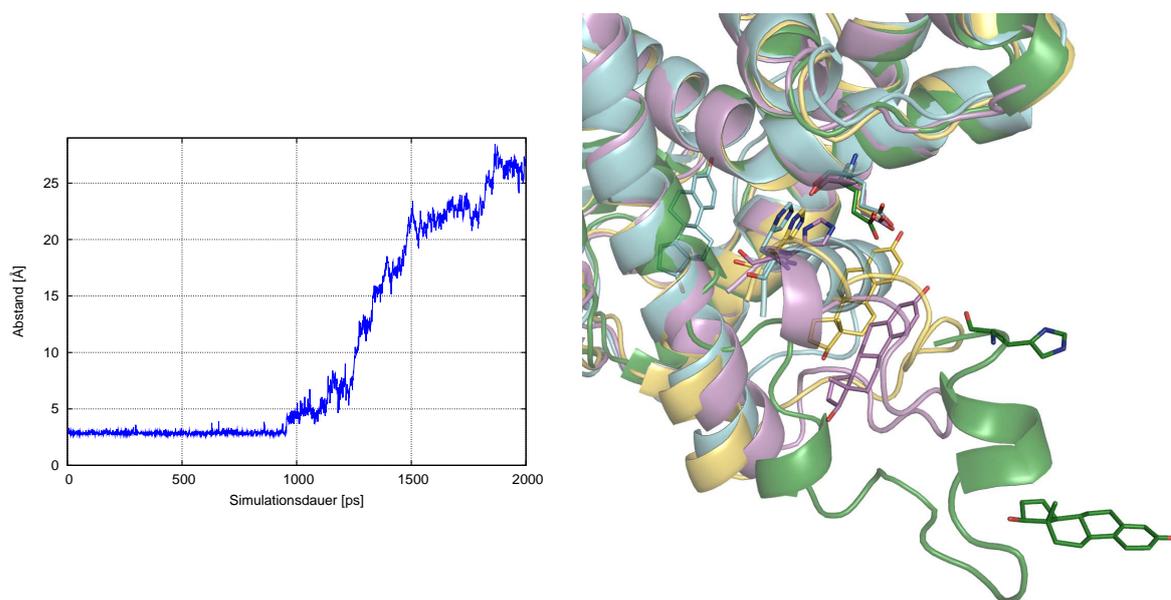
**Abbildung 7.35:** Schlüsselfunktion von His 524: *Links:*  $\chi_1$ -Winkel von His 524; *Mitte:* Snapshots nach 200 (cyan), 800 (gelb), 1250 (orange) und 1550 (hellgrün) ps; His 524 als Stabmodell.

Der Grund für die Änderung des  $\chi_1$ -Winkels am His 524 ist der Versuch die H-Brücke zum  $17\beta$ -Hydroxylsauerstoff von Estradiol so lange wie möglich beizubehalten. Im Falle von Pfad A ist dies aufgrund der von hier geringfügig abweichenden Austrittsrichtung nicht möglich (siehe Abb. 7.29). Die entsprechende H-Brücke bricht im Falle von Pfad A daher auch bereits nach 300 ps, während sie hier bis 550 ps bestehen bleibt. Als Folge der Orientierungsänderung von His 524 ändert auch Glu 419 diese, welches bis zu einem Zeitpunkt von 400 ps über eine H-Brücke zum  $N\delta$ -Atom von His 524 ausbildet. Glu 419 ist auch in ein Netzwerk von Salzbrücken ausgehend von Lys 531 involviert. Lys 531 interagiert nämlich sowohl mit Glu 339 als auch mit Glu 419 über solche Wechselwirkungen. Durch diese wird Helix 11 in Form und Position relativ zu Helix 3 und Helix 6/7 stabilisiert. Nach 300 ps bricht die Salzbrücke zwischen Lys 531 und Glu 419 als Konsequenz aus den beschriebenen Orientierungsänderungen. Helix 11 wird durch die zweite Salzbrücke zwischen Lys 531 und Glu 339 aber noch in ihrer Position gehalten. Doch in Folge der Instabilität um His 524, bedingt durch den Verlust der H-Brücke zu Glu 419, bricht Helix 11 schließlich, nachdem Estradiol bei 800 ps den „gate-keeper“ Trp 383 passiert hat. Dies äußert sich in einem Bruch der Salzbrücke zwischen Lys 531 und Glu 339 nach 1000 ps. Ab diesem Zeitpunkt knickt Helix 11 ab und Helix 12 windet sich auf. Abb. 7.36 gibt eine Übersicht des Beschriebenen.



**Abbildung 7.36:** *Obere Reihe:* Abstände zwischen  $N\epsilon$  von Lys 531 und Carboxylat-O-Atom von Glu 339 (links) und Glu 419 (rechts); *Links unten:* Abstand zwischen  $N\delta$  von His 524 und Backbone-Carbonyl-O von Glu 419; *Rechts unten:* Überblick über den Ligandenaustritt: Repräsentative Snapshots nach 200 (cyan), 800 (gelb), 1000 (lila) und 1600 (grün) ps SMD-Simulation; Glu 339, Glu 419, His 524 und Lys 531 als Stabmodell.

In Folge der Ereignisse in Helix 11 um His 524 und Lys 531 und des fortschreitenden Austritts von Estradiol bricht auch die H-Brücke zwischen Glu 380 und His 547, welche Helix 12 in der agonistischen Kristallstruktur in ihrer Position relativ zu Helix 3 fixiert (siehe Abb. 7.37). Diese Brücke blieb bei der Ligandenentfernung entlang Pfad A über die gesamte Simulationsdauer bestehen (siehe Abb. 7.31) wie auch Helix 12 in seiner Orientierung bestehen blieb. Hier allerdings ist ein Bruch dieser H-Brücke ein eindeutiges Indiz, dass Helix 12 sich von ihrer Position in der agonistischen 1ere Form entfernt hat.



**Abbildung 7.37:** Einfluss des Ligandenaustritts auf Helix 11 und Helix 12: *Links:* Abstand zwischen dem Carbonyl-O-Atom von Glu 380 und N $\epsilon$ -Atom von His 547; *Rechts:* Repräsentative Snapshots nach 200 (cyan), 800 (gelb), 1000 (lila) und 1600 (grün) ps SMD-Simulation, Glu 380 und His 547 als Stabmodell.

### 7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und abschließende Betrachtung

In den beiden vorangegangenen Unterkapiteln (7.1 und 7.2) wurden mit Hilfe der Methode der SMD die beiden natürlichen Agonisten Testosteron und 17  $\beta$ -Estradiol jeweils aus der LBD des AR und ER entfernt. Dabei wurde ein Augenmerk auf eine Verschiebung von Helix 12 gelegt, welche in den Ausgangsstrukturen in ihrer agonistischen Konformation vorliegt. Während im Falle des ARs bei keinem Ligandenausritt entlang gewählter Pfade A-E eine größere Bewegung von Helix 12 beobachtet werden konnte, ergab sich im Falle des ERs bei einer Ligandenentfernung entlang Pfad B eine weitläufige Bewegung von Helix 12.

Sowohl für den AR als auch für den ER wurden zwei gewählte Pfade strukturell genauer untersucht, um festzustellen, wie sich der Ligandenausritt zuträgt und worin die Ursachen in einer bzw. keiner Bewegung von Helix 12 liegen. Im System des ARs wurde dabei eindeutig Trp 741 als „gate-keeper“ identifiziert, welcher einen Kanal öffnet, durch den Testosteron die LBD Tasche verlassen kann, ohne dass dazu eine Helix 12 Verschiebung notwendig wäre. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass bislang kein antagonistischer Wildtyp des AR kristallisiert werden konnte. Die in der PDB zugänglichen Strukturen zeigen alle eine Stabilisierung der agonistischen Konformation durch ein  $\beta$ -

Faltblatt zwischen Helix 8/9 und dem carboxyterminalen Ende. Eine davon abweichende Form ist kristallografisch nicht bekannt. Der eigentlichen SMD wurde in dieser Studie des AR eine SMD vorangeschaltet, welche gerade dieses  $\beta$ -Faltblatt brechen soll, um eine Helix 12 Bewegung leichter zu ermöglichen. Im Falle des ER ist dieses  $\beta$ -Faltblatt nicht vorhanden und eine vorangeschaltete SMD war demgemäß nicht notwendig. Unter der Annahme, dass bei einem Ligandeneintritt dieses Faltblatt erst ausgebildet werden muss, schien dieses Vorgehen für den Falle des Ligandenaustritts gerechtfertigt. Trotzdem wurde keine gravierende Abweichung der Position von Helix 12 relativ zur Ausgangsstruktur beobachtet. Es ist anzunehmen, dass für den Testosteronaustritt keine Verschiebung von Helix 12 notwendig ist, sondern Trp 741 eine Schlüsselfunktion für diesen Prozess übernimmt und einen Austrittskanal eröffnet.

Eine solche Schlüsselfunktion kommt im System des ERs Trp 383 zu. Im beschriebenen Pfad A (7.2.2.1) eröffnet dieses analog zu Trp 741 im AR Fall einen Kanal, entlang welchem 17  $\beta$ -Estradiol die LBD Tasche verlässt, ohne dass dabei Helix 12 von seiner agonistischen Konformation abweichen muss. Auch in diesem Fall scheint es also wahrscheinlich, dass für einen Ligandenaustritt keine Helix 12 Verschiebung notwendig ist. Eine drastische Veränderung in der Orientierung von Helix 12 wurde im Falle von Pfad B beobachtet, wenn nämlich ein essenzielles H-Brückennetzwerk zwischen Glu 339, Glu 419, His 524 und Lys 531 bricht, welches Helix 11 relativ zu Helix 6/7 und Helix 3 fixiert. Besondere Bedeutung kommt dabei His 524 zu, durch dessen Rotation um seinen  $\chi_1$ -Winkel ein Bruch des H-Brückennetzwerkes eingeleitet wird, was seinerseits zu einem Abknicken von Helix 11 und in Konsequenz zu einer Verschiebung von Helix 12 führt. Auch andere MD-Simulationsstudien betonen die Rolle von His 524 bei der Aufrechterhaltung der biologisch aktiven agonistischen Rezeptorstruktur [345].

Eine kritische Betrachtung könnte die durchgeführten SMDs aufgrund der getroffenen Annahmen, der visuell gewählten Richtungen für den Ligandenaustritt, der relativ kurzen Simulationszeiten und der gewählten Parameter für die Austrittsgeschwindigkeiten und Federkonstante in Frage stellen. Allerdings wurde in früheren Studien bewiesen, dass solche Simulationen es sehr wohl ermöglichen, wichtige qualitative und auch quantitative Ergebnisse für Ligandenein- und -austritt zu gewinnen, die mit experimentellen Beobachtungen korrelieren [346, 347, 348].

In den hier geschilderten Systemen konnte die Frage geklärt werden, welche Aminosäuren am Austritt der jeweiligen Liganden beteiligt und dafür von entscheidender Bedeutung sind. Darüber hinaus ergab sich auch, dass die durch den Ligandenaustritt induzierten konformationellen Veränderungen im Rezeptor klein sind. Eine Ausnahme hiervon bildet Pfad B im ER Fall. Im Zuge dieses Austritts wurde der wichtige Rest His 524 identifiziert, der entscheidend dafür verantwortlich ist, dass eine Verschiebung in Helix 12 erfolgen kann. REMD (Random Expulsion Molecular Dynamics) Studien am RAR, in welchen der Austrittsweg des Liganden nicht vorgegeben ist und der Austritt durch eine konstante, artifizielle Kraft zusätzlich zum Kraftfeld verursacht wird, ergeben ebenfalls für alle vier identifizierten Austrittswege keine notwendige Verschiebung von Helix 12 [349].

Es ist anzunehmen, dass die ausgesprochene Flexibilität im Rezeptor entlang des hier gewählten Austrittspfades dem Liganden erlaubt, die Tasche zu verlassen ohne dabei größe-

re, die Makrostruktur des Rezeptors beeinflussende Veränderungen zu erfordern. Zudem bildet Helix 12 in der agonistischen Konformation hydrophobe Wechselwirkungen mit Helix 3 aus und stabilisiert dadurch Helix 3, sowie Helix 5 und 11. In der antagonistischen Konformation sind diese Wechselwirkungen nicht gegeben und eine Stabilisierung ebenfalls nicht. Aus diesem Grund ist es schwieriger, eine Helix 12 Bewegung ausgehend von der agonistischen als von der antagonistischen Konformation zu erzwingen.

Die durchgeführten SMD-Analysen zeigen aber auch deutlich, wie schwierig es ist, die Flexibilität der NRs vorherzusagen.

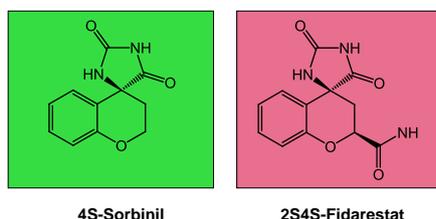
Es soll abschließend noch einmal darauf hingewiesen werden, dass hier ein Ligandenaustritt, welcher schlussendlich in einen Apo-Zustand des Rezeptors führt, untersucht wurde. Eine Apo-Struktur von AR und ER wurde bisher kristallografisch nicht aufgeklärt. In der experimentell ermittelten Apo-Form des RXR- $\alpha$  weist die terminale Helix 12 ins Solvens und steht vom Rest des Rezeptors ab (1lbd [265]). Im Gegensatz dazu zeigt der ungebundene PPAR- $\gamma$  (3prg [350]) Helix 12 in einer agonistischen Konformation. Daraus lässt sich eine Existenz der Apo- und damit ungebundenen Formen der NRs mit zwei unterschiedlichen Helix 12 Orientierungen erschließen, wobei beide gemäß ihres konformationellen Gleichgewichtes ineinander übergehen können. Wird dieses Erkenntnis auf die hier studierten Rezeptoren AR und ER übertragen, bedeutet dies eine Übereinstimmung mit experimentellen Beobachtungen für andere Vertreter der Klasse der NRs. Die hier simulierten Rezeptoren zeigen im Zuge des induzierten Ligandenaustritts und damit im Zuge des Übergangs in den Apo-Zustand einen Verbleib von Helix 12 in der agonistischen Konformation. Nur Pfad B im Falle des ER zeigt weitreichendere Bewegungen in Helix 12. Natürlich ist solch ein Übergang von einer agonistischen in eine Apo-Form des ER/AR mit ins Solvens reichender Helix 12 energetisch sehr aufwendig und es bleibt die Frage bestehen, inwieweit ein Nachvollziehen dieses Übergangs im Zuge von SMD überhaupt möglich ist. Die durchgeführte Studie identifiziert aber eindeutig Aminosäuren, die dafür von besonderer Bedeutung sind und unterstreicht die Komplexität in der inhärenten Flexibilität der NRs.

# 8 Thermodynamische Integrationsrechnungen am Modellsystem der Aldose Reduktase

## 8.1 Problemstellung

In diesem Kapitel werden Bestimmungen relativer Bindungsaffinitäten von Hydantoininhibitoren der Aldose Reduktase vorgenommen. Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, stellt die Methode der Thermodynamischen Integration einen beliebigen Ansatz zur Abschätzung freier Energieunterschiede zwischen chemisch ähnlichen Liganden am selben Rezeptor dar. Die ALR2 ist hier aufgrund der Existenz einer Reihe chemisch ähnlicher Ligandenserien mit experimentellen Bindedaten ein interessantes Zielenzym für derartige Berechnungen. Für die nachfolgend vorgestellten Berechnungen wurden die Hydantoinverbindungen Sorbinil und Fidarestat herangezogen. Diese binden beide an die ALR2, indem die Spezifitätstasche geschlossen bleibt und sich der Bindemodus somit nicht wesentlich verändert. Dies ist eine der Grundvoraussetzungen der TI-Berechnungen, um eine ausreichende Konvergenz der Simulationen zu ermöglichen.

In der Protein Data Bank sind mehrere Kristallstrukturen sowohl für Sorbinil als auch Fidarestat abgelegt. Im Jahre 2005 wurde die Kristallstruktur der Leu300Pro Mutante der humanen Aldose Reduktase im Komplex mit Fidarestat mit einer Auflösung von 1,00 Å bestimmt (PDB-Code 2agt) [351]. Daneben existiert auch die Struktur der unmutierten humanen ALR2 in Komplex mit demselben Liganden (PDB-Code 1pwm) [352]. 4S-Sorbinil unterscheidet sich von 2S4S-Fidarestat nur durch die fehlende exocyclischen Carboxamidgruppe (siehe Abb. 8.1).



**Abbildung 8.1:** Vergleich der Strukturformeln von 4S-Sorbinil (links) und 2S4S-Fidarestat (rechts).

Die Kristallstruktur dieses Hydantoin 4S-Sorbinil im Komplex mit der Schweine-ALR2 ist ebenfalls in der PDB verfügbar (PDB-Code 1ah0) [78]. Für beide Liganden wurden über die isotherme Titrationskalorimetrie thermodynamische Daten des Bindungsprozesses an die humane Wildtyp-ALR2 und Leu300Pro-Mutante gesammelt [351]. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 8.1 aufgelistet.

**Tabelle 8.1:** ITC-Ergebnisse der Bindungen von 2S4S-Fidarestat und 4S-Sorbinil an Wildtyp-ALR2 und Leu300Pro Mutante.

Enzym	$\Delta G^0$ [kcal/mol]	$\Delta H^0$ [kcal/mol]	$-T\Delta S^0$ [kcal/mol]
2S4S-Fidarestat			
hALR2 WT	-11,15	-18,03	6,88
Leu300Pro	-9,29	-16,38	7,09
4S-Sorbinil			
hALR2 WT	-9,05	-12,47	3,32
Leu300Pro	-9,24	-11,15	1,91

Diese weisen darauf hin, dass die Gibbs'sche Freie Energie der Bindung von Fidarestat an den Wildtyp um ca. 1,9 kcal/mol günstiger ist als jene der Bindung an die Leu300Pro Form. Die Erklärung dafür liegt in einer H-Brücke, die zwischen dem Carbonylsauerstoffatom der exocyclischen Amidgruppe von Fidarestat und dem Backbone NH von Leu 300 ausgebildet werden kann, was im Falle der Leu300Pro Mutante natürlich aufgrund des Fehlens dieser NH-Funktionalität im Prolin nicht möglich ist. Im Falle des Sorbinils hingegen sind die  $\Delta G^0$  Werte nahezu ident. Sorbinil besitzt, wie bereits erwähnt (siehe Abb. 8.1), keine exocyclische Carboxamidgruppe, die mit dem Backbone von Leu 300 wechselwirken könnte. Aus diesem Grund ergibt sich für die Bindung an den Wildtyp kein Energiegewinn, der auf eine H-Brücke zurückzuführen wäre und welche den Wildtyp damit bevorzugen würde. Betrachtet man die Gibbs'sche Freie Energie  $\Delta G^0$  nach Enthalpie- und Entropiewerten aufgespalten, fällt eine enthalpisch günstigere und entropisch ungünstigere Bindung für Sorbinil an den Wildtyp im Vergleich zur Leu300Pro Mutante auf. Somit kompensieren sich die Änderungen gegenseitig und führen zu einem in etwa gleichen  $\Delta G^0$ -Wert. Ein Grund für dieses Verhalten liegt vermutlich in der Existenz eines interstitiellen Wassermoleküls, welches eine H-Brücke zwischen Sorbinil und dem Backbone Leu 300 N-Atom vermittelt. Das Festhalten dieses Wassermoleküls in der Tasche bedingt einen entropischen Energieverlust, der aber durch den enthalpischen Energiegewinn der nun ausbildbaren wassermedierten Wechselwirkung kompensiert wird.

Für die Fidarestat-Bindung kann die günstigere Freie Energie der Bindung an den Wildtyp im Vergleich zur Leu300Pro Mutante hauptsächlich der günstigen Enthalpieänderung zugeschrieben werden, während die Entropie nahezu unverändert bleibt.

In diesem Kapitel soll nun versucht werden, die Berechnung freier Bindungsenthalpien mit Hilfe des Verfahrens der Thermodynamischen Integration zu evaluieren. Dabei wird

zunächst ein Testsystem begutachtet (Abschnitt 8.3), um sich dann dem hier erläuterten System Fidarestat-Sorbinil (siehe Abschnitt 8.4) zuzuwenden.

## 8.2 Methodik

Um relative Bindungsaffinitäten von Hydantoininhibitoren der Aldose Reduktase mit Hilfe der Methode der TI zu bestimmen, wurde das Programmpaket Amber 10 [311] mit seinem SANDER Modul verwendet. Ausgangspunkte aller Berechnungen waren die jeweiligen Kristallstrukturen aus der PDB [70]. Ihre Vorbereitung und Parametrisierung erfolgte analog zu der Beschreibung in Kapitel 5.

Eine Voraussetzung für die TI-Berechnung unter Verwendung von Soft-Core Potentials und einer Aufteilung in die bereits in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Schritte A-C in AMBER 10.0 ist eine Ununterscheidbarkeit der Koordinaten aller Atome des Anfangs- und Endzustandes mit Ausnahme der Atome, die von der alchemischen Transformation betroffen sind. Aus diesem Grund wird die solvatisierte und bei 300 K equilibrierte Ausgangsstruktur mit LEaP behandelt und ein Topologie- und Koordinatenfile davon erzeugt. Der entsprechende Endzustand wird über einen aus dem equilibrierten Ausgangszustand entnommenen PDB-File generiert und ebenfalls mit LEaP behandelt, um ein Topologie- und Koordinatenfile zu erhalten. Die Erzeugung des Endzustandes aus dem Ausgangszustand ist keine triviale Angelegenheit und muss unbedingt wohlüberlegt sein, um Konvergenzprobleme zu vermeiden. Die Schwierigkeit besteht vor allem darin, die Koordinaten- und Topologiefiles des Anfangs- und Endzustandes für eine konvergierende TI-Berechnung aus zwei PDB-Files zu erstellen, die sich voneinander nur in den zu verändernden Atomen unterscheiden dürfen. Für sich genommen müssen die PDB-Files (und Koordinaten- bzw. Topologiefiles) aber natürlich nach wie vor chemisch sinnvoll sein und dürfen keinerlei strukturelle Spannungen bzw. van der Waals Clashes aufweisen.

Die anschließenden MD-Simulationen wurden bei 300 K mit dem Programm SANDER in einem NPT-Ensemble mit einem Zeitschritt von 2 fs durchgeführt. Simulationen in der Proteinumgebung wurden 1 ns lang ausgeführt, solche in wässriger Lösung 500 ps lang. Der SHAKE-Algorithmus wurde auf von Änderungen der Atomparameter unberührte C-H Bindungen angewandt. Die „Particle Mesh Ewald“ Methode [319] wurde zur Handhabung der elektrostatischen Wechselwirkung verwendet, während für die anderen nichtkovalenten Wechselwirkungen ein Distanz-Ausschlusskriterium von 8 Å galt. Eine Speicherung der Koordinaten der Trajektorien erfolgte alle 1 ps und der Energie-Werte alle 10 Zeitschritte. Die Transformation vom Anfangs- in den Endzustand wurde parallel in drei Schritten (A-C) berechnet (siehe Kapitel 3.2.2). In Schritt A werden die Ladungen der Atome entfernt, für die in Schritt B die van der Waals Parameter zu denen der Zielatome geändert werden. In Schritt B wird die Veränderung von Parametern unter Zuhilfenahme von Soft-Core Potentials bewerkstelligt (siehe Kapitel 3.2.2). Schritt C vervollständigt die Transformation, indem die neuen Ladungen der geänderten Atome hinzugefügt werden. Alle diese Schritte wurden in neun Prozesse unterteilt, für die eine eigene Potentialfunktion über den  $\lambda$ -Wert

definiert wird. Die gewählten  $\lambda$ -Werte lauten: 0,01592, 0,08198, 0,19331, 0,33787, 0,50000, 0,66213, 0,80669, 0,91802, 0,98408. Für diese Werte sind Koeffizienten tabellarisch aufgelistet, die eine Integration durch Gauss-Quadratur ermöglichen (siehe Tabelle 8.2). Jede dieser Simulationen wurde in der Proteinumgebung 1 ns lang ausgeführt. Die Ausgangskonfiguration jedes Schrittes ist jene, die sich als Endkonfiguration der Simulation beim vorhergehenden  $\lambda$ -Wert ergibt. Die Unterteilung der Transformation in drei Schritte A, B und C und deren abermalige Unterteilung in neun Simulationsfenster von 1 ns Länge resultierten insgesamt in einer Simulationsdauer von 27 ns. Die gemäß der Gauss-Quadratur zur Gewichtung der bei jedem  $\lambda$ -Wert erhaltenen  $\frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda}$ -Werte herangezogenen Koeffizienten zur numerischen Integration sind in Tabelle 8.2 aufgelistet.

**Tabelle 8.2:**  $\lambda$ -Werte und zugehörige Koeffizienten  $w_i$  zur Gauss-Quadratur [353].

$\lambda_i$	$1-\lambda_i$	$w_i$
0,01592	0,98408	0,04064
0,08198	0,91802	0,09032
0,19331	0,80669	0,13031
0,33787	0,66213	0,15617
0,5		0,16512

Für jeden  $\lambda$ -Wert wurde 1 ns lang simuliert, wovon die ersten 200 ps als Equilibrierungsphase betrachtet wurden und nicht in die Energieberechnung miteinfließen. Die Berechnung der in den folgenden Kapiteln aufgelisteten Fehler erfolgte nach dem Prinzip der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung:

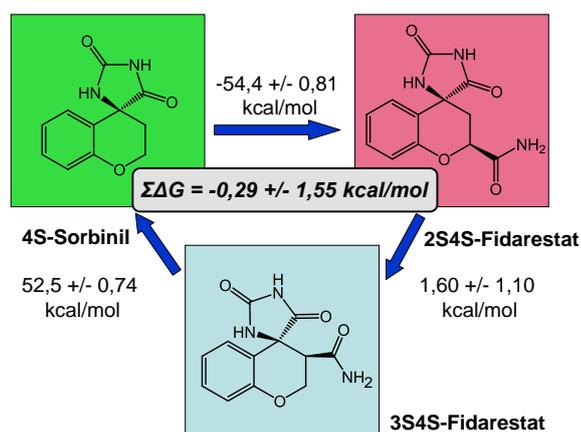
$$\Delta = \sqrt{\Delta_{\lambda_1}^2 + \Delta_{\lambda_2}^2 + \dots + \Delta_{\lambda_9}^2}. \quad (8.1)$$

Die auftretende statistische Schwankung um den Mittelwert von  $\frac{\partial V(\lambda)}{\partial \lambda}$  im Laufe der Simulation ergibt die Unsicherheit  $\Delta_{\lambda_i}$  der einzelnen  $\lambda$ -Werte.

## 8.3 Testsystem

Um zu überprüfen, ob die gewählten Parameter,  $\lambda$ -Werte sowie Simulationszeiten zu konvergierenden Ergebnissen führen, die für die angestrebten TI-Berechnungen an der ALR2 herangezogen werden können, wurde ein hypothetischer, thermodynamischer Kreisprozess konzipiert, der in Abb. 8.2 vorgestellt ist. Da  $G$  eine Zustandsfunktion ist, sollte die Summe der einzelnen  $\Delta G$ -Werte der in diesem Kreisprozess berechneten Transformationen 0 kcal/mol ergeben. Im Detail wird in wässriger Lösung 4S-Sorbinil zu 2S4S-Fidarestat verändert, nachfolgend dessen exozyklische Carboxamidgruppe von der 2- in die 3-Position verschoben, was zu einem hypothetischen 3S4S-Fidarestat führt. Daraufhin wird wieder der Ausgangszustand 4S-Sorbinil erzeugt. Für den hier vorgestellten Kreisprozess ergibt

sich eine tatsächliche Summe von  $\Sigma\Delta G = -0,29 \pm 1,55$  kcal/mol, was als ausreichend guter Wert für die Berechnung betrachtet wurde. Die einzelnen  $\Delta G$ -Werte sind in Abb. 8.2 aufgelistet.

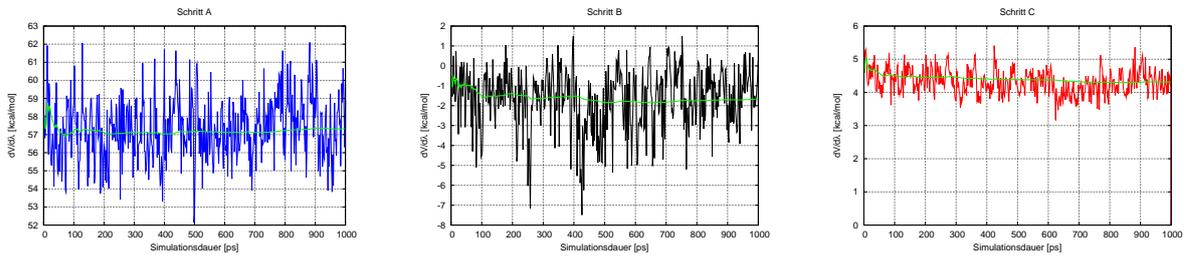


**Abbildung 8.2:** Testsystem der TI-Berechnungen in wässriger Lösung mit aufgelisteten  $\Delta G$ -Werten der Einzelschritte und dem aufsummierten  $\Sigma\Delta G$ -Wert.

## 8.4 Modellsystem Fidarestat-Sorbinil

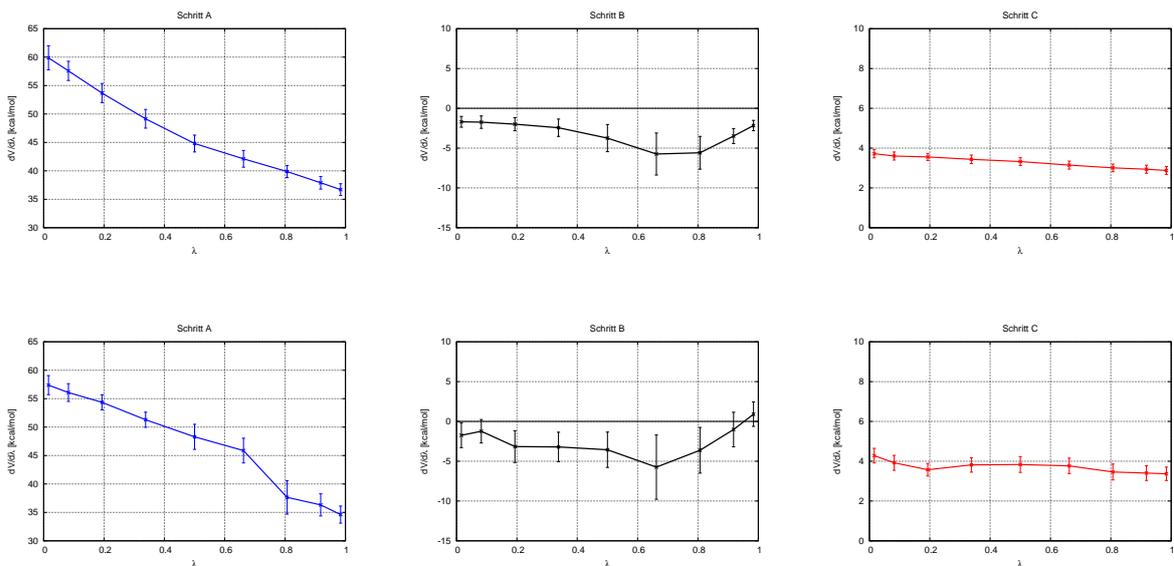
**Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der Wildtyp-ALR2** In dem hier vorgestellten Abschnitt wird der  $\Delta\Delta G$ -Wert für die Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil ermittelt. Die Berechnungen erfolgen wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben anhand eines thermodynamischen Zyklus. Dazu wird die Transformation des Liganden in einer Wasserbox, sowie in der solvatisierten Proteinumgebung durchgeführt. Für jeden der insgesamt neun gewählten  $\lambda$ -Werte werden die  $dV/d\lambda$ -Werte im Verlauf der jeweils 1000 ps Simulation ermittelt. Diese sind für den  $\lambda$ -Wert von 0,01592 in der nachfolgenden Abbildung 8.3 für alle drei Schritte A, B und C dargestellt. Die ersten 200 ps werden als Equilibrierungsphase bewertet und nicht für die weitere Auswertung herangezogen.

Zum besseren Verständnis der Art und Weise der Auswertung Thermodynamischer Integrationsrechnungen sind nachfolgend (Abb. 8.4) die für jeden der 9 gewählten  $\lambda$ -Werte ermittelten Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen über die Simulationszeit von 200 bis 1000 ps aufgetragen. Die Graphen zeigen sowohl jene Werte, die bei der alchemischen Transformation der Liganden in Wasser, als auch bei Transformation der Liganden gebunden an die ALR2 ermittelt wurden. Auffallend ist dabei eine größere Schwankung der Werte bei Berücksichtigung der Proteinumgebung mit größeren Standardabweichungen, was mit dem für diesen Fall komplexeren Konformationsraum in Zusammenhang steht. Die Entfernung bzw. das Hinzufügen von Ladungen führt in der Wasserbox bzw. in der Proteinumgebung zu einem sehr ähnlichen Verlauf der  $dV/d\lambda$ -Werte. Die auffälligsten Schwan-



**Abbildung 8.3:** Exemplarischer Verlauf der  $dV/d\lambda$ -Werte für  $\lambda=0,01592$  mit ihrem kumulativen Mittelwert in grün, aufgetrennt nach den hier verwendeten und beschriebenen drei Schritten der Thermodynamischen Integration.

kungen ergeben sich für beide Fälle der alchemischen Transformation in Schritt B, welcher die van der Waals Transformation darstellt.



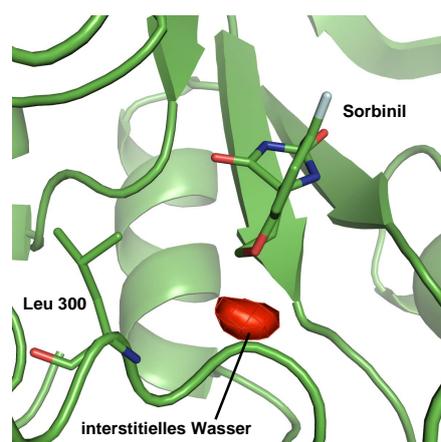
**Abbildung 8.4:** Grafische Auftragung der  $dV/d\lambda$ -Werte für jeden der 9  $\lambda$ -Werte der vollzogenen alchemischen Transformation mit zugehörigen Standardabweichungen  $\Delta_{\lambda_i}$ : *Erste Reihe:* Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in Wasser; *Zweite Reihe:* Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in Proteinumgebung.

Die für die einzelnen Schritte A, B und C ermittelten  $\Delta$ -G-Werte der Simulation der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in Wasser sowie in der Proteinumgebung sind in der folgenden Tabelle 8.3 gemeinsam mit entsprechenden  $\Delta\Delta$ G-Werten und dem resultierenden Gesamtwert aufgelistet. Den größten Beitrag liefert Schritt A, welcher den Bruch der H-Brücke zwischen der exozyklischen Carboxamidgruppe und dem Leu 300 NH-Backbone Atom bedeutet.

**Tabelle 8.3:**  $\Delta$ G-Werte und relative freie Bindungsenthalpie  $\Delta\Delta$ G [kcal/mol] der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der Wildtyp-ALR2.

$\Delta$ G und $\Delta\Delta$ G in kcal/mol	Wasser		Protein		Gesamt	
2S4S-Fidarestat - 4S-Sorbinil (Leu 300)	$\Delta$ G	+/-	$\Delta$ G	+/-	$\Delta\Delta$ G	+/-
Schritt A	46,39	0,54	47,22	0,73	0,83	1,26
Schritt B	-3,51	0,61	-3,11	0,94	0,41	1,55
Schritt C	3,29	0,07	3,71	0,14	0,41	0,21
Gesamt	46,17	0,82	47,82	1,20	1,65	2,02
Gesamt experimentell					2,10	0,29

Interessant ist besonders in Schritt C, dass während 61,14% der 9 ns Simulation tatsächlich ein interstitielles Wassermolekül eine H-Brücke zwischen dem Leu 300 Stickstoffatom des Backbones und dem Sauerstoff des Chromanringes von Sorbinil vermittelt. Ausgehend von der Struktur des an die ALR2 gebundenen Fidarestat wandert bei der Transformation zu Sorbinil ein Wassermolekül tatsächlich an die angenommene Stelle. Abbildung 8.5 zeigt die Lokalisierung dieses Wassermoleküls.



**Abbildung 8.5:** Interstitielles Wasser im Verlauf der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der Wildtyp-ALR2.

Der für die Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil insgesamt erhaltene positive  $\Delta\Delta G$ -Gesamtwert bedeutet, dass 4S-Sorbinil eine positivere absolute freie Bindungsenthalpie besitzt und damit schlechter an die ALR2 bindet, als der Ausgangsligand 2S4S-Fidarestat. Der ermittelte Wert von 1,65 kcal/mol ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert von 2,10 kcal/mol.

**Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der ALR2 Leu300Pro Mutante** In diesem Abschnitt wird nun analog zu dem vorhergehenden 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil alchemisch transformiert. Dabei wird allerdings von der Leu300Pro Mutante in Komplex mit Fidarestat (2agt) ausgegangen und demgemäß der  $\Delta\Delta G$ -Wert für die Transformation nicht in der Wildtyp-Form, sondern in der Leu300Pro ALR2 berechnet. Tabelle 8.4 schlüsselt den Gesamtwert in  $\Delta\Delta G$  und die einzelnen  $\Delta G$ -Werte der Simulation der Transformation in Wasser und der Proteinumgebung nach den drei Teilschritten auf.

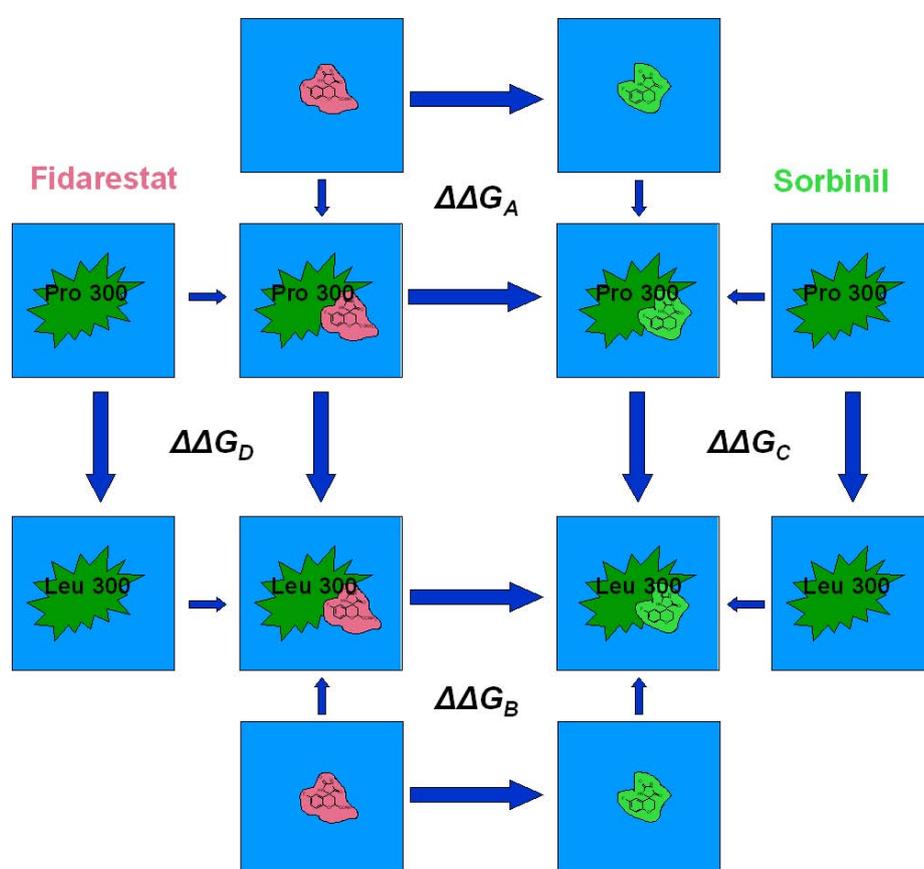
**Tabelle 8.4:**  $\Delta G$ -Werte und relative freie Bindungsenthalpie  $\Delta\Delta G$  [kcal/mol] der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der ALR2 Leu300Pro Mutante.

$\Delta G$ und $\Delta\Delta G$ in kcal/mol	Wasser		Protein		Gesamt	
2S4S-Fidarestat - 4S-Sorbinil (Pro 300)	$\Delta G$	+/-	$\Delta G$	+/-	$\Delta\Delta G$	+/-
Schritt A	46,39	0,54	44,02	0,58	-2,38	1,12
Schritt B	-3,51	0,61	-2,13	0,77	1,38	1,38
Schritt C	3,29	0,07	3,73	0,13	0,44	0,20
Gesamt	46,17	0,82	45,62	0,97	-0,55	1,79
Gesamt experimentell					0,05	0,50

Hier ergibt sich nun ein  $\Delta\Delta G$ -Gesamtwert von -0,55 kcal/mol. Dieser bedeutet ein geringfügig affineres Binden von 4S-Sorbinil an die Leu300Pro Mutante von ALR2 verglichen mit 2S4S-Fidarestat. Der experimentell ermittelte Wert liegt bei 0,05 kcal/mol und somit sehr nahe bei 0, sodass weder der eine noch der andere Ligand deutlich besser bindet. Der experimentell ermittelte Wert liegt innerhalb des theoretisch sich ergebenden Fehlerbereichs. Den größten Beitrag liefert Schritt A mit -2,38 kcal/mol, in welchem die Ladungen der exozyklischen Carboxamidgruppe entfernt werden. Der negative Beitrag ist hier so zu verstehen, dass im Falle des hier vorliegenden Pro 300 keine H-Brücke zwischen der exozyklischen Carboxamidgruppe und dem Backbone dieses Restes möglich ist und daher auch nicht gebrochen werden muss.

**Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 2S4S-Fidarestat** Nachdem in den vorhergehenden Abschnitten für die Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil der  $\Delta\Delta G$ -Wert sowohl im Wildtyp der ALR2 als auch in der Leu300Pro Mutante ermittelt wurde, wird in den folgenden beiden Abschnitten versucht, bei gebundenem Fidarestat bzw. Sorbinil eine Mutation von Pro 300 zu Leu 300 vorzunehmen und somit den in

Abb. 8.6 dargestellten thermodynamischen Zyklus zu schließen. Die darin als  $\Delta\Delta G_A$  und  $\Delta\Delta G_B$  bezeichneten Werte wurden zuvor ermittelt. Sie setzen sich aus der Transformation der Liganden in der Proteinumgebung und jener in Wasser zusammen. Im Rahmen der alchemischen Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit und ohne gebundenem 2S4S-Fidarestat sollen diese Werte entsprechend durch  $\Delta\Delta G_C$  und  $\Delta\Delta G_D$  ergänzt werden. Zur Ermittlung dieser wird auch die Transformation von Pro 300 zu Leu 300 ohne gebundene Liganden berechnet, um mit experimentellen Daten vergleichbare  $\Delta\Delta G$ -Werte ermitteln zu können. Abb. 8.6 veranschaulicht die vorgenommene Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit und ohne gebundene Liganden, wodurch die Ermittlung von  $\Delta\Delta G_C$  und  $\Delta\Delta G_D$  möglich ist.



**Abbildung 8.6:** Thermodynamischer Zyklus zur alchemischen Transformation von Pro 300 zu Leu 300.

Hier wird nun zunächst die Transformation von Pro 300 zu Leu 300 in Anwesenheit von 2S4S-Fidarestat ausgehend von der Kristallstruktur 2agt diskutiert. Tabelle 8.5 listet die erhaltenen Werte auf. Den größten Beitrag zu dem finalen  $\Delta\Delta G$ -Wert von -1,50 kcal/mol liefert Schritt C, in welchem die Partiaalladungen an der generierten Leu 300 Seitenkette hinzugefügt werden. Der negative Wert von -2,07 kcal/mol beschreibt einen günstigen Beitrag aufgrund der Ausbildung einer H-Brücke zwischen der Carboxamidgruppe und

dem Backbone NH von Leu 300 im Laufe der Simulation. Diese ist tatsächlich 84,96% der Simulationszeit als besetzt zu erachten. Auffallend sind in diesem Abschnitt erhöhte Standardabweichungen im Vergleich zu den vorhergehenden Studien. Vor allem in Schritt B, dem van der Waals Teil, fällt dies auf und ist auf größere Veränderungen im Zuge der Transformation einer gesamten Aminosäure zurück zu führen. Der negative theoretisch berechnete Gesamtwert von -1,50 kcal/mol zeigt eine Begünstigung des Endzustandes an, in welchem Fidarestat an den Wildtyp gebunden ist und durch eine H-Brücke seiner exozyklischen Carboxamidgruppe zum Backbone NH von Leu 300 stabilisiert wird.

**Tabelle 8.5:**  $\Delta G$ -Werte und relative freie Bindungsenthalpie  $\Delta\Delta G$  [kcal/mol] der Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 2S4S-Fidarestat.

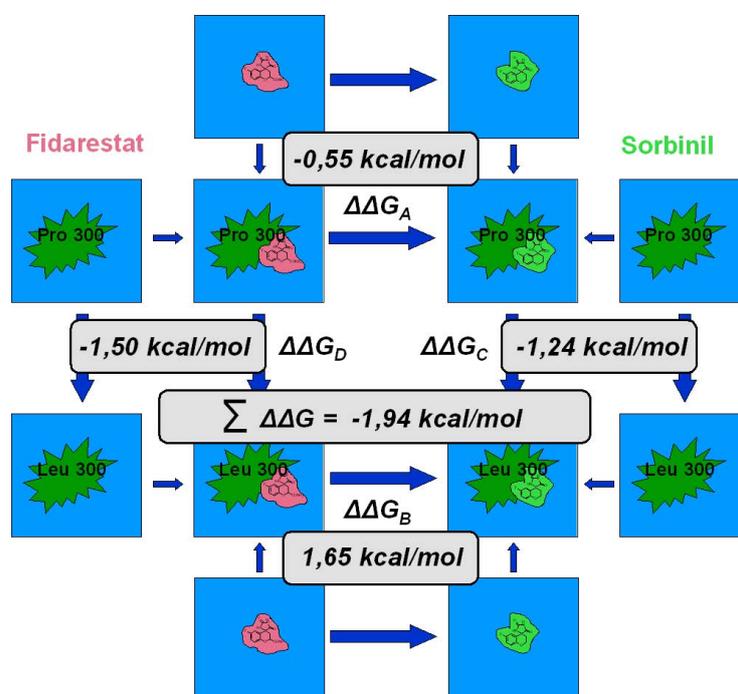
$\Delta G$ und $\Delta\Delta G$ in kcal/mol	Mutation ohne FID		Mutation mit FID		Gesamt	
Pro 300 - Leu 300 (FID)	$\Delta G$	+/-	$\Delta G$	+/-	$\Delta\Delta G$	+/-
Schritt A	19,60	0,58	20,94	0,57	1,34	1,15
Schritt B	-1,08	1,08	-1,86	1,20	-0,78	2,28
Schritt C	-50,19	0,53	-52,26	0,41	-2,07	0,93
Gesamt	-31,67	1,34	-33,17	1,39	-1,50	2,72
Gesamt experimentell					-1,86	0,43

**Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 4S-Sorbinil** Wie im vorher beschriebenen Abschnitt wird auch hier nun eine Mutation von Aminosäure Pro 300 zu Leu 300 vorgenommen, wobei 4S-Sorbinil an die ALR2 gebunden ist. Tabelle 8.6 schlüsselt die einzelnen Beiträge zum  $\Delta\Delta G$ -Wert nach den drei durchgeführten Schritten der TI-Berechnung auf. Auch hier zeigen sich größere Standardabweichungen im van der Waals Teil der Transformation, welche ein Leu an Stelle von Pro begünstigt. Hier sollte erwähnt werden, dass für die Leu300Pro Mutante keine Kristallstruktur mit gebundenem 4S-Sorbinil in der PDB hinterlegt ist. Als Ausgangsstruktur wurde daher die Endstruktur verwendet, welche bei der Transformation des Liganden von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der Leu300Pro Mutante erzeugt wurde.

Die bislang ermittelten  $\Delta\Delta G$ -Werte dienen nun dazu, den thermodynamischen Zyklus in Abb. 8.7 zu schließen und die Summe  $\Sigma\Delta\Delta G$  zu berechnen. Theoretisch sollte die Summe 0 betragen, tatsächlich ergibt sich ein Wert von -1,94 kcal/mol, der als ausreichend gut bewertet wird. Die erfolgten Transformationen betreffen nämlich nicht nur den Liganden in der Proteinumgebung, sondern ganze Aminosäuren. Den größten fehlerbehafteten Beitrag und damit zu einer von 0 abweichenden Summe liefert die Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 4S-Sorbinil. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass wie beschrieben, hier keine Kristallstruktur als Ausgangsstruktur der Berechnungen verwendet werden konnte.

**Tabelle 8.6:**  $\Delta G$ -Werte und relative freie Bindungsenthalpie  $\Delta\Delta G$  [kcal/mol] der Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 4S-Sorbinil.

$\Delta G$ und $\Delta\Delta G$ in kcal/mol	Mutation ohne SOR		Mutation mit SOR		Gesamt	
Pro 300 - Leu 300 (SOR)	$\Delta G$	+/-	$\Delta G$	+/-	$\Delta\Delta G$	+/-
Schritt A	19,60	0,58	21,31	0,58	1,71	1,16
Schritt B	-1,08	1,08	-3,11	1,11	-2,03	2,18
Schritt C	-50,19	0,53	-51,11	0,35	-0,92	0,88
Gesamt	-31,67	1,34	-32,91	1,30	-1,24	2,63
Gesamt experimentell					0,19	0,36

**Abbildung 8.7:** Ergebnis des geschlossenen thermodynamischen Zyklus zur alchemischen Transformation von Pro 300 zu Leu 300.

Die in diesem Abschnitt berechneten relativen freien Bindungsenthalpien stimmen im Rahmen ihrer Fehlerbreite sehr gut mit den zugehörigen experimentellen Daten überein. Damit wird die Eignung der TI-Berechnung für detaillierte Wirkstoffdesignstudien unterstrichen, da es möglich ist, signifikante Unterschiede in den Bindungseigenschaften der verschiedenen Liganden zu berechnen.

**Teil III**

**Zusammenfassung, Summary**

## 9 Zusammenfassung

Aldose Reduktase katalysiert den ersten Schritt des Sorbitol-Stoffwechselweges. In diesem wird mit Hilfe des Kofaktors NADPH Glukose zu Sorbitol reduziert. Bei erhöhtem Blutzuckerspiegel, wie dies bei Diabetes-Patienten der Fall ist, ist dieser metabolische Weg von Bedeutung. Bis zu einem Drittel der Blutglukose wird zu Sorbitol reduziert. Die Folge der Sorbitolakkumulation in den Zellen und der Verminderung der NADPH-Konzentration sind „osmotischer“ sowie „oxidativer“ Stress. Diese stehen in Zusammenhang mit den vielfach diskutierten Spätschäden des Diabetes, wie diabetischer Katarakt, Neuro- und Nephropathie.

Das Enzym ist experimentell sehr gut untersucht und eignet sich daher als Modellsystem zur Untersuchung der intrinsischen Proteinflexibilität und thermodynamischer Daten mit Hilfe von Computermethoden. Unter diesen Voraussetzungen steht der Gewinn eines besseren Verständnisses von molekularer Erkennung und Proteinbeweglichkeit der Aldose Reduktase unter Verwendung von Molekulardynamik-Simulationen als primäres Ziel im Zentrum dieser Arbeit.

Aldose Reduktase ist ein 315 Aminosäuren langes, monomeres und cytoplasmatisches Protein mit intrinsischer Flexibilität seiner Bindetasche. Diese kann in einen relativ rigiden Bereich, die Anionen-Bindetasche, welche auch das katalytische Zentrum beherbergt, und in einen flexiblen Bereich, die Spezifitätstasche, unterteilt werden. Letztgenannte kann in offener oder geschlossener Konformation vorliegen und begründet in ihrer Anpassung an die Geometrie und Eigenschaften der Liganden die hohe Substratpromiskuität der Aldose Reduktase. Prinzipiell existieren drei Hauptkonformationen der Aldose Reduktase Bindetasche: jene, die bei Bindung von Sorbinil, IDD594 oder Tolrestat eingenommen werden. Im Falle der Bindung von Sorbinil ist die Spezifitätstasche geschlossen, während sie bei Bindung der beiden anderen Inhibitoren geöffnet vorliegt. Trotz dieser Gemeinsamkeit einer geöffneten Spezifitätstasche führt die Bindung von Tolrestat bzw. IDD594 zu Unterschieden in der Geometrie der Bindetasche. Bei Anwesenheit von Tolrestat im katalytischen Zentrum wird eine Bindetaschen-Konformation induziert, die bei keinem anderen Liganden beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurde versucht, diese einzigartige Tasche mit Hilfe von Tolrestat-Analoga zu stabilisieren.

Die zwei affinsten Derivate dieser als Tolrestat-Analoga konzipierten Reihe von Naphthoisothiazolesigsäurederivaten (genannt ITA und ITB) sind Gegenstand des ersten Teils dieser Doktorarbeit. Die Kristallstrukturen dieser beiden Inhibitoren gebunden an die Aldose Reduktase stehen allerdings im Widerspruch zur ursprüngliche Designhypothese. Die Spezifitätstasche erscheint nämlich geschlossen und beide Derivate, die sich nur in der Kettenlänge an der 4-Position ihres Naphthylringes unterscheiden, weisen einen unterschiedli-

---

chen Bindemodus auf. Zudem zeigt die Kristallstruktur mit gebundenem ITB die Öffnung einer neuen Subtasche. Diese entsteht durch eine Rotation von Trp 20 um den  $\chi_2$ -Winkel und wurde bislang in keiner anderen Kristallstruktur beobachtet, gehört Trp 20 an sich doch zur rigiden Anionen-Bindetasche. In der Folge weicht auch Lys 21 von seiner üblichen Positionierung ab, in welcher es je eine Salzbrücke zu einem Phosphat-Sauerstoff des Kofaktors NADPH und der Carboxylatgruppe der Asp 216 Seitenkette ausbildet, und ist hier solvenssexponiert. An die Frage nach dem Grund eines unterschiedlichen Bindemodus von ITA und ITB und der einmaligen ALR2 Konformation im Fall von ITB wurde mit Hilfe von MD-Simulationen herangegangen, wobei auch die Bedeutung der Modellierung von Trp 219, welches in der Kristallstruktur als nicht aufgelöst erscheint und in dieser Arbeit auf unterschiedliche Arten eingefügt wurde, geklärt werden sollte.

Konkret wurden die für beide Liganden ITA und ITB durchgeführten MD-Simulationen in Bezug auf das dynamische Verhalten der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Bindetasche analysiert. Dabei wurde in Übereinstimmung mit vorhergehenden Kristallstrukturanalysen ein flexibler Bereich der Bindetasche identifiziert, der die Aminosäuren Phe 122, Trp 219, Leu 300 und Cys 303 betrifft. Für den Liganden ITA wurde dabei eine von ihm induzierte Kopplung in der Bewegung von Phe 122 und Cys 303 identifiziert, welche das aromatische Grundgerüst des Liganden in eine von der Kristallstruktur abweichende Orientierung rückt und als bevorzugte vermutet wird.

Die Simulationen wurden jeweils mit und ohne gebundenen Liganden durchgeführt. Letztere waren vor allem im Falle der ITB-Kristallstruktur sehr aufschlussreich, da ein Verschwinden der neuen durch Trp 20 geöffneten Subtasche im Simulationsverlauf beobachtet werden konnte. Nach 10 ns erfolgte allerdings ein erneutes Öffnen derselben, was die Theorie unterstützt, dass das Protein per se in der Lage sein sollte, unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden, sämtliche beobachtbaren Konformationen einzunehmen. Der Ligand selektiert daraus die für seine Bindung günstigste Proteinkonformation, führt zu deren Stabilisierung und verschiebt das Gleichgewicht der möglichen Konformationen zu dieser.

Ein weiteres Charakteristikum bei der Bindung von ITB an die Aldose Reduktase ist die pyramidale Geometrie des Sulfonamidstickstoffs im Liganden in der Kristallstruktur. Für einen Stickstoff vom Imid-Typ sollte eigentlich eine planare günstiger sein. In allen Simulationsstudien geht die zu Beginn pyramidale Geometrie am Sulfonamidstickstoff sehr rasch in die energetisch begünstigte planare über. Ergänzend durchgeführte MD-Simulationen mit veränderten Parametern, in denen auf die Verwendung von „improper torsion“ Termen verzichtet wurde, zeigen allerdings, dass die pyramidale Geometrie des Liganden ITB in der Bindetasche von ALR2 tatsächlich bevorzugt ist und das Auftreten des planaren Sulfonamidstickstoffs im Zuge der Simulationen in der Bindetasche als eine Konsequenz des verwendeten Kraftfeldes mit seinen „improper torsion“ Termen zu verstehen ist.

Als mögliche Ursache für die bevorzugte pyramidale Geometrie werden Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung angenommen. Ein Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe an der 2-Position befindet sich in einem Abstand von 3 Å zum Indol-Stickstoffatom von Trp 20 und könnte somit eine H-Brücke zu diesem ausbilden. Dafür ist eine abgewinkelte Geometrie am Sulfonamidstickstoff des Grundgerüsts notwendig. Die in dieser Arbeit durchgeführ-

ten quantenmechanischen Berechnungen zur H-Brückenstärke bestätigen eine Ausbildung dieser günstigen Interaktion.

Der zweite Teil dieser Arbeit verwendet eine spezielle Form der Molekulardynamik-Simulation, die Steered Molekulardynamik (SMD). In der kofaktorgebundenen Holo-Form der Aldose Reduktase hält das „safety-belt“ den Kofaktor tief vergraben in der Bindetasche. In dieser sogenannten geschlossenen Konformation bildet Trp 219, Teil des „safety-belts“, welches von Ser 214 bis Ser 226 reicht, eine Schwefel-Aren Wechselwirkung mit Cys 298 aus und charakterisiert diese. Sobald der Kofaktor nach erfolgter Reaktion das Enzym verlässt, kommt es zu einer weitläufigen Veränderung der Orientierung des „safety-belts“. In der kofaktorfreen Form bildet Trp 219 nun eine  $\pi$ -Stapelwechselwirkung mit der Guanidiniumgruppe von Arg 268 aus und charakterisiert diese offene Apo-Form der Aldose Reduktase. Insgesamt beträgt in einer Überlagerung der beiden Strukturen der Abstand zwischen den C $\alpha$ -Atomen von Trp 219 17 Å.

Sowohl für die Holo- als auch für die Apo-Form der Aldose Reduktase existieren Kristallstrukturen. SMD-Simulationen ermöglichen es nun in durch Computermethoden zugänglichen und sinnvollen Zeiten den Übergang von der kofaktorgebundenen in die kofaktorfreen Form nachzuvollziehen. Dabei wirkt eine Kraft auf den Kofaktor, welche einen Austritt desselben aus der Bindetasche in eine definierbare Richtung ermöglicht.

In dieser Doktorarbeit wurde der günstigste Austrittspfad des Kofaktors aus dem Enzyminneren ins Solvens ermittelt. Dieser ist von einer Bewegung des „safety-belt“ begleitet, welche ausgehend von der Holo-Form der Aldose Reduktase tatsächlich zu einem Endzustand führt, der der kofaktorfreen Apo-Kristallstruktur sehr ähnlich ist und durch dieselbe charakteristische  $\pi$ -Stapelwechselwirkung zwischen Trp 219 und Arg 293 charakterisiert ist. Es war also möglich, unter Zuhilfenahme der Methode der SMD den Übergang von der kofaktorgebundenen Holo-Struktur in die kofaktorfreen Apo-Struktur nachzuvollziehen. Dabei wurden auch strukturelle Charakteristika des den Kofaktorausritt begleitenden Geschehens erkannt. Lys 21 übt zusammen mit Trp 20 eine „gate-keeper“ Funktion aus. Sobald Lys 21 den  $\chi_1$ -Winkel ändert und in der Folge die von diesem Rest ausgehenden H-Brücken brechen, ändert Trp 20 auch seine Position und erlaubt dem Kofaktor ein Hindurchgleiten durch das so gebildete „gate“ aus der Tasche.

Die beschriebenen SMD-Studien wurden in dieser Doktorarbeit auch auf die Familie der Nukleären Rezeptoren ausgeweitet. Im Detail wurden der Androgen- und Estrogenrezeptor (AR und ER) untersucht. Auch diese liegen in geschlossener und offener Konformation vor, je nachdem ob ein Ligand gebunden vorliegt oder nicht. Helix 12 unterscheidet durch ihre Orientierung beide Zustände voneinander. Mit Hilfe der Methode der SMD wurden die beiden natürlichen Agonisten Testosteron und 17  $\beta$ -Estradiol jeweils aus der Ligandenbindetasche LBD des AR und ER entfernt. Die durchgeführten Analysen konnten zwar dabei nicht den vollständigen Übergang von der geschlossenen Form in die offene beschreiben, allerdings wurden essenzielle Aminosäuren identifiziert, welche für die Positionierung von Helix 12 relativ zu Helix 11 entscheidend sind und in diesem Zusammenhang für die Helix 12 Bewegung wichtig sind.

---

In dem AR System wurde dabei eindeutig Trp 741 als entscheidender Rest identifiziert, welcher einen Austrittskanal öffnet, durch den Testosteron die LBD Tasche verlassen kann, ohne dass dazu eine Helix 12 Verschiebung notwendig wäre. Auch im Falle des ER wurde eine Aminosäure mit einer solchen Schlüsselfunktion erkannt, nämlich Trp 383, durch deren Positionierung es möglich ist, dass für den Ligandenaustritt keine Verschiebung von Helix 12 notwendig ist. Darüber hinaus wurde in den Studien zum ER His 524 durch den Aufbau eines H-Brückennetzwerkes eindeutig als jener Rest hervorgehoben, dem eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung der biologisch aktiven agonistischen und offenen Rezeptorstruktur zukommt.

Für eine ganze Reihe verschiedener Inhibitoren der Aldose Reduktase existieren experimentelle, thermodynamische Bindungsdaten. Aus diesem Grund bietet sich die Aldose Reduktase auch als Modellsystem für thermodynamischen Berechnungen an. In der vorliegenden Arbeit wurden die Spirohydantoine Sorbinil und Fidarestat als Liganden gewählt, für die anhand der Methode der thermodynamischen Integration die relativen Bindungsaffinitäten ermittelt wurden. Die erhaltenen theoretischen Daten ergeben eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten und lassen eine strukturelle Interpretation zu. Eine H-Brücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom der exocyclischen Amidgruppe von Fidarestat und dem Backbone NH von Leu 300 wurde als Grund für Unterschiede in den Affinitäten bestätigt.

Diese Arbeit hat sich somit mit Hilfe von Computermethoden und auf der Basis experimenteller Daten mit mehreren Fragestellungen zu einem besseren Verständnis der molekularen Erkennung und Proteinbeweglichkeit der Aldose Reduktase (und Nukleären Rezeptoren) beschäftigt. Aldose Reduktase hat sich dabei als sehr wertvolles Modellsystem zur Untersuchung der beschriebenen Themen mit Molekulardynamik-Simulationen bewährt.

## 10 Summary

Aldose Reductase catalyzes the first step of the sorbitol pathway leading to a reduction of glucose into sorbitol. NADPH acts as cofactor. People suffering from diabetes mellitus blood show a raised glucose level and up to one third of the available glucose is processed in this way. As a consequence sorbitol accumulates in cells with insulin-independent glucose uptake and the NADPH concentration decreases. This leads to „osmotic“ as well as „oxidative“ stress, which are correlated to the late-onset diabetic complications like diabetic cataract, neuro- and nephropathy.

The enzyme is experimentally very well examined. Therefore, it can be taken as model system for the investigation of the intrinsic protein flexibility and formerly gained thermodynamic data by application of computer methods. It is in that context that Aldose Reductase is regarded as an important target for this work with the aim of getting a broader insight into molecular recognition and protein mobility by use of molecular dynamics (MD) simulations.

Aldose Reductase is a 315 amino acid long, monomeric and cytoplasmatic protein with an intrinsic flexibility mainly of its binding site. The pocket can be divided into two sub-pockets: the rather rigid anion binding pocket where the cofactor as well as the residues involved in catalysis are located and the specificity pocket. The latter can be either close or open and can lead to the accommodation of very different ligands in the binding site by the adaptation to the geometry and nature of the inhibitors. This is one of the reasons for the high substrate promiscuity of Aldose Reductase. In general, the binding pocket exists in three main conformations which correspond to those observed upon binding of Sorbinil, IDD 594 or Tolrestat. When Sorbinil binds, the specificity pocket is closed, in the two other cases it is open. The IDD 594 and Tolrestat pocket differ in their geometry and furthermore the Tolrestat-pocket was never seen with an other inhibitor bound. For this reason it was tried to stabilize the pocket by the design of Tolrestat analogues.

The two most potent derivatives of this series of naphthoisothiazole-acetic acid derivatives (namely ITA and ITB) are the subject matter of the first part of this work. Crystal structures reveal that contrary to the initial design hypothesis the specificity pocket is closed and not open. Beyond that, both inhibitors lead to different binding modes although they differ only by the length of the sidechain in the 4-position of their naphthyl moiety. The crystal structure with ITB bound shows the opening of a novel subpocket due to the rotation of Trp 20 about its  $\chi_2$  angle. Trp 20 belongs to the rather rigid anion binding pocket. As a consequence of this rotation also Lys 21 deviates from its usual positioning. In all crystal structures it builds up salt bridges to the phosphate oxygen of the cofactor NADPH and to the carboxylate side chain of Asp 216. Here Lys 21 is solvent exposed.

---

To settle the question of the reason for the different binding modes of ITA and ITB and the unique ALR2 conformation in the case of ITB binding, MD simulations were used, in which also the importance of modelling Trp 219 was investigated. Trp 219 appears not resolved in the crystal structure and was inserted in three different ways in this study.

The MD simulations of ALR2 with the bound ligands ITA and ITB were analyzed regarding the dynamic behaviour of the individual amino acids within the pocket. As a result (and in agreement with former studies of crystal structures) flexible pocket residues were identified, comprising Phe 122, Trp 219, Leu 300 and Cys 303. In the case of the ITA complex, an induced coupled movement of Phe 122 and Cys 303 was identified that forces the aromatic scaffold of the ligand in a different orientation from the crystal structure. The resulting orientation is considered as the privileged one.

Simulations were carried out with and without ligands bound. In particular the MD starting from the ITB crystal structure after ligand removal was very insightful. In the course of the simulation the novel subpocket opened by a Trp 20 rotation is closed. After 10 ns it opens again, which supports the theory of protein existence in every observable conformation independently from ligand binding. The ligand selects from those the protein conformation that is the most favourable for its binding, leading to its stabilization and dislocates the equilibrium of all possible conformations to the selected one.

Another aspect of ligand ITB binding concerns the pyramidal geometry of the sulfonamide nitrogen of the inhibitor. For an imid-type nitrogen a planar geometry should be more favourable. In all simulation studies the initial pyramidal geometry rapidly converts into the energetically more favourable planar one. Additionally executed MD simulations with changed parameters relinquishing the use of „improper torsion“ terms show the preference of the pyramidal geometry of the ligand ITB within the ALR2 pocket. The planar sulfonamide nitrogen has to be understood as a consequence of the applied force field with its „improper torsion“ terms.

As a reason for the preferred pyramidal geometry favourable interactions with the protein surroundings are supposed. The distance between an oxygen atom of the carboxylate group in the 2-position of ITB and the indole nitrogen atom is about 3 Å. A hydrogen bond between both interacting groups could be established, but this requires the pyramidal geometry at the sulfonamide nitrogen. Quantum mechanical calculations confirm the existence of this hydrogen bond.

The second part of this work applies the technique of Steered Molecular Dynamics (SMD) for the further investigation of Aldose Reductase. In the cofactor-bound holo-form of ALR2 the „safety-belt“ lies over the cofactor NADPH and holds it deeply buried inside the pocket. This closed conformation is characterized by a sulfur-aromatic interaction between Trp 219 and Cys 298. The „safety-belt“ comprises the sequence stretch from Ser 214 to Ser 226. As the cofactor leaves the binding site, the orientation of the „safety-belt“ changes dramatically. In the cofactor-unbound structure Trp 219 establishes a  $\pi$ -interaction with the guanidinium group of Arg 293 that characterizes this open conformation of apo-ALR2. Overlaying both structures, the distance between the C $\alpha$  atoms of Trp 219 is about 17 Å. SMD-simulations are able to induce, via insertion of a force to the system, unbinding of

ligands and large conformational changes in biomolecules on time scales accessible to MD simulations. Therefore, SMD is the method of choice in order to simulate and understand the transition between the existing crystal structures of the holo- and apo-form of ALR2. The application of a force to the cofactor leads to its exiting from the pocket in a definable direction. The responses of the system can be analyzed.

The most favourable cofactor exit pathway, starting from the holo-ALR2 crystal structure, is found and studied in this work. The event is accompanied by the expected „safety-belt“ movement towards an end structure that is characterized by the  $\pi$ -interaction between Trp 219 and Arg 293 and, in fact, is very similar to the cofactor-unbound apo-ALR2 crystal structure.

With the aid of SMD it was possible to understand the transition from the cofactor-bound holo-form to the cofactor-unbound apo-form and to emphasize structural characteristics that accompany the cofactor exit. Lys 21, together with Trp 20, can be defined a gate-keeper for NADP<sup>+</sup> exiting. As Lys 21 changes its  $\chi_1$  angle and the established hydrogen bonds are broken, Trp 20 also adapts its position and permits the cofactor to leave the pocket.

In this work the SMD-studies are also extended to the superfamily of Nuclear Receptors. More specifically, the Androgen and Estrogen Receptor (AR and ER) are investigated. Also Nuclear Receptors exist in two different conformations, an open and a closed one, whether a ligand is bound or not. Here, helix 12 distinguishes the both states. By the use of SMD the agonists Testosterone and 17- $\beta$ -Estradiol were pulled out of the ligand binding domain LBD of the AR and ER. The performed simulations were not able to predict the transition between closed and open receptor, but based on structural analyses essential amino acids involved in helix 12 positioning could be identified and are in this context important for the helix 12 movement. In the AR, residue Trp 741 was unambiguously identified as the residue that opens an exit channel through which Testosterone is able to leave the LBD without the necessity for helix 12 to move.

Even in the case of the ER an amino acid with key function was identified: Trp 383 allows the ligand to exit without any helix 12 repositioning. Additional ER studies stand out His 524 as the residue that is of paramount importance for maintenance of the biologically active agonistic and open receptor structure by creation of a hydrogen-bond network.

There exist lot of experimental thermodynamic data for inhibitors binding to ALR2. Therefore, ALR2 represents an important model system for thermodynamic calculations. In this work the two spirohydantoin Sorbinil and Fidarestat were selected and their relative binding affinity was determined. The values obtained by calculation are in good agreement with the experimentally measured ones and allow structural interpretations. A hydrogen bond between the carbonyl oxygen of the exocyclic amide group of Fidarestat and the Leu 300 backbone NH was confirmed as reason for differences in binding affinity.

In summary, this work has dealt with several issues of molecular recognition and protein

---

flexibility inherent to the model target ALR2 (and furthermore to the NRs) by the aid of computer methods and on the basis of experimental data. Herein, ALR2 has revealed itself as a precious model for investigation of the discussed problems by the use of MD simulations.



# Anhang A

## Verwendete Software

Die in dieser Arbeit aufgeführten Molekulardynamik-Simulationen und deren Analysen wurden mit dem AMBER Programmpaket in den Versionen 9 und 10 durchgeführt.

Die quantenmechanischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm Gaussian Version 03, Revision D.01.

Die Protonierung und Editierung der Liganden erfolgte mit dem Programm MOE in den Versionen 2007.09, 2008.10 und 2009.10 oder dem Programm Sybyl als SYBYL-X.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Kristallstrukturen wurden alle der RCSB Protein Datenbank PDB entnommen.

Zur Visualisierung und Auswertung der generierten Trajektorien wurden die Programme VMD (Version 1.8.6) und PyMOL (Version 0.99) herangezogen. Letzteres diente auch zur Erstellung aller Abbildungen.

Diagramme und Graphen wurden mit dem Programm Gnuplot 4.2 erzeugt.

# Anhang B

## Publikationen und Posterbeiträge

### B.1 Publikationen

- Nocker, M.; Handschuh, S.; Tautermann, C.; Liedl, K. R.  
Theoretical prediction of hydrogen bond strength for use in molecular modeling  
J. Chem. Inf. Model., 2009, 49 (9):2067-2076.
- Nocker, M.; Cozzini P.  
Induced Fit Simulations on Nuclear Receptors  
Curr. Top. Med. Chem., 2011, 11 (2): 133-147.
- Nocker, M.; Sotriffer, C. A.; Cozzini P.  
Steered Molecular Dynamics Studies of the Androgen Receptor; Probing the conformational transition between agonist- and antagonist-bound form  
HPC-Europa 2; Science and Supercomputing in Europa; Research Highlights 2010: 36.

### B.2 Posterbeiträge

- Nocker, M.; Sotriffer, C. A.;  
Flexibility of Aldose Reductase: Opening of a novel subpocket upon ligand binding;  
22nd „Molecular Modelling Workshop 2008“, Erlangen, Deutschland; 29.- 30. April 2008

Ausgezeichnet durch die Universität Erlangen

- M. Nocker; Sotriffer, C. A.; Cozzini, P.;  
Steered Molecular Dynamics Studies on the Androgen Receptor: Testosterone Unbinding Pathway and Helix 12 Transitions;  
TAM 2010 MEETING, Helsinki, Finnland; 15.- 17. Juni 2010

- Koch, O.; Cappel, D.; Nocker, M.; Jaeger, T.; Flohé, L.; Sotriffer, C. A.; Selzer, P. Virtual screening for TryS inhibitors using consensus pharmacophore models and ensemble docking based on MD-generated conformations; German Conference on Chemoinformatics (GCC 2010), Goslar, Deutschland; 07.- 09. November 2010
- Koch, O.; Cappel, D.; Nocker, M.; Jaeger, T.; Flohé, L.; Sotriffer, C. A.; Selzer, P. Virtual screening using structure-based consensus pharmacophore models and ensemble docking based on MD-generated conformations; 9th International Conference on Chemical Structures, Noordwijkerhout, Niederlande; 05.- 09. Juni 2011

# Tabellenverzeichnis

2.1	Docking von ITA und ITB . . . . .	10
4.1	Substrate der humanen ALR2 . . . . .	38
4.2	Pathogenetische Faktoren von Diabetes-Spätschäden . . . . .	43
4.3	ALR2-Inhibitoren . . . . .	49
5.1	B3LYP-6-31+G(d) berechnete Energien (Vakuum) . . . . .	97
5.2	B3LYP-6-31+G(d) berechnete Energien (Proteinumgebung) . . . . .	99
5.3	Energiedifferenz zwischen pyramidaler und planarer ITB-Struktur . . . . .	100
5.4	Relative H-Brücken-Häufigkeit zwischen Trp 20 und ITB . . . . .	105
5.5	Überblick über RMSD-Werte aller MD-Simulationen. . . . .	129
6.1	Gewählte Richtungen des Kofaktoraustritts . . . . .	142
6.2	Ermittelte Arbeit des Kofaktoraustritts . . . . .	164
7.1	Gewählte Richtungen des Testosteronaustritts . . . . .	175
7.2	Gewählte Richtungen des Estradiolaustritts . . . . .	189
8.1	Bindungsenergien von 2S4S-Fidarestat und 4S-Sorbinil . . . . .	207
8.2	$\lambda$ - und $w_i$ -Werte . . . . .	209
8.3	$\Delta G$ - und $\Delta\Delta G$ -Werte der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der Wildtyp-ALR2 . . . . .	212
8.4	$\Delta G$ - und $\Delta\Delta G$ -Werte der Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der ALR2 Leu300Pro Mutante . . . . .	213
8.5	$\Delta G$ - und $\Delta\Delta G$ -Werte der Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 2S4S-Fidarestat . . . . .	215
8.6	$\Delta G$ - und $\Delta\Delta G$ -Werte der Transformation von Pro 300 zu Leu 300 mit gebundenem 4S-Sorbinil . . . . .	216

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Energie-Hyperfläche der Ligandenbindung . . . . .	5
2.2	Naphtho[1,2-d]isothiazol-essigsäurederivate . . . . .	9
2.3	Bindemodi von ITA und ITB im Komplex mit ALR2 . . . . .	10
3.1	Prinzip der CV SMD . . . . .	20
3.2	Thermodynamischer Kreisprozess . . . . .	24
3.3	3-Schritt Methode der Thermodynamischen Integration . . . . .	26
4.1	Cartoon Darstellung des $(\alpha/\beta)_8$ -TIM-barrel Strukturmotivs der ALR2 . . . . .	30
4.2	2D-Darstellung der Bindetasche der ALR2 . . . . .	32
4.3	Vergleich der drei Hauptkonformationen der Bindetasche der ALR2 . . . . .	34
4.4	Reaktionsmechanismus der ALR2 . . . . .	37
4.5	Gewebekonzentration der ALR2 . . . . .	39
4.6	Physiologische Funktion der ALR2 . . . . .	40
4.7	Glukoseabbau und Sorbitol-Stoffwechselweg . . . . .	41
4.8	Entstehung von oxidativem Stress . . . . .	42
4.9	Schematischer Zusammenhang von Sorbitol-Stoffwechselweg und Diabetes-Langzeitschäden . . . . .	43
4.10	Aufbau der Nukleären Rezeptoren . . . . .	53
4.11	NR-Konformationen . . . . .	57
4.12	Helix 12 Orientierung im Androgen Rezeptor . . . . .	61
5.1	$C\alpha$ -RMSD-Werte der ITA-Komplexsimulation . . . . .	66
5.2	Überblick über die ITA-Komplexsimulation . . . . .	67
5.3	$\chi_1$ -Winkel der ITA-Komplexsimulation . . . . .	68
5.4	Kopplung der Seitenketten in der ITA-Komplexsimulation . . . . .	69
5.5	Cys 298-Ala 300 Backbone der ITA-Komplexsimulation . . . . .	70
5.6	Safety-belt-Region in der ITA-Komplexsimulation . . . . .	70
5.7	$C\alpha$ -RMSD-Werte der ITA-freien-Komplexsimulation . . . . .	71
5.8	Überblick über die ITA-freie-Komplexsimulation . . . . .	72
5.9	Verhalten von Trp 111 in der ITA-freien-Komplexsimulation . . . . .	73
5.10	Cys 298-Ala 300 Backbone der ITA-freien-Komplexsimulation . . . . .	73
5.11	$\chi_1$ -Winkel der ITA-freien-Komplexsimulation . . . . .	74
5.12	$\pi$ -Wechselwirkungen von ITB-Ligandenmolekülen . . . . .	77
5.13	Besonderheiten der ALR2-ITB-Kristallstruktur . . . . .	78
5.14	Modellierung von Trp 219 . . . . .	79

---

5.15	Variante A: RMSD-Werte der ITB-Komplexsimulation . . . . .	80
5.16	Variante A: Überblick über die ITB-Komplexsimulation . . . . .	81
5.17	Variante A: Cys 298-Ala 300 Backbone der ITB-Komplexsimulation . . . . .	82
5.18	Variante A: $\chi_1$ -Winkel der ITB-Komplexsimulation . . . . .	82
5.19	Variante A: Verhalten von Lys 21 in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	83
5.20	Variante A: Verhalten des Liganden in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	84
5.21	Variante B: RMSD-Werte der ITB-Komplexsimulation . . . . .	85
5.22	Variante B: Überblick über die ITB-Komplexsimulation . . . . .	86
5.23	Variante B: Safety-belt-Region in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	87
5.24	Variante B: Verhalten von Lys 21 und Asp 216 in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	87
5.25	Variante B: $\chi_1$ -Winkel der ITB-Komplexsimulation . . . . .	88
5.26	Variante B: Cys 298-Ala 300 Backbone der ITB-Komplexsimulation . . . . .	88
5.27	Variante B: Verhalten des Liganden in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	89
5.28	Variante C: $C\alpha$ -RMSD-Werte der ITB-Komplexsimulation . . . . .	90
5.29	Variante C: RMSD-Werte der Bindetasche der ITB-Komplexsimulation . . . . .	90
5.30	Variante C: Überblick über die ITB-Komplexsimulation . . . . .	91
5.31	Variante C: $\chi_1$ -Winkel der ITB-Komplexsimulation . . . . .	92
5.32	Variante C: Cys 298-Ala 300 Backbone der ITB-Komplexsimulation . . . . .	92
5.33	Variante C: Verhalten von Lys 21 in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	93
5.34	Variante C: Verhalten des Liganden in der ITB-Komplexsimulation . . . . .	94
5.35	H-Brücke zwischen Trp 20 und ITB . . . . .	97
5.36	Umgebung der H-Brücke zwischen Trp 20 und ITB . . . . .	98
5.37	Energiegewinn beim Übergang von pyramidalen zu planarer ITB-Struktur . . . . .	101
5.38	Definition des Winkels am Sulfonamidstickstoff von ITB . . . . .	102
5.39	Geometrie des Liganden ITB im Laufe der Equilibrierung . . . . .	103
5.40	Geometrie des Liganden ITB im Laufe der MD-Simulation . . . . .	104
5.41	Vergleich wichtiger Abstände 1 . . . . .	106
5.42	Vergleich wichtiger Abstände 2 . . . . .	107
5.43	Variante A: RMSD-Werte der ITB-freien-Komplexsimulation . . . . .	109
5.44	Variante A: Überblick über die ITB-freie-Komplexsimulation . . . . .	110
5.45	Variante A: Cys 298-Ala 300 Backbone der ITB-freien-Komplexsimulation . . . . .	111
5.46	Variante A: $\chi_1$ -Winkel der ITB-freien-Komplexsimulation . . . . .	111
5.47	Variante A: $\chi_1$ -Winkel von Trp 20, Trp 111 und Leu 300 der ITB-freien-Komplexsimulation . . . . .	112
5.48	Variante A: Verhalten von Lys 21 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	112
5.49	Variante A: Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	113
5.50	Variante B: RMSD-Werte der ITB-Komplexsimulation . . . . .	113
5.51	Variante B: Überblick über die ITB-freie Komplexsimulation . . . . .	114
5.52	Variante B: Cys 298-Ala 300 Backbone der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	115
5.53	Variante B: $\chi_1$ -Winkel der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	115

---

5.54	Variante B: Verhalten von Trp 20 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	116
5.55	Variante B: Verhalten von Lys 21 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	117
5.56	Variante B: Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	117
5.57	Variante C: RMSD-Werte der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	118
5.58	Variante C: Verhalten von Trp 219 . . . . .	119
5.59	Variante C: Überblick über die ITB-freie Komplexsimulation . . . . .	120
5.60	Variante C: Cys 298-Ala 300 Backbone der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	121
5.61	Variante C: $\chi_1$ -Winkel der ALR2-ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	121
5.62	Variante C: Verhalten von Trp 20 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	122
5.63	Variante C: Verhalten von Trp 20, Lys 21 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	122
5.64	Variante C: Verhalten von Lys 21 und Asp 216 in der ITB-freien Komplexsimulation . . . . .	123
5.65	Clusteranalyse der ITB-freien Komplexsimulationen . . . . .	126
5.66	Vergleichende Clusteranalyse aller ITB-freien Komplexsimulationen . . . . .	128
5.67	Vergleich der $\chi_1$ -Winkel aller ITA-Simulationen . . . . .	132
5.68	Vergleich der $\chi_1$ -Winkel der ITB-Komplexsimulationen . . . . .	133
5.69	Vergleich der $\chi_1$ -Winkel der ITB-freien Komplexsimulationen . . . . .	134
5.70	Vergleich der $\chi_2$ -Winkel von Trp 20 der ITB-freien Komplexsimulationen . . . . .	135
5.71	Vergleich wichtiger Abstände der ITB-freien Komplexsimulationen . . . . .	136
6.1	Apo- und Holo-Enzymform . . . . .	139
6.2	Mögliche Austrittswege nach CAVER 2.0 . . . . .	142
6.3	Gewählte Richtungen des Kofaktor-Austritts . . . . .	143
6.4	Kraftprofile in Abhängigkeit von $\vec{v}$ und $k$ . . . . .	144
6.5	Pfad A: Distanz- und Energieplots . . . . .	145
6.6	Pfad A: „safety-belt“ . . . . .	146
6.7	Pfad A: Charakteristika . . . . .	147
6.8	Pfad A: Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP <sup>+</sup> im Laufe der SMD . . . . .	148
6.9	Pfad A: C $\alpha$ -RMSD Verlauf des „safety-belts“ . . . . .	149
6.10	Pfad B: Distanz- und Energieplots . . . . .	150
6.11	Pfad B: „safety-belt“ . . . . .	151
6.12	Pfad B: Charakteristika . . . . .	152
6.13	Pfad B: Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP <sup>+</sup> im Laufe der SMD . . . . .	153
6.14	Pfad B: C $\alpha$ -RMSD Verlauf des „safety-belts“ . . . . .	153
6.15	Pfad C: Distanz- und Energieplots . . . . .	155
6.16	Pfad C: „safety-belt“ . . . . .	155
6.17	Pfad C: Charakteristika . . . . .	156
6.18	Pfad C: Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP <sup>+</sup> im Laufe der SMD . . . . .	157

6.19	Pfad C: C $\alpha$ -RMSD Verlauf des „safety-belts“	158
6.20	Pfad D: Distanz- und Energieplots	159
6.21	Pfad D: „safety-belt“	160
6.22	MD nach Pfad D-SMD: Distanz- und Energieplots	161
6.23	MD nach Pfad D-SMD: „safety-belt“	162
6.24	Pfad A-D: Kraftprofile	163
6.25	Pfad D: C $\alpha$ -RMSD Werte während verschiedener Zeitabschnitte	165
6.26	Pfad D: Charakteristika	166
6.27	Pfad D: Trp 20, Lys 21, Asp 216 und NADP <sup>+</sup> im Laufe der SMD	167
6.28	Pfad D: Nach C $\alpha$ -RMSD-Werten kolorierte ALR2	168
6.29	Pfad D: Nach C $\alpha$ -RMSD-Werten kolorierte ALR2	169
6.30	Pfad D: C $\alpha$ -RMSD Verlauf des „safety-belts“	170
6.31	MD nach Pfad D: C $\alpha$ -RMSD Verlauf des „safety-belts“	170
7.1	AR Equilibrierung: C $\alpha$ RMSD Werte	173
7.2	$\beta$ -Faltblatt im AR	174
7.3	Testosteron-Nomenklatur	175
7.4	AR LBD: Ausgewählte Aminosäuren zur Richtungsbestimmung und mit zusätzlichem harmonischem Potential	176
7.5	Pfad A-E: Kraftprofile	177
7.6	AR SMD-Simulation nach Pfad A	177
7.7	AR SMD-Simulation nach Pfad B	178
7.8	AR SMD-Simulation nach Pfad C und D	178
7.9	AR SMD-Simulation nach Pfad E	179
7.10	AR MD-Simulation nach Beschreiten des Pfades A	180
7.11	AR MD-Simulation nach Beschreiten des Pfades B	181
7.12	AR MD-Simulation nach Beschreiten des Pfades E	182
7.13	H-Brücken in der AR LBD	183
7.14	Pfad B: Bruch des H-Brückennetzwerkes	184
7.15	Pfad B: $\chi_2$ -Winkel von Trp 741	185
7.16	C $\alpha$ -RMSD Werte von Helix 12	185
7.17	Pfad E: Bruch des H-Brückennetzwerkes	186
7.18	Pfad E: $\chi_2$ -Winkel von Trp 741	187
7.19	C $\alpha$ -RMSD Werte von Helix 12	187
7.20	AR Equilibrierung: C $\alpha$ -RMSD Werte	188
7.21	Estradiol-Nomenklatur	189
7.22	ER LBD: Gewählte Aminosäuren zur Richtungsbestimmung und mit zusätzlichem harmonischem Potential	190
7.23	ER SMD-Simulation nach Pfad A	191
7.24	ER SMD-Simulation nach Pfad B	191
7.25	Pfad A-B: Kraftprofile	192
7.26	ER MD-Simulation nach Pfad B	192
7.27	ER MD-Simulation nach Pfad B im Vergleich mit Apo-RXR $\alpha$	193

---

7.28	H-Brücken in der ER LBD . . . . .	194
7.29	Pfad A: Bruch des H-Brückennetzwerkes . . . . .	195
7.30	Pfad A: Verhalten von Trp 383 . . . . .	196
7.31	Pfad A: Verhalten von Helix 12 . . . . .	197
7.32	Pfad B: Bruch des H-Brückennetzwerkes . . . . .	198
7.33	Pfad B: Verhalten von Trp 383 . . . . .	199
7.34	Pfad B: Überblick über den Ligandenaustritt . . . . .	200
7.35	Pfad B: Verhalten von His 524 . . . . .	201
7.36	Pfad B: Überblick über den Ligandenaustritt . . . . .	202
7.37	Pfad B: Einfluss auf Helix 11 und Helix 12 . . . . .	203
8.1	Strukturformeln von 4S-Sorbinil und 2S4S-Fidarestat im Vergleich . . . . .	206
8.2	Testsystem für TI-Berechnungen . . . . .	210
8.3	$dV/d\lambda$ -Werte im Simulationsverlauf . . . . .	211
8.4	$dV/d\lambda$ -Werte mit Standardabweichungen im Verlauf der alchemischen Transformation . . . . .	211
8.5	Transformation von 2S4S-Fidarestat zu 4S-Sorbinil in der Wildtyp-ALR2: Interstitielles Wasser . . . . .	212
8.6	Thermodynamischer Zyklus der Leu300Pro Mutation . . . . .	214
8.7	Thermodynamischer Zyklus der Leu300Pro Mutation:Ergebnisse . . . . .	216

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ADME</b>	Absorption Distribution Metabolism und Exkretion
<b>ADPRP</b>	2-Monophosphoadenosin 5-Diphosphoribose
<b>AGE</b>	Advanced Glycation Endproducts
<b>Ala/A</b>	Alanin
<b>ALR1</b>	Aldehyd Reduktase
<b>ALR2</b>	Aldose Reduktase
<b>AMBER</b>	Assisted Model Building with Energy Refinement
<b>AR</b>	Androgenrezeptor
<b>Arg/R</b>	Arginin
<b>ARE</b>	Androgen Response Element
<b>ARI</b>	Aldose Reduktase Inhibitor
<b>Asp/D</b>	Aspartat
<b>BSSE</b>	Basissatzsuperpositionsfehler
<b>Cys</b>	Cystein
<b>COM</b>	Center of Mass, Massenschwerpunkt
<b>DSP</b>	Diabetische Sensorimotorische Polyneuropathie
<b>ER</b>	Estrogenrezeptor
<b>Gln/Q</b>	Glutamin
<b>Glu/E</b>	Glutamat
<b>GR</b>	Glucocorticoidrezeptor
<b>GRed</b>	Glutathion Reduktase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>HF</b>	Hartree Fock
<b>His/H</b>	Histidin
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>IDD</b>	Institute for Diabetes Discovery
<b>Ile/I</b>	Isoleucin
<b>Leu/L</b>	Leucin
<b>Leu300Pro</b>	Mutation von Leu 300 in Pro 300
<b>Lys</b>	Lysin
<b>Met/M</b>	Methionin
<b>MD</b>	Molekulardynamik
<b>MMTSB</b>	Multiscale Modeling Tools in Structural Biology
<b>MR</b>	Mineralocorticoidrezeptor
<b>NADPH</b>	Nikotinamidadenindiukleotidphosphat
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid

---

<b>NR</b>	Nukleärer Rezeptor
<b>PDB</b>	Proteindatenbank
<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b><math>\beta_2</math>-PKC</b>	$\beta_2$ -Isoform der Proteinkinase C
<b>PME</b>	Particle Mesh Ewald
<b>PPAR</b>	Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptor
<b>p38-MAP</b>	Kinase P38 Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>PR</b>	Progesteronrezeptor
<b>Pro</b>	Prolin
<b>RAR</b>	Retinoidrezeptor
<b>RESP</b>	Restricted Electrostatic Potential
<b>REMD</b>	Random Expulsion Molecular Dynamics
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species/Reaktive Sauerstoffspezies
<b>SANDER</b>	Simulated Annealing using NMR-derived Energy Restraints
<b>Ser/S</b>	Serin
<b>SHD</b>	Sorbinil Dehydrogenase
<b>SMD</b>	Steered Molekulardynamik
<b>SnuRM</b>	Selektiver NR Modulator
<b>SOD</b>	Superoxid-Dismutase
<b>Thr/T</b>	Threonin
<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>Val/V</b>	Valin
<b>VDR</b>	Vitamin-D-Rezeptor
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem
<b>ZPE</b>	Zero Point Energy



# Literaturverzeichnis

- [1] Teague, S. J. Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews, Drug Discovery* **2003**, *2*, 527–541.
- [2] Cozzini, P.; Kellogg, G. E.; Spyrakis, F.; Abraham, D. J.; Costantino, G.; Emerson, A.; Fanelli, F.; Gohlke, H.; Kuhn, L. A.; Morris, G. M.; Orozco, M.; Pertinhez, T. A.; Rizzi, M.; Sotriffer, C. A. Target Flexibility: An Emerging Consideration in Drug Discovery and Design. *J. Med. Chem.* **2008**, , –.
- [3] Da Settimo, F.; Primofiore, G.; La Motta, C.; Sartini, S.; Taliani, S.; Simorini, F.; Marini, A. M.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Boldrini, E. Naphtho[1,2-d]isothiazole acetic acid derivatives as a novel class of selective aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6897–6907.
- [4] Eisenmesser, E. Z.; Millet, O.; Labeikovsky, W.; Korzhnev, D. M.; Wolf-Watz, M.; Bosco, D. A.; Skalicky, J. J.; Kay, L. E.; Kern, D. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature* **2005**, *438*, 117–121.
- [5] Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985–2993.
- [6] Pauling, L. Molecular architecture and biological reactions. *Chemical & Engineering News* **1946**, *24*, 1375–1377.
- [7] Koshland, D. E., Jr. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44*, 98–104.
- [8] Stein, R. L. A process theory of enzyme catalytic power - The interplay of science and metaphysics. *Foundation of Chemistry* **2006**, *8*, 3–29.
- [9] Freire, E. Statistical thermodynamic linkage between conformational and binding equilibria. *Adv. Protein Chem.* **1998**, *51*, 255–279.
- [10] Ma, B.; Kumar, S.; Tsai, C.-J.; Nussinov, R. Folding funnels and binding mechanisms. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 713–720.
- [11] Carlson, H. A. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 447–452.

- [12] Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H., Nussinov, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* **2002**, *47*, 409–443.
- [13] Carlson, H. A. Protein flexibility is an important component of structure-based drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 1571–1578.
- [14] Carlson, H. A.; McCammon, M. A. Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 213–218.
- [15] Böhm, H. J.; Klebe, G. What Can We Learn from Molecular Recognition in Protein-Ligand Complexes for the Design of New Drugs? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2566–2587.
- [16] Klebe, G.; Böhm, H. J. Energetic and Entropic Factors Determining Binding Affinity in Protein-Ligand Complexes. *Period. Biol.* **1998**, *100*, Supplement 2, 77–83.
- [17] Axmann, M. Protein-Ligand-Wechselwirkungen im Wirkstoffdesign: Ligandbindung an membranständige Proteine in lebenden Zellen und die Identifizierung einer Leitstruktur als entry-Inhibitor der SARS-CoV Infektion. *Dissertation, Universität Hamburg* **2007**, Department Chemie.
- [18] di Cera, E. Thermodynamic theory of site-specific binding processes in biological macromolecules. *Cambridge University Press* **1995**, Cambridge.
- [19] Gohlke, H. Entwicklung einer wissensbasierten Bewertungsfunktion zur Struktur- und Affinitätsvorhersage von Protein-Ligand-Komplexen. *Dissertation* **2000**, Fachbereich Pharmazie; Philipps-Universität Marburg.
- [20] Blake, C. C. F.; Cassels, R.; Dobson, C. M.; Poulsen, F. M.; Williams, R. J. P.; Wilson, K. S. Structure and binding properties of hen lysozyme modified at tryptophan 62. *J. Mol. Biol.* **1981**, *147*, 73–95.
- [21] Doscher, M. S.; Richards, F. M. The Activity of an Enzyme in the Crystalline State: Ribonuclease S. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2399–2406.
- [22] Clark, D. E.; Murray, C. W.; Li, J. Current Issues in De Novo Molecular Design. In *Reviews in Computational Chemistry*: Wiley-VCH, New York, Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. 1997; 11, pp 67–125.
- [23] Murcko, M. A. Current Issues in De Novo Molecular Design. In *Reviews in Computational Chemistry*: Wiley-VCH, New York, Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B. 1997; 11, pp 1–66.
- [24] Lengauer, T.; Rarey, M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 402–406.

- [25] Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *48*, 1639–1662.
- [26] Zentgraf, M.; Steuber, H.; Koch, C.; La Motta, C.; Sartini, S.; Sottriffer, C. A.; Klebe, G. How reliable are current docking approaches for structure-based drug design? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3575–3578.
- [27] Steuber, H.; Zentgraf, M.; La Motta, C.; Sartini, S.; Heine, A.; Klebe, G. Evidence for a Novel Binding Site Conformer of Aldose Reductase in Ligand-Bound State. *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 186–197.
- [28] Schlick, T. In *Molecular Modeling and Simulation. An Interdisciplinary Guide.*; Springer-Verlag, New York, 2002.
- [29] Noé, F.; Röblitz, S.; Schmidt, B.; Schüttel, C.; Weber, M. Simulation von Biomolekülen. *Freie Universität Berlin* **2009**.
- [30] Wang, J.; Cieplak, P.; Kollmann, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049–1074.
- [31] Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **2006**, *65*, 712–725.
- [32] Leach, A. R. In *Molecular Modelling: Principles and Applications*; Pearson Prentice Hall, Harlow, 2001; 2nd edition.
- [33] Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- [34] Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W. P.; Kollmann, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Testraints for Derivering Atomic Charges - The RESP Model. *J. Phys. Chem.*) **1993**, *97*, 10269–10280.
- [35] Cornell, W. P.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Kollmann, P. A. Application of RESP Charges to Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9620–9631.
- [36] Cieplak, P.; Kollman, P. A. On the use of electrostatic potential derived charges in molecular mechanics force fields. The relative solvation free energy of cis- and trans-N-methyl-acetamide. *J. Comp. Chem.* **1991**, *12*, 1232–1236.

- [37] Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot C.; Skell, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802.
- [38] Izrailev, S.; Stepaniants, S.; Isralewitz, B.; Kosztin, D.; Lu, H.; Molnar, F.; Wriggers, W.; Schulten, K. In *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas*; Steered Molecular Dynamics: Springer-Verlag, Berlin, Deuffhard P., Elermans J., Deimkuhler B., Mark A. E., Reich S., Skeel R. D. 1998; 4, pp 39–65.
- [39] Isralewitz, B.; Baudry, J.; Gullingsrud, J.; Kosztin, D.; Schulten, K. Steered molecular dynamics investigations of protein function. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, *19*, 13–25.
- [40] Jarzynski, C. Equilibrium free-energy difference from nonequilibrium measurements: A master equation approach. *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, 5018–5035.
- [41] Jarzynski, C. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *78*, 2690–2693.
- [42] Isgro, T.; Phillips, J.; Sotomayor, M.; Villa, E. In *Computational Biophysics Workshop*; University of Illinois at Urbana-Champaign; NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics, Beckman Institute, October 2007; pp 67–83.
- [43] Rathore, N.; Yan, Q.; de Pablo, J. J. Molecular simulation of the reversible mechanical unfolding of proteins. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 5781–5788.
- [44] Lu, H.; Isralewitz, B.; Krammer, A.; Vogel, V.; Schulten, K. Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 662–671.
- [45] Lu, H.; Schulten, K. Steered molecular dynamics simulation of conformational changes of immunoglobulin domain I27 interpret atomic force microscopy observations. *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 141–153.
- [46] Ho, B. K.; Agard, D. A. An Improved Strategy for Generating Forces in Steered Molecular Dynamics: The Mechanical Unfolding of Titin, e2lip3 and Ubiquitin. *PLoS ONE* **2010**, *5*, 1–9.
- [47] R. W. Zwanzig High-temperature equation of state by a perturbation method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1420–1426.
- [48] Steinbrecher, T.; Mobley, D. L.; Case, D. A. Non-linear scaling schemes for Lennard-Jones interactions in free energy calculations. *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 214108.
- [49] Jez, J. M.; Penning, T. M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions* **2001**, *130-132*, 499–525.

- [50] Hers, H. G. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *22*, 202–203.
- [51] Baumann, C. Erzeugung und Charakterisierung von Knockout-Mäusen des Maus Vas Deferens Proteins. *Dissertation* **2004**, *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie; Freie Universität Berlin*.
- [52] <http://www.med.upenn.edu/akr/>
- [53] Hyndman, D.; Bauman, D. R.; Heredia, V. V.; Penning, T. M. The ald-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions* **2003**, *143-144*, 621–631.
- [54] Jez, J. M.; Flynn, T. G.; Penning, T. M. A new nomenclature for the ald-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 639–647.
- [55] Seery, L. T.; Nestor, P. V.; FitzGerald, G. A. Molecular Evolution of the Aldo-keto Reductase Gene Superfamily. *J. Mol. Evol.* **1998**, *46*, 139–146.
- [56] Jez, J. M.; Bennett, M. J.; Schlegel, B. P.; Lewis, M.; Penning, T. M. Comparative anatomy of the aldoketo reductase superfamily. *Biochem. J.* **1997**, *326*, 625–636.
- [57] Bruce, N. C.; Willey, D. L.; Coulson A. F.; Jeffrey, J. Bacterial morphine dehydrogenase further defines a distinct superfamily of oxidoreductases with diverse functional activities. *Biochem. J.* **1994**, *299*, 805–811.
- [58] Penning, T. M.; Pawlowski, J. E.; Schlegel, B. P.; Jez, J. M.; Lin, H.-K.; Smith-Hoog, S.; Bennett, M. J.; Lewis, M. Mammalian 3- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* **1996**, *61*, 508–523.
- [59] Welle, R.; Schröder, G.; Schiltz, E.; Grisebach, H.; Schröder, J. Induced plant responses to pathogen attack analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *196*, 423–430.
- [60] Petrash, J. M.; Tarle, I.; Wilson, D. K.; Quioco, F. A. Aldose reductase catalysis and crystallography. Insights from recent advances in enzyme structure and function. *Diabetes* **1995**, *43*, 955–959.
- [61] Grundmann, U.; Bohn, H.; Obermeier, R.; Amann, E. Cloning and prokaryotic expression of a biologically active human placental aldose reductase. *DNA Cell. Biol.* **1990**, *9*, 149–157.
- [62] Nishimura, C.; Matsuura, Y.; Kokai, Y.; Akera, T.; Carper, D.; Morjana, N.; Lyons, C.; Flynn, T. G. Cloning and expression of human aldose reductase. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9788–9792.
- [63] Carper, D.; Nishimura, C.; Shinohara, T.; Dietzhold, B.; Wistow, G.; Craft, C.; Kador, P.; Kinoshita, J. H. Aldose reductase and p-crystallin belong to the same protein superfamily as aldehyde reductase. *FEBS Lett.* **1987**, *220*, 209–213.

- [64] Carpera, D. A.; Wistowa, G.; Nishimuraa, C.; Grahama, C.; Watanabe, K.; Fujii, Y.; Hayashi, H.; Hayaishi, O. A superfamily of NADPH-dependent reductases in eukaryotes and prokaryotes. *Experimental Eye Research* **1989**, *49*, 377–388.
- [65] Old, S. E.; Sato, S.; Kador, P. F.; Carper, D. A. In vitro expression of rat lens aldose reductase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, *87*, 4942–4945.
- [66] Yabe-Nishimura, C. Aldose Reductase in Glucose Toxicity: A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 21–33.
- [67] Rondeau, J.-M.; Tete-Favier, F.; Podjarny, A.; Reymann, J.-M.; Barth, P.; Biellmann, J.-F.; Moras, D. Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **1992**, *355*, 469–472.
- [68] Wilson, D. K., Bohren, K. M.; Gabbay, K. H.; Quioco, G. A. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* **1992**, *257*, 81–84.
- [69] Borhani, D. W., Harter, T. M.; Petrash, J. M. The Crystal Structure of the Aldose Reductase-NADPH Binary Complex. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24841–24847.
- [70] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank [www.pdb.org](http://www.pdb.org) *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235–242.
- [71] Brandon, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. In *Garland Publishing*; 2nd Edition, 1999.
- [72] El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Schneider, T. R.; Hazemann, I.; Ruiz, F.; Oka, M.; Joachimiak, A.; Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Mitschler, A.; Podjarny, A. Ultrahigh resolution drug design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with Fidarestat and Minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *Proteins* **2004**, *55*, 805–813.
- [73] Howard, E. I.; Sanishvili, R.; Cachau, R. E.; Mitschler, A.; Chevrier, B.; Barth, P.; Lamour, V.; Van Zandt, M.; Sibley, E.; Bon, C.; Moras, D.; Schneider, T. R.; Joachimiak, A.; Podjarny, A. Ultrahigh resolution drug design I: details of interactions in human aldose reductase-inhibitor complex at 0.66 Å. *Proteins* **2004**, *55*, 792–804.
- [74] El-Kabbani, O.; Wilson, D. K.; Petrash, J. M.; Quioco, F. A. Structural Features of the Aldose Reductase and Aldehyde Reductase Inhibitor-Binding Sites. *Mol. Vis.* **1998**, *4*, 19–25.
- [75] Oka, M.; Matsumoto, Y.; Sugiyama, S.; Tsuruta, N.; Matsushima, M. A potent aldose reductase inhibitor, (2S,4S)-6-fluoro-2', 5'-dioxospiro[chroman-4,4'-imidazolidine]-2-carboxamide (Fidarestat): its absolute configuration and interactions with the aldose reductase by X-ray crystallography. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2479–2483.

- [76] Steuber, H.; Zentgraf, M.; Podjarny, A.; Heine, A.; Klebe, G. High-resolution crystal structure of aldose reductase complexed with the novel sulfonyl-pyridazinone inhibitor exhibiting an alternative active site anchoring group. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 45–56.
- [77] Sotriffer, C. A.; Kramer, O.; Klebe, G. Probing flexibility and „induced-fit“ phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations. *Proteins* **2004**, *56*, 52–66.
- [78] Urzhumtsev, A.; Tête-Favier, F.; Mitschler, A.; Barbanton, J.; Barth, P.; Urzhumtseva, L.; Biellmann, J. F.; Podjarny, A.; Moras, D. A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* **1997**, *5*, 601–612.
- [79] Steuber, H.; Zentgraf, M.; Gerlach, C.; Sotriffer, C. A.; Heine, A.; Klebe, G. Expect the unexpected or caveat for drug designers: multiple structure determinations using aldose reductase crystals treated under varying soaking and co-crystallisation conditions. *J. Mol. Biol.* **2006**, *363*, 174–187.
- [80] Wilson, D. K.; Tarle, I.; Petrash, J. M.; Quioco, F. A. Refined 1.8 Å Structure of Human Aldose Reductase Complexed with the Potent Inhibitor Zopolrestat. *Natl Acad Sci USA* **1993**, *90*, 9847–9851.
- [81] Wilson, D. K.; Nakano, T.; Petrash, J. M.; Quioco, F. A. Structure studies of aldoketo reductase inhibition. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6*; Weiner H, Lindahl R, Crabb DW, and Flynn TG, eds, Plenum Press, New York, 1996; pp 435–442.
- [82] Davydov, V. V.; Dobaevab, N. M.; Bozhkovic, A. I. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Exp. Geront.* **2004**, *39*, 11–16.
- [83] Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**, *414*, 813–820.
- [84] Bohren, K. M.; Brownlee, J. M.; Milne, A. C.; Gabbay, K. H.; Harrison, D. H. The structure of Apo R268A human aldose reductase: hinges and latches that control the kinetic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *2*, 201–212.
- [85] De Winter, H. L.; von Itzstein, M. Aldose reductase as a target for drug design: molecular modeling calculations on the binding of acyclic sugar substrates to the enzyme. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8299–8308.
- [86] Cachau, R.; Howard, E.; Barth, P.; Mitschler, A.; Chevrier, B.; Lamour, V.; Joachimiak, A.; Sanishvili, R.; Van Zandt, M.; Sibley, E.; Moras, D.; Podjarny, A. Model of the catalytic mechanism of human aldose reductase based on quantum chemical calculations. *J. Phys. IV France* **2000**, *10*, Pr10/13–Pr10/13.

- [87] Steuber, H.; Czodrowski, P.; Sotriffer, C. A.; Klebe, G. Tracing changes in protonation: a prerequisite to factorize thermodynamic data of inhibitor binding to aldose reductase. *J. Mol. Biol.* **2007**, *373*, 1305–1320.
- [88] Ehrig, T.; Bohren, K. M.; Prendergast, F. G.; Gabbay, K. H. Mechanism of Aldose Reductase Inhibition: Binding of NADP<sup>+</sup>/NADPH and Alrestatin-like Inhibitors. *Biochemistry* **1994**, *23*, 7157–7165.
- [89] Bohren, K. M.; Grimshaw, C. E.; Lai, C. J.; Harrison, D. H.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Gabbay, K. H. Tyrosine-48 is the proton donor and histidine-110 directs substrate stereochemical selectivity in the reduction reaction of human aldose reductase: enzyme kinetics and crystal structure of the Y48H mutant enzyme. *Biochem.* **1994**, *33*, 2021–2032.
- [90] Várnai, P.; Richards, W. G.; Lyne, P. D. Modelling the catalytic reaction in human aldose reductase. *Proteins* **1999**, *37*, 218–227.
- [91] Tarle, I.; Borhani, D. W.; Wilson, D. K.; Quioco, F. A.; Petrash, J. M. Probing the active site of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77, and His-110. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25687–25693.
- [92] Kador, P. F.; Lee, Y. S.; Rodriguez, L.; Sato, S.; Bartoszko-Malik, A.; Abdel-Ghany, Y. S.; Miller, D. D. Identification of an aldose reductase inhibitor site by affinity labeling. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1313–1324.
- [93] Griffin, B. W.; McNatt, L. G. Characterization of the reduction of 3-acetylpyridine adenine dinucleotide phosphate by benzyl alcohol catalyzed by aldose reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1986**, *246*, 75–81.
- [94] Liu, S. Q.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S. K. Does sorbinil bind to the substrate binding site of aldose reductase? *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 2427–2429.
- [95] Harrison, D. H.; Bohren, K. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Gabbay, K. H. An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2011–2020.
- [96] Eisenmann, M. Struktur-basiertes Wirkstoffdesign neuer Aldose-Reduktase-Inhibitoren. *Dissertation 2007, Fakultät für Chemie und Pharmazie; Ludwig-Maximilians-Universität München.*
- [97] Matsuura, K.; Deyashiki, Y.; Bunai, Y.; Ohya, I.; Hara, A. Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *328*, 265–271.
- [98] Wermuth, B.; Monder, C. Aldose and aldehyde reductase exhibit isocorticosteroid reductase activity. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *131*, 423–426.

- [99] Tabakoff, B.; Anderson, R.; Alivisatos, S. G. A. Enzymic reduction of biogenetic aldehydes in brain. *Mol. Pharm.* **1973**, *9*, 428–437.
- [100] Turner, A. J.; Tipton, K. F. Characterization of two reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reductases from pig brain. *Biochem. J.* **1972**, *130*, 765–772.
- [101] Vander Jagt, D. L.; Robinson, B.; Taylor, K. K.; Hunsaker, L. A. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4364–4369.
- [102] Vander Jagt, D. L.; Kolb, N. S.; Vander Jagt, T. J.; Chino, J.; Martinez, F. J.; Hunsaker, L. A.; Royer, R. E. Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochem. Biophys. Acta* **1995**, *1249*, 1172–126.
- [103] Petrash, J. M.; Harter, T. M.; Murdock, G. L. A potential role for aldose reductase in steroid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, *414*, 465–473.
- [104] Kolb, N. S.; Hunsaker, L. A.; Vander Jagt, D. L. Aldose reductase-catalyzed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide toxicity. *Mol. Pharm.* **1994**, *45*, 797–801.
- [105] Feather, M. S.; Flynn, T. G.; Munro, K. A.; Kubiseski, T. J.; Walton, D. J. Catalysis of reduction of carbohydrate 2-oxoaldehydes (osones) by mammalian aldose reductase and aldehyde reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1244*, 10–16.
- [106] Vander Jagt, D. L.; Hunsaker, L. A.; Robinson, B.; Stangebye, L. A.; Deck, L. M. Aldehyde and aldose reductases from human placenta. Heterogeneous expression of multiple enzyme forms. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10912–10918.
- [107] Oates, P. J. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* **2002**, *50*, 325–392.
- [108] Cao, D.; Fan, S. T.; Chung, S. S. Identification and characterization of a novel human aldose reductaselike gene. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11429–11435.
- [109] Carr, I. M.; Markham, A. F. Molecular genetic analysis of the human sorbitol dehydrogenase gene. *Mamm. Genom.* **1995**, *6*, 645–652.
- [110] Maekawa, K.; Tanimoto, T.; Okada, S.; Suzuki, T.; Suzuki, T.; Yabe-Nishimura, C. Analysis of gene expression of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in rat Schwann cells by competitive RT-PCR method using non-homologous DNA standards. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **2001**, *8*, 219–227.

- [111] Aida, K.; Ikegishi, Y.; Chen, J.; Tawata, M.; Ito, S.; Maeda S.; Onaya, T. Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *277*, 281–286.
- [112] Burg, M. B. Molecular basis of osmotic regulation. *Am. J. Physiol.* **1995**, *268*, F983–F996.
- [113] Terubayashi, H.; Sato, S.; Nishimura, C.; Kador, P. F.; Kinoshita, J. H. Localization of aldose and aldehyde reductase in the kidney. *Kidney Int.* **1989**, *36*, 843–851.
- [114] Bagnasco, S. M.; Murphy, H. R.; Bedford, J. J.; Burg, M. B. Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. *Am. J. Physiol.* **1988**, *254*, C788–C792.
- [115] Cowley, B. D. Jr.; Ferraris, J. D.; Carper, D.; Burg, M. B. In vivo osmoregulation of aldose reductase mRNA, protein, and sorbitol in renal medulla. *Am. J. Physiol.* **1990**, *258*, F154–F161.
- [116] Kaneko, M.; Carper, D.; Nishimura, C.; Millen, J.; Bock, M.; Hohman, T. C. Induction of aldose reductase expression in rat kidney mesangial cells and Chinese hamster ovary cells under hypertonic conditions. *Exp. Cell. Res.* **1990**, *188*, 135–140.
- [117] Henry, D. N.; Del Monte, N.; Greene, D. A.; Killen, P. D. Altered aldose reductase gene regulation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **1993**, *92*, 617–623.
- [118] Ferraretto, A.; Negri, A.; Giuliani, A.; De Grada, L.; Furman Conti, A. N.; Ronchi, S. Aldose reductase is involved in long-term adaptation of EUE cells to hyperosmotic stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1175*, 283–288.
- [119] Lee, E. K.; Regenold, W. T.; Shapiro, P. Inhibition of aldose reductase enhances HeLa cell sensitivity to chemotherapeutic drugs and involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *Anticancer Drugs.* **2002**, *13*, 859–868.
- [120] Cheng, H. M.; González, R. G. The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase and senile cataractogenesis. *Metabolism* **1996**, *35*, 10–14.
- [121] González, R. G.; Barnett, P.; Aguayo, J.; Cheng, H. M.; Chylack, L. T. Jr. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* **1984**, *33*, 196–199.
- [122] Altan, V. M. The pharmacology of diabetic complications. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1317–1327.
- [123] Kinoshita, J. H.; Barber, G. W.; Merola, L. O.; Tung, B. Changes in the levels of free amino acids and myo-inositol in the galactose-exposed lens. *Invest. Ophthalmol.* **1969**, *8*, 625–632.

- [124] Lee, A. Y.; Chung, S. K.; Chung, S. S. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2780–2784.
- [125] Morre, D. M.; Lenaz, G.; Morre, D. J. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J. Exp. Biol.* **2000**, *203*, 1513–1521.
- [126] Price, S. A.; Agthong, S.; Middlemas, A. B.; Tomlinson, D. R. Mitogen-Activated Protein Kinase p38 Mediates Reduced Nerve Conduction Velocity in Experimental Diabetic Neuropathy. *Diabetes* **2004**, *53*, 1851–1856.
- [127] Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **1992**, *258*, 607–614.
- [128] Ishii, H.; Tada, H.; Isogai, S. An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor-beta and protein kinase C activity in cultured mesangial cells. *Diabetologia* **1998**, *41*, 362–364.
- [129] Keogh, R. J.; Dunlop, M. E.; Larkins, R. G. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism* **1997**, *46*, 41–47.
- [130] Kamiya, H.; Nakamura, J.; Hamada, Y.; Nakashima, E.; Naruse, K.; Kato, K.; Yasuda, Y.; Hotta, N. Polyol pathway and protein kinase C activity of rat Schwannoma cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2003**, *19*, 131–139.
- [131] Wolf, B. A.; Williamson, J. R.; Easom, R. A.; Chang, K.; Sherman, W. R.; Turk, J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 31–38.
- [132] Ha, H.; Yu, M. R.; Choi, Y. J.; Lee, H. B. Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, *38*, S204–S207.
- [133] Suzuki, L. A.; Poot, M.; Gerrity, R. G.; Bornfeldt, K. E. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis. Lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* **2001**, *50*, 851–860.
- [134] Nakamura, J.; Kasuya, Y.; Hamada, Y.; Nakashima, E.; Naruse, K.; Yasuda, Y.; Kato, K.; Hotta, N. Glucose-induced hyperproliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells through polyol pathway hyperactivity. *Diabetologica* **2001**, *44*, 480–4.
- [135] Kinoshita, J. H. Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1965**, *4*, 786–799.

- [136] Nishimura, C.; Graham, C.; Hohman, T. C.; Nagata, M.; Robinson, W. G. Jr.; Carper, D. Characterization of mRNA and genes for aldose reductase in rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *153*, 1051–1059.
- [137] Bhatnagar, A.; Ruef, J.; Liu, S.; Srivastava, S.; Srivastava, S. K. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by aldose reductase. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *130-132*, 627–636.
- [138] Gabbay, K. H.; Merola, L. O.; Field, R. A. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* **1966**, *151*, 209–210.
- [139] Ward, J. D. Diabetic neuropathy. *Br. Med. Bull.* **1989**, *45*, 111–126.
- [140] Greene, D. A.; Chakrabarti, S.; Lattimer, S. A.; Sima, A. A. Role of sorbitol accumulation and myo-inositol depletion in paranodal swelling of large myelinated nerve fibers in the insulin-deficient spontaneously diabetic biobreeding rat. Reversal by insulin replacement, an aldose reductase inhibitor, and myo-inositol. *J. Clin. Invest.* **1987**, *79*, 1479–1485.
- [141] Greene, D. A.; Lattimer, S. A.; Sima, A. A. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. J. Eng. Med.* **1987**, *316*, 599–616.
- [142] Greene, D.; The pathogenesis and prevention of diabetic neuropathy and nephropathy. *Metabolism* **1988**, *37*, 25–29.
- [143] Greene, D. A.; Lattimer, S. A.; Sima, A. A. Are disturbances of sorbitol, phosphoinositide, and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase regulation involved in pathogenesis of diabetic neuropathy? *Diabetes* **1988**, *37*, 688–693.
- [144] Lang, G. E., Kampmeier, J. Die Bedeutung der Proteinkinase C in der Pathophysiologie der diabetischen Retinopathie. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **2002**, *219*, 769–776.
- [145] Eichberg, J. Protein kinase C changes in diabetes: Is the concept relevant to neuropathy? *Int. Rev. Neurobiol.* **2002**, *50*, 61–82.
- [146] Aiello, L. P.; Bursell, S. E.; Clermont, A.; Duh, E.; Ishii, H.; Takagi, C.; Mori, F.; Ciulla, T. A.; Wachs, K.; Jirousek, M.; Smith, L. E. H.; King, G. L. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective b-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* **1997**, *46*, 1473–1480.
- [147] Koya, D.; King, G. L. Protein kinase C in diabetic renal involvement, the perspective of its inhibition. In *Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus.*; 4th Edition, 1998; 263–268.

- [148] Idris, I.; Gray, S.; Donnelly, R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. **2001**, *44*, 659–673.
- [149] Brownlee, M. The pathological implications of protein glycation. *Clin. Invest. Med.* **1995**, *18*, 275–281.
- [150] Makita, Z.; Curphey, T. J.; Moore, L. L.; Jean, S.; Brinck-Johnsen, T.; Bucala, R.; Vlassara, H. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* **1995**, *44*, 824–829.
- [151] Giugliano, D.; Ceriello, A.; Poalisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **1996**, *19*, 257–267.
- [152] West, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Med.* **2000**, *17*, 171–180.
- [153] Dincer, U. D.; Bidasee, K. R.; Güner, S.; Tay, A.; Ozçelikay, A.T.; Altan, V.M. The effect of diabetes on expression of  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-, and  $\beta$ 3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes* **2001**, *50*, 455–461.
- [154] Dincer, U. D.; Onay, A.; Ari, N.; Ozçelikay, A. T.; Altan, V. M. The effects of diabetes on  $\beta$ -adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1998**, *40*, 113–122.
- [155] Maxfield, E. K.; Love, A.; Cotter, M. A.; Cameron, N. E. Nerve function and regeneration in diabetic rats: effects of ZD-7155, an AT1 receptor antagonist. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269* (3, Pt. 1), E530–E537.
- [156] Cameron, N. E.; Cotter, M. A. Effects of a nonpeptide endothelin-1 ETA antagonist on neurovascular function in diabetic rats: interaction with the renin-angiotensin system. *JPET* **1996**, *278*, 1262–1268.
- [157] Das, B.; Srivastava, S. K. Activation of aldose reductase from human tissues. *Diabetes* **1985**, *34*, 1145–1151.
- [158] Srivastava, S. K.; Ansari, N. H.; Hair, G. A.; Awasthi, S.; Das, B. Activation of human erythrocyte, brain, aorta, muscle, and ocular tissue aldose reductase. *Metabolism* **1986**, *35*, 114–118.
- [159] Srivastava, S. K.; Heir G. A.; Das, B. Activated and unactivated forms of human erythrocyte aldose reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7222–7226.
- [160] Grimshaw, C. E.; Shahbaz, M.; Jahangiri, G.; Putney, C. G.; McKercher, S. R.; Mathur, E. J. Kinetic and structural effects of activation of bovine kidney aldose reductase. *Biochemistry* **1989**, *28*, 5343–5353.

- [161] Grimshaw, C. E.; Lai, C. J. Oxidized aldose reductase: in vivo factor not in vitro artifact. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *327*, 89–97.
- [162] Del Corso, A.; Dal Monte, M.; Vilardo, P. G.; Cecconi, I.; Moschini, R.; Banditelli, S.; Cappiello, M.; Tsai, L.; Mura, U. Site-specific inactivation of aldose reductase by 4-hydroxynonenal. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *350*, 245–248.
- [163] Cappiello, M.; Voltarelli, M.; Giannessi, M.; Cecconi, I.; Camici, G.; Manao, G.; Del Corso, A.; Mura, U. Glutathione dependent modification of bovine lens aldose reductase. *Exp. Eye Res.* **1994**, *58*, 491–501.
- [164] Chandra, A.; Srivastava, S.; Petrash, J. M.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S. K. Modification of aldose reductase by S-nitrosoglutathione. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15801–15809.
- [165] Chandra, A.; Srivastava, S.; Petrash, J. M.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S. K. Active site modification of aldose reductase by nitric oxide donors. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1341*, 217–222.
- [166] Del Corso, A.; Barsacchi, D.; Camici, M.; Garland, D.; Mura, U. Bovine lens aldose reductase: identification of two enzyme forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *270*, 604–610.
- [167] Grimshaw, C. E. Chromatographic separation of activated and unactivated forms of aldose reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278*, 273–276.
- [168] Srivastava, S. K.; Ramana, K. V.; Chandra, D.; Srivastava, S.; Bhatnagar, A. Regulation of aldose reductase and the polyol pathway activity by nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *143-144*, 333–340.
- [169] Srivastava, S. K.; Ramana, K. V.; Chandra, D.; Srivastava, S.; Bhatnagar, A. Regulation of aldose reductase and the polyol pathway activity by nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *143-144*, 333–340.
- [170] Srivastava, S.; Dixit, B. L.; Ramana, K. V.; Chandra, A.; Chandra, D.; Zacarias, A.; Petrash, J. M.; Bhatnagar, A.; Srivastava, S. K. Structural and kinetic modifications of aldose reductase by S-nitrosothiols. *Biochem. J.* **2001**, *358*, 111–118.
- [171] Yagihashi, S.; Yamagashi, S.-I.; Wada, R.-I.; Baba, M.; Hohma, T. C.; Yabe-Nishimura, C.; Kokai, Y. Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain* **2001**, *124*, 2448–2458.
- [172] Mylari, B. L.; Armento, S. J.; Beebe, D. A.; Conn, E. L.; Coutcher, J. B.; Dina, M. S.; O’Gorman, M. T.; Linhares, M. C.; Martin, W. H.; Oates, P. J.; Tess, D. A.; Withbroe, G. J.; Zembrowski, W. J. A highly selective, non-hydantoin, non-carboxylic acid inhibitor of aldose reductase with potent oral activity in diabetic rat models: 6-(5-chloro-3-methylbenzofuran-2-sulfonyl)-2-H-pyridazin-3-one. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2283–2286.

- [173] Hayman, S.; Kinoshita, J. H. Isolation and properties of lens aldose reductase. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 877–882.
- [174] Suzen, S.; Buyukbingol, E. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1329–1352.
- [175] El-Kabbani, O.; Ruiz, F.; Darmanin, C.; Chung, R.P.-T. Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 750–762.
- [176] de la Fuente, J. A.; Manzanaro, S. Aldose reductase inhibitors from natural sources. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 243–251.
- [177] Kinoshita, J. H.; Dvornik, D.; Kraml, M.; Gabbay, K. H. The effect of an aldose reductase inhibitor on the galactose-exposed rabbit lens. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *158*, 472–475.
- [178] Dvornik, D.; Simard-Duquesne, N.; Krami, M.; Sestan, K.; Gabbay, K. H.; Kinoshita, J. H.; Varma, S. D.; Merola, L. O. Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats. Control by an aldose reductase inhibitor. *Science* **1973**, *182*, 1146–1148.
- [179] Handelsman, D. J.; Turtle, J. R. Clinical trial of an aldose reductase inhibitor in diabetic neuropathy. *Diabetes* **1981**, *30*, 459–464.
- [180] Fagius, J.; Jameson, S. Effects of aldose reductase inhibitor treatment in diabetic polyneuropathy - a clinical and neurophysiological study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1981**, *44*, 991–1001.
- [181] Nicolucci, A.; Carinci, F.; Graepel, J. G.; Hohman, T. C.; Ferris, F.; Lachin, J. M. The efficacy of tolrestat in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. A meta-analysis of individual patient data. *Diabetes Care* **1986**, *19*, 1091–1096.
- [182] Didangelos, T. P.; Karamitsos, D. T.; Athyros, V. G.; Kourtoglou, G. I. Effect of Aldose Reductase Inhibition on Cardiovascular Reflex Tests in Patients with Definite Diabetic Autonomic Neuropathy Over a Period of 2 Years. *J. Diabetes Complications* **1998**, *12*, 201–207.
- [183] Sima, A. A.; Greene, D. A.; Brown, M. B.; Hohman, T. C.; Hicks, D.; Graepel, G. J.; Bochenek, W. J.; Beg, M.; Gonen, B. Effect of hyperglycemia and the aldose reductase inhibitor tolrestat on sural nerve biochemistry and morphometry in advanced diabetic peripheral polyneuropathy. *J. Diabetes Complications* **1991**, *7*, 157–169.
- [184] Foppiano, M.; Lombardo, G. Worldwide pharmacovigilance systems and tolrestat withdrawal. *Lancet.* **1997**, *349*, 399–400.
- [185] Tomlinson, D. R.; Townsend, J.; Fretten, P. Prevention of defective axonal transport in streptozocin-diabetic rats by treatment with "Statil" (ICI 128436), an aldose reductase inhibitor. *Diabetes* **1985**, *34*, 970–972.

- [186] Sundkvist, G.; Armstrong, F. M.; Bradbury, J. E.; Chaplin, C.; Ellis, S. H.; Owens, D. R.; Rosén, I.; Sönksen, P. Peripheral and autonomic nerve function in 259 diabetic patients with peripheral neuropathy treated with ponalrestat (an aldose reductase inhibitor) or placebo for 18 months. United Kingdom/Scandinavian Ponalrestat Trial. *J. Diabetes Complications* **1992**, *6*, 123–130.
- [187] Greene, D. A.; Sima, A. A. Effects of aldose reductase inhibitors on the progression of nerve damage. *Diabet. Med.* **1993**, *10 Suppl. 2*, 31S–32S.
- [188] Greene, D. A.; Arezzo, J. C.; Brown, M. B.; the Zenarestat Study Group. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. *Neurology* **1999**, *53*, 580–591.
- [189] Beyer-Mears, A.; Mistry, K.; Diecke, F. P.; Cruz, E. Zopolrestat prevention of proteinuria, albuminuria and cataractogenesis in diabetes mellitus. *Pharmacology* **1996**, *52*, 292–302.
- [190] Arezzo, J. C.; Klioze, S. S.; Peterson M. J. Efficacy and safety results of a phase II multicenter study of the aldose reductase inhibitor zopolrestat in patients with peripheral symmetrical diabetic polyneuropathy. *Diabetes* **1996**, *45 Suppl. 2*, 276A.
- [191] Goto, Y.; Hotta, N.; Shigeta, Y.; Sakamoto, N.; Kikkawa, R. Effects of an aldose reductase inhibitor, epalrestat, on diabetic neuropathy. Clinical benefit and indication for the drug assessed from the results of a 210 References placebo-controlled double-blind study. *Biomed. Pharmacother.* **1995**, *49*, 269–277.
- [192] Hotta, N.; Sakamoto, N.; Shigeta, Y.; Kikkawa, R.; Goto, Y. Clinical investigation of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic neuropathy in Japan: multicenter study. Diabetic Neuropathy Study Group in Japan. *J. Diabetes Complications* **1996**, *10*, 168–172.
- [193] Nakayama, M.; Nakamura, J.; Hamada Y.; Chaya, S.; Mizubayashi, R.; Yasuda, Y.; Kamiya, H.; Koh, N.; Hotta, N. Aldose reductase inhibition ameliorates pupillary light reflex and F-wave latency in patients with mild diabetic neuropathy. *Diabetes Care* **2001**, *24*, 1093–1098.
- [194] Baba, M.; Kimura, K.; Suda, T.; Yagihashi, S.; Aomori Diabetic Study (ADNS) Group. Three-year inhibition of aldose reductase on development of symptomatic neuropathy in diabetic patients. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2006**, *11*, 176–178.
- [195] Okayama, N.; Omi, H.; Okouchi, M.; Imaeda, K.; Kato, T.; Akao, M.; Imai, S.; Shimizu, M.; Fukutomi, T.; Itoh, M. Mechanisms of inhibitory activity of the aldose reductase inhibitor, epalrestat, on high glucose-mediated endothelial injury: Neutrophil-endothelial cell adhesion and surface expression of endothelial adhesion molecules. *J. Diabetes Complications* **2002**, *16*, 321–326.

- [196] Peterson, M. J.; Sarges, R.; Aldinger, C. E.; MacDonald, D. P. CP-45,634: a novel aldose reductase inhibitor that inhibits polyol pathway activity in diabetic and galactosemic rats. *Metabolism* **1979**, *28*, 456–461.
- [197] Kurono, M.; Fujiwara, I.; Yoshida, K. Stereospecific interaction of a novel spirosuccinimide type aldose reductase inhibitor, AS-3201, with aldose reductase. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8216–8226.
- [198] Hamada, Y.; Nakamura, J. Clinical potential of aldose reductase inhibitors in diabetic neuropathy. *Treat Endocrinol.* **2004**, *3*, 245–255.
- [199] Pitts, N. E.; Gundersen, K.; Mehta, D. J.; Vreeland, F.; Shaw, G. L.; Peterson, M. J.; Collier, J. Aldose reductase inhibitors in clinical practice. Preliminary studies on diabetic neuropathy and retinopathy. *Drugs* **1986**, *32 Suppl. 2*, 30–35.
- [200] Jennings, P. E.; Nightingale, S.; Le Guen, C.; Lawson, N.; Williamson, J. R.; Hoffman, P.; Barnett, A. H. Prolonged aldose reductase inhibition in chronic peripheral diabetic neuropathy: effects on microangiopathy. *Diabet. Med.* **1990**, *7*, 63–68.
- [201] Malamas, M. S.; Hohman, T. C.; Millen, J. Novel Spirosuccinimide Aldose Reductase Inhibitors Derived from Isoquinoline-1,3-diones: 2-[(4-Bromo-2-fluorophenyl)methyl]-6-fluorospiro[isoquinoline-4(11H),3'-pyrrolidine]-1,2',3,5'(2H)-tetrone and Congeners. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2043–2058.
- [202] Hohman, T. C.; Mend, X. U.; Tse S. The ARI-509 development team: enhanced biochemical efficacy of the novel aldose reductase inhibitor, ARI-509, in human tissues. *Diabetes* **1996**, *45 Suppl. 2*, 5A.
- [203] Griffin, B. W.; McNatt, L. G.; Chandler, M. L.; York, B. M. Effects of two new aldose reductase inhibitors, AI-1567 and AI-1576, in diabetic rats. *Metabolism* **1987**, *36*, 486–490.
- [204] Kato, K.; Nakayama, K.; Ohta, M.; Murakami, N.; Murakami, K.; Mizota, M.; Miwa, I.; Okuda, J. Effects of novel hydantoin derivatives with aldose reductase inhibiting activity on galactose-induced cataract in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **1990**, *54*, 355–364.
- [205] Hirata, Y.; Fujimori, S.; Okada, K. Effect of a new aldose reductase inhibitor, 8'-chloro-2',3'-dihydrospiro [pyrrolidine-3,6'(5'H)-pyrrolo[1,2,3-de] [1,4]benzoxazine]-2,5,5'-trione (ADN-138), on delayed motor nerve conduction velocity in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism* **1988**, *37*, 159–163.
- [206] Dundar, B.; Bozdog-Dundar, O.; Can-Eke, B.; Coban, T.; Iscan, M.; Buyukbingol, E. Synthesis and antioxidative properties of novel thiazolidinedione/imidazolidinedione compounds as retinoids. *Pharmazie* **2002**, *57*, 438–441.

- [207] Costantino, L.; Rastelli, G.; Gamberini, M. C.; Barlocco, D. Pharmacological approaches to the treatment of diabetic complications. *Exp. Op. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1245–1262.
- [208] Oliver, W. R. Jr.; Shenk, J. L.; Snaith, M. R.; Russell, C. S.; Plunket, K. D.; Bodkin, N. L.; Lewis, M. C.; Winegar, D. A.; Sznajdman, M. L.; Lambert, M. H.; Xu, H. E.; Sternbach, D. D.; Kliewer, S. A.; Hansen, B. C.; Willson, T. M. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5306–5311.
- [209] Willson, T. M.; Lambert, M. H.; Kliewer, S. A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 341–367.
- [210] Asano, T.; Saitob, Y.; Kawakamic, M.; Yamadad, N.; Fidarestat Clinical Pharmacology Study Group. Fidarestat (SNK-860), a potent aldose reductase inhibitor, normalizes the elevated sorbitol accumulation in erythrocytes of diabetic patients. *J. Diabetes Complications* **2002**, *16*, 133–138.
- [211] Asano, T.; Saito, Y.; Kawakami, M.; Yamada, N.; Sekino, H.; Hasegawa, S.; Fidarestat Clinical Pharmacology Study Group. Erythrocytic sorbitol contents in diabetic patients correlate with blood aldose reductase protein contents and plasma glucose levels, and are normalized by the potent aldose reductase inhibitor fidarestat (SNK-860). *J. Diabetes Complications* **2004**, *18*, 336–342.
- [212] Sobajima, H.; Aoki, T.; Sassa, H.; Suzuki, T.; Taniko, K.; Makino, M.; Mizuno, K.; Suzuki, T. Pharmacological properties of fidarestat, a potent aldose reductase inhibitor, clarified by using sorbitol in human and rat erythrocytes. *Pharmacology* **2001**, *62*, 193–199.
- [213] Uehara, K.; Yamagishi, S.-I.; Otsuki, S.; Chin, S.; Yagihashi, S. Effects of polyol pathway hyperactivity on protein kinase C activity, nociceptive peptide expression, and neuronal structure in dorsal root ganglia in diabetic mice. *Diabetes* **2004**, *53*, 3239–3247.
- [214] Kato, N.; Yashima, S.; Suzuki, T.; Nakayama, Y.; Jomori, T. Long-term treatment with fidarestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats. *J. Diabetes Complications* **2003**, *17*, 374–379.
- [215] Drel, V. R.; Pacher, P.; Stevens, M. J.; Obrosova, I. G. Aldose reductase inhibition counteracts nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic rat kidney and high-glucose-exposed human mesangial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 1454–1465.
- [216] Hotta, N.; Toyota, T.; Matsuoka, K.; Shigeta, Y.; Kikkawa, R.; Kaneko, T.; Takahashi, A.; Sugimura, K.; Koike, Y.; Ishii, J.; Sakamoto, N.; The SNK-860 Diabetic

- Neuropathy Study Group. Clinical efficacy of fidarestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic peripheral neuropathy: a 52-week multicenter placebo-controlled double-blind parallel group study. *Diabetes Care* **2001**, *24*, 1776–1782.
- [217] Petrova, T.; Steuber, H.; Hazemann, I.; Cousido-Siah, A.; Mitschler, A.; Chung, R.; Oka, M.; Klebe, G.; El-Kabbani, O.; Joachimiak, A.; Podjarny, A. Factorizing selectivity determinants of inhibitor binding toward aldose and aldehyde reductases: structural and thermodynamic properties of the aldose reductase mutant Leu300Pro-fidarestat complex. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5659–5665.
- [218] El-Kabbani, O.; Carbone, V.; Darmanin, C.; Oka, M.; Mitschler, A.; Podjarny, A.; Schulze-Briese, C.; Chung, R. P. Structure of aldehyde reductase holoenzyme in complex with the potent aldose reductase inhibitor fidarestat: implications for inhibitor binding and selectivity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5536–5542.
- [219] Bril, V.; Hirose, T.; Tomioka, S.; Buchanan, R.; The Ranirestat Study Group. Ranirestat for the Management of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 1256–1260.
- [220] Varma, S. D.; Mikuni, I.; Kinoshita, J. H. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. *Science* **1975**, *188*, 1215–1216.
- [221] Costantino, L.; Rastelli, G.; Gamberini, M. C.; Vinson, J. A.; Bose, P.; Iannone, A.; Staffieri, M.; Antolini, L.; Del Corso, A.; Mura, U.; Albasini, A. 1-Benzopyran-4-one antioxidants as aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1881–1893.
- [222] Severi, F.; Benvenuti, S.; Costantino, L.; Vampa, G.; Melegari, M.; Antolini, L. Synthesis and activity of a new series of chalcones as aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 859–866.
- [223] Iwata, S.; Nagata, N.; Omae, A.; Yamaguchi, S.; Okada, Y.; Shibata, S.; Okuyama, T. Inhibitory effect of chalcone derivatives on recombinant human aldose reductase. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 323–325.
- [224] Jung, S. H.; Lee, Y. S.; Lee, S.; Lim, S. S.; Kim, Y. S.; Shin, K. H. Isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis* and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin induced diabetic rat tissues *Arch. Pharm. Res.* **2002**, *25*, 306–312.
- [225] Matsuda, H.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Yoshikawa, M. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2002**, *50*, 788–795.
- [226] Iinuma, M.; Tanaka, T.; Mizuno, M.; Katsuzaki, T.; Ogawa, H. Structure-activity correlation of flavonoids for inhibition of bovine lens aldose reductase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1989**, *37*, 1813–1815.

- [227] Miyamoto, S. Recent advances in aldose reductase inhibitors: potential agents for the treatment of diabetic complications. *Expert. Opin. Ther. Patents* **2002**, *12*, 621–631.
- [228] Costantino, L.; Rastelli, G.; Vianello, P.; Cignarella, P.; Barlocco, D. Diabetes Complications and their potential prevention: Aldose Reductase Inhibition and other Approaches. *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 3–23.
- [229] Hendlich, M.; Bergner, A.; Günther J.; Klebe, G. Relibase: Design and development of a database for comprehensive analysis of protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 607–620.
- [230] Najmanovich, R.; Kuttner, J.; Sobolev, V.; Edelman, M. Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins* **2000**, *39*, 261–268.
- [231] Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- [232] Ward, W. H.; Cook, P. N.; Mirrlees, D. J.; Brittain, D. R.; Preston, J.; Carey, F.; Tuffin, D. P.; Howe, R. Inhibition of aldose reductase by (2,6-dimethylphenylsulphonyl)nitromethane: possible implications for the nature of an inhibitor binding site and a cause of biphasic kinetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1993**, *328*, 301–311.
- [233] Calcutt, N. A.; Li, L.; Yaksh, T. L.; Malmberg, A. B. Different effects of two aldose reductase inhibitors on nociception and prostaglandin E. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *285*, 189–187.
- [234] DeRuiter, J.; Davis, R. A.; Wandrekar, V. G.; Mayfield, C. A. Relative structure-inhibition analyses of the N-benzoyl and N-(phenylsulfonyl) amino acid aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2120–2126.
- [235] DeRuiter, J.; Brubaker, A. N.; Garner, M. A.; Barksdale, J. M.; Mayfield, C. A. In vitro aldose reductase inhibitory activity of substituted Nbenzenesulfonylglycine derivatives. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 149–152.
- [236] Nakai, N.; Fujii, Y.; Kobashi, K.; Nomura, K. Aldose reductase inhibitors: flavonoids, alkaloids, acetophenones, benzophenones, and spirohydantoin of chroman. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *239*, 491–496.
- [237] Yoshikawa, M.; Morikawa, T.; Murakami, T.; Toguchida, I.; Harima, S.; Matsuda, H. Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmanetype sesquiterpenes, kikkanols A, B, and C, from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1999**, *47*, 340–345.
- [238] Yoshikawa, M. Saponin-containing tea flower extracts, pharmaceutical compositions, and health foods for absorption inhibition of neutral lipids and sugar, and gastric

- mucosal membrane protection. In *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*; Nihon Yakuyo Shokuhin Kenkyusho K. K., Japan; Harima Kanpo Seiyaku K. K., Japan, 2006; p. 28 pp.
- [239] Terasawa, K.; Adachi, I.; Kato, A. Evodiae fructus extracts containing N,N-dimethyl-5-methoxytryptamine as aldose reductase inhibitors and antidiabetics. In *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*; Nihon Yakuyo Shokuhin Kenkyusho K. K., Japan; Harima Kanpo Seiyaku K. K., Japan, 2006; p. 7 pp.
- [240] Kinoshita, T.; Miyake, H.; Fujii, T.; Takakura, S.; Goto, T. The structure of human recombinant aldose reductase complexed with the potent inhibitor zenarestat. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 622–626.
- [241] Ruiz, F.; Hazemann, I.; Mitschler, A.; Joachimiak, A.; Schneider, T.; Karplus, M.; Podjarny, A. The crystallographic structure of the aldose reductase-IDD 552 complex shows direct proton donation from tyrosine 48. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1347–1354.
- [242] Calderone, V.; Chevrier, B.; Van Zandt, M.; Lamour, V.; Howard, E.; Poterszman, A.; Barth, P.; Mitschler, A.; Lu, J.; Dvornik, D. M.; Klebe, G.; Kraemer, O.; Moorman, A. R.; Moras, D.; Podjarny, A. The structure of human aldose reductase bound to the inhibitor IDD384. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 536–540.
- [243] Sestanjanj, K.; Bellini, F.; Fung, S.; Abraham, N.; Treasurywala, A.; Humber, L.; Simard-Duquesne, N.; Dvornik, D. N-[5-(trifluoromethyl)-6-methoxy-1-naphthalenyl]thioxomethyl]-N-methylglycine (Tolrestat), a potent, orally active aldose reductase inhibitor. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 255–256.
- [244] Stribling, D.; Mirrlees, D. J.; Harrison, H. E.; Earl, D. C. N. Properties of ICI 128,436, a novel aldose reductase inhibitor, and its effects on diabetic complications in the rat. *Metabolism* **1985**, *43*, 336–344.
- [245] Mylari, B. L.; Larson, E. R.; Beyer, T. A.; Zembrowski, W. J.; Aldinger, C. E.; Dee, M. F.; Siegel, T. W.; Singleton, D. H. Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl] methyl]-1-phthalazineacetic acid (zopolrestat) and congeners. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 108–122.
- [246] Tanaka, Y.; Sawamoto, T.; Suzuki, A.; Kimura, T. Pharmacokinetics of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, in male and female diabetic rats. *Drug Metab. Dispos.* **1993**, *21*, 677–681.
- [247] Terashima, H.; Hama, K.; Yamamoto, R.; Tsuboshima, M.; Kikkawa, R.; Hatanaka, I.; Shigeta, Y. Effects of a new aldose reductase inhibitor on various tissues in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *229*, 226–230.
- [248] Sarges, R.; Peterson, M. J. Sorbinil: A Member of the Novel Class of Spirohydantoin Aldose Reductase Inhibitors. *Metabolism* **1986**, *35*, 101–104.

- [249] Negoro, T.; Murata, M.; Ueda, S. Novel, highly potent aldose reductase inhibitors: (R)-(-)-2-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-4-spiro-3'-pyrrolidine-1,2',3,5'-tetrone (AS-3201) and its congeners. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4118–4129.
- [250] Mizuno, K.; Kato, N.; Matsubara, A.; Nakano, K.; Kurono, M. Effects of a new aldose reductase inhibitor, (2S, 4S)-6-fluoro-2',5'-dioxospiro[chroman-4,4'-imidazolidine]-2-carboxamide (SNK-860), on the slowing of motor nerve conduction velocity and metabolic abnormalities in the peripheral nerve in acute streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism* **1992**, *41*, 1081–1086.
- [251] Sohda, T.; Mizuno, K.; Imamiya, E.; Tawada, H.; Meguro, K.; Kawamatsu, Y.; Yamamoto, Y. Studies on antidiabetic agents. III. 5-Arylthiazolidine-2,4-diones as potent aldose reductase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 3601–3616.
- [252] Van Zandt, M. C.; Sibley, E. O.; Combs, K. J. et al. Design and synthesis of novel inhibitors of aldose reductase for the treatment of diabetic complications. *218th ACS National Meeting* **1999**, New Orleans, American Chemical Society
- [253] Kompella, U. B.; Sunkara, G.; Thomas, E. et al. Rabbit corneal and conjunctival permeability of the novel aldose reductase inhibitors: N-[[4-(benzoylamino)phenyl]sulphonyl]glycines and N-benzoyl-Nphenylglycines. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 921–927.
- [254] Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. Å; Laudet, V. Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily. *Nature* **2004**, *3*, 950–964.
- [255] Laudet, V.; Gronemeyer, H. In *The Nuclear Receptor Facts Book*; San Diego; Academic Press, 2001.
- [256] Bourguet, W.; Germain, P.; Gronemeyer, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *TiPS* **2000**, *21*, 381–388.
- [257] Bain, D. L.; Heneghan, A. F.; Connaghan-Jones, K. D.; Miura, M. T. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 201–220.
- [258] Birnbaumer, M.; Schrader, W. T.; O'Malley, B. W. Assessment of structural similarities in chick oviduct progesterone receptor subunits by partial proteolysis of photoaffinity-labeled proteins. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 7331–7337.
- [259] Wrange, O.; Okret, S.; Radojcic, M.; Carlstedt-Duke, J.; Gustafsson, J. A. Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4534–4541.

- [260] McEwan, I.J.; Lavery, D.; Fischer, K.; Watt, K. Natural disordered sequences in the aminoterminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nuclear Receptor Signaling* **2007**, *5*, 1–6.
- [261] Hard, T.; Kellenbach, E.; Boelens, R.; Maler, B. A.; Dahlman, K.; Freedman, L. P.; Carlstedt-Duke, J.; Yamamoto, K. R.; Gustafsson, J. A.; Kaptein, R. Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* **1990**, *249*, 157–160.
- [262] Baumann, H.; Paulsen, K.; Kovacs, H.; Berglund, H.; Wright A. P. Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13463–13471.
- [263] Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *TRENDS in Biochemical Sciences* **2001**, *26*, 384–390.
- [264] Cutress, M. L.; Whitaker, H. C.; Mills, I. G.; Stewart, M.; Neal, D. E. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J. of Cell Science* **2008**, *121*, 957–968.
- [265] Bourguet, W.; Ruff, M.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature* **1995**, *375*, 377–382.
- [266] Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **1988**, *240*, 889–895.
- [267] Weatherman, R. V.; Fletterick R. J.; Scanlan, T. S. Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 559–581.
- [268] Robinson-Rechavi, M.; Carpentier, A. S.; Duffraisse, M.; Laudet, V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *TRENDS in Genetic.* **2001**, *17*, 554–556
- [269] Egea, P. F.; Klaholz, B. P.; Moras, D. Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Letters* **2000**, *476*, 62–67.
- [270] Brzozowski, A. M.; Pike, A. C.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T., Engström, O.; Öhman, L.; Greene, G. L.; Gustafsson, J.-Å; Carlquist, M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **1997**, *389*, 753–758.
- [271] Xu, H. E.; Stanley, T. B.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Shearer, B. G.; Cobb, J. E.; McKee, D. D.; Galardi, C. M.; Plunket, K. D.; Nolte, R. T.; Parks, D. J.; Moore, J. T.; Kliewer, S. A.; Willson, T. M.; Stimm, J. B. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR $\alpha$ . *Nature* **2002**, *415*, 813–817.

- [272] Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **1995**, *95*, 927–937.
- [273] Darimont, B. D.; Wagner, R. L.; Apriletti, J. W.; Stallcup, M. R.; Kushner, P. J.; Baxter, J. D.; Fletterick, R. J.; Yamamoto, K. R. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *GD* **1998**, *12*, 3342–3356.
- [274] Hur, E.; Pfaff, S. J.; Payne, E. S.; Grøn, H.; Buehrer, B. M.; Fletterick, R. J. Recognition and Accommodation at the Androgen Receptor Coactivator Binding Interface. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 1303–1312.
- [275] Nettles, K. W.; Greene, G. L. Ligand control of coregulator recruitment of nuclear receptor. *Annu. Rev. Physiol.* **2004**, *67*, 309–333.
- [276] Nolte, R. T.; Wisely, G. B.; Wstin, S.; Cobb, J. E.; Lambert, M. H.; Kurokawa, R.; Rosenfeld, M. G.; Wilson, T. M., Glass, C. K.; Milburn, M. V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Nature* **1998**, *395*, 137–143.
- [277] Watkins, R. E.; Wisely, G. B.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Lambert, M. H.; Williams, S. P.; Wilson, T. M.; Kliewer, S. A.; Redinbo, M. R. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* **2001**, *292*, 2329–2333.
- [278] Kenny, P. W. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* **2009**, *63*, 142–148.
- [279] Heinlein, C. A.; Chang, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer *Endocrine Reviews* **2004**, *25*, 276–308.
- [280] Szmulewitz, R. Z.; Posadas, E. M. Antiandrogen therapy in prostate cancer *Update on cancer therapeutics 2* **2007**, 119–131.
- [281] Jemal, A.; Clegg, L. X.; Ward, E.; Ries, L. A.; Wu, X.; Jamison, P. M. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival *Cancer* **2004**, *101*, 3–27.
- [282] Sack, J. S.; Kish, K. F.; Wang, C.; Attar, R. M.; Kiefer, S. E.; An Y.; Wu, G. Y.; Scheer, J. E.; Salvati, M. E.; Krystek, Jr., S. R. ; Weinmann, R.; Einspahr, H. M. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *101*, 4904–4909.
- [283] Huggins C. Two Principles in Endocrine Therapy of Cancers: Hormone Deprivation and Hormone Interference. *Cancer Res.* **1965**, *25*, 1163–1167.

- [284] Denis, L. J.; Griffiths, K. Endocrine Treatment in Prostate Cancer. *Semin. Surg. Oncol.* **2000**, *18*, 52–74.
- [285] Georget, V.; Lobaccaro, J. M.; Terouanne, B.; Mangeat, P.; Nicolas, J. C.; Sultan, C. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* **1997**, *129*, 17–26.
- [286] Jenster, G.; van der Korput, H. A.; van Vroonhoven, C.; van der Kwast, T. H.; Trapman, J.; Brinkmann, A. O. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol. Endocrinol.* **1991**, *5*, 1396–1404.
- [287] Claessens, F.; Verrijdt, G.; Schoenmakers, E.; Haelens, A.; Peeters, B.; Verhoeven, G.; Rombauts, W. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *76*, 23–30.
- [288] Roche P. J.; Hoare, S. A.; Parker, M. G. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 2229–2235.
- [289] Fang, H.; Tong, W.; Branham, W. S.; Moland, C. L.; Dial, S. L.; Hong, H.; Xie, Q.; Perkins, R.; Owens, W.; Sheehan, D. M. Study of 202 Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1338–1358.
- [290] Dalton, J. T.; Mukherjee, A.; Zhu, Z.; Kirkovsky, L.; Miller, D. D. Discovery of Nonsteroidal Androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 1–4.
- [291] Lill, M. A.; Winiger, F.; Vedani, A.; Ernst, B. Impact of Induced Fit on Ligand Binding to the Androgen Receptor: A Multidimensional QSAR Study To Predict Endocrine-Disrupting Effects of Environmental Chemicals. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5666–5674.
- [292] Kuil, C. W.; Berrevoets, C. A.; Mulder, E. Ligand-induced Conformational Alterations of the Androgen Receptor Analyzed by Limited Trypsinization. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27569–27576.
- [293] Kallio, P. J.; Janne, O. A.; Palvimo, J. J. Agonists, but not antagonists, alter the conformation of the hormone-binding domain of androgen receptor. *Endocrinology* **1994**, *134*, 998–1001.
- [294] Tsai, M.-J.; O'Malley, B. W. Molecular Mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev.* **1994**, *63*, 451–486.
- [295] Beatson, G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestion for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* **1896**, *2*, 104–107.

- [296] Jensen, E. V.; Jacobson, H. I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent. Prog. Horm. Res.* **1962**, *18*, 387–414.
- [297] Toft, D.; Gorski, J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1965**, *55*, 1574–1581.
- [298] Toft, D.; Shyamala, G.; Gorski, J. A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1967**, *57*, 1740–1743.
- [299] Jensen, E. V.; Suzuki, T.; Kawashima, T.; Stumpf, W. E.; Jungblut, P. W.; DeSombre, E. R. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1968**, *59*, 632–638.
- [300] Hawkins, M. B.; Thornton, J. W.; Crews, D.; Skipper, J. K.; Dotte, A.; Thomas, P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 10751–10756.
- [301] Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; und Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 5925–5930.
- [302] Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* **1996**, *392*, 49–53.
- [303] Tremblay, G. B.; Tremblay, A.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Labrie, F.; Giguère, V. Cloning, chromosomal localization and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 353–365.
- [304] Ogawa, S.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Hiroi, H.; Orimo, A.; Hosoi, T.; Ouchi, Y.; Muramatsu, M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *243*, 122–126.
- [305] Dechering, K.; Boersma, C.; Mosselman, S. Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 561–576.
- [306] Ing, N. H.; Beekman, J. M.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17617–17623.
- [307] Pietras, R.; Szego, C. Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* **1975**, *253*, 357–359.
- [308] Pietras, R.; Szego, C. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **1977**, *265*, 69–72.

- [309] Cell membrane and nuclear estrogen receptors derive from a single transcript: Studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expressed in CHO cells. *Mol. Endocrinol.* **1999**, *13*, 307–313.
- [310] Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E. III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K. M.; Wang, B.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Schafmeister, C.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Kollmann, P. A. AMBER 9 *University of California* **2006**, San Francisco.
- [311] Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E. III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K.M.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Wu, X.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Mathews, D. H.; Schafmeister, C.; Ross, W. S.; Kollman, P. A. AMBER 10 *University of California* **2008**, San Francisco.
- [312] Case, D. A.; Cheatham, T. E. III; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M. Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- [313] Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz Jr., K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollmann, P. A. A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleicacids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.
- [314] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A. Gaussian 03, Revision C.02, *Gaussian, Inc.* **2004**, Wallingford CT.
- [315] Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A: Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 247–260.

- [316] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollmann, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [317] Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D. A. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, *55*, 383–394.
- [318] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. P.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- [319] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- [320] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 33–38.
- [321] DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. <http://www.pymol.org> **2002**.
- [322] <http://www.phy.ornl.gov/csep/CSEP/CORNELL/TUTORIAL/PLOTMTV/OVERVIEW.html>.
- [323] Zentgraf, M. Characterization of Binding Pocket Flexibility of Aldose Reductase. *Dissertation* **2006**, *Fachbereich Pharmazie; Philipps-Universität Marburg*.
- [324] Chemical Computing Group, MOE - Molecular Environment Version 2006.08 <http://www.chemcomp.com>
- [325] Nocker, M., Handschuh, S.; Tautermann, C.; Liedl, K. R. Theoretical Prediction of Hydrogen Bond Strength for Use in Molecular Modeling. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2067–2976.
- [326] Reynisson, J.; McDonald, E. Tuning of hydrogen bond strength using substituents on phenol and aniline: A possible ligand design strategy. *J. Comput. Aided Molec. Design* **2004**, *18*, 421–431.
- [327] Hao, J.; Tanner, S. W.; Thompson, N.; Cheatham, T. E. Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 2312–2334.
- [328] Karpen, M. E.; Tobias, D. J.; Brooks, D. L. III. Statistical clustering techniques for the analysis of long molecular dynamics trajectories: analysis of a 2.2-ns trajectories of YPGDV. *Biochemistry* **1993**, *32*, 412–420.
- [329] Shenkin, P. S.; McDonald, P. Q. Cluster analysis of molecular conformations. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 899–916.

- [330] MacQueen, J. B. In *Proc. of the fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*; Some methods for classification and analysis of multivariate observation: Univ. of California Press., In Le Cam; L. M. and Neyman, J. 1967; 1, pp 281–297.
- [331] Feig, M. J.; Karanicolas, J.; Brooks, C. L. MMTSB Tool Set: enhanced sampling and multiscale modeling methods for applications in structural biology. *J. Mol. Graph. Model.* **2004**, *22*, 377–395.
- [332] Ryle, C. M.; Tipton, K. F. Kinetic studies with the low- $K_m$  aldehyde reductase from ox brain. *Biochem. J.* **1985**, *227*, 621–627.
- [333] Boghosian, R. A.; McGuinness, E. T. Pig Brain Aldose Reductase: A kinetic study using the centrifugal fast analyzer. *Int. J. Biochem.* **1981**, *13*, 909–914.
- [334] Grimshaw, C. E.; Shahbaz, M.; Putney, C. G. Mechanistic basis for nonlinear kinetics of aldehyde reduction catalyzed by aldose reductase. *Biochem.* **1990**, *29*, 9947–9955.
- [335] Kubiseski, T. J.; Hyndman, D. J.; Morjana, N. A.; Flynn, T. G. Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6510–6517.
- [336] Várnai, P.; Warshel, A. Computer Simulation Studies of the Catalytic Mechanism of Human Aldose Reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3849–3860.
- [337] Kubiseski, T. J.; Flynn, T. G. Studies on Human Aldose Reductase: Probing the role of Arginine 268 by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16911–16917.
- [338] Evans, E.; Ritchie, K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1541–1555.
- [339] Izrailev, S.; Stepaniants, S.; Balsera, M.; Oono, Y.; Schulten, K. Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1568–1581.
- [340] Medek, P.; Benes, P.; Sochor, J. Computation of Tunnels in Protein Molecules Using Delaunay Triangulation. *Journal of WSCG* **2007**, *15*, 107–114.
- [341] Medek, P.; Benes, P.; Sochor, J. In *Multicriteria tunnel computation*; ACTA Press: Innsbruck, Austria, 2008; pp 57–61.
- [342] Medek, P.; Benes, P.; Sochor, J. In *Proceedings of Visual Computing for Biomedicine*; Computation of more channels in protein molecules; Eurographics Association: Airla-Ville, Switzerland, 2008; pp 45–51.
- [343] Niu, C.; Xu, Y.; Xu, Y.; Luo, X.; Duan, W.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Zhu, W.; Chen, K.; Shen, J.; Jian, H. Dynamic Mechanism of E2020 Binding to Acetylcholinesterase: A Steered Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23730–23738.

- [344] Pereira de Jesús-Tran, K.; Côté, P. L.; Cantin, L.; Blanchet, J.; Labrie, F.; Breton, R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 987–999.
- [345] Celik, L.; Lund, J. D.; Schiott, B. Conformational dynamics of the estrogen receptor a: Influence of binding site structure on protein dynamics and biological function studied by MD simulations. *Biochem.* **2007**, *46*, 1743–1758.
- [346] Kosztin, D.; Izrailev, S.; Schulten, K. Unbinding of Retinoic Acid from its Receptor Studied by Steered Molecular Dynamics. *Biophys. J.* **1999**, *176*, 188–197.
- [347] Grubmüller, H.; Heymann, B.; Tavan, P. Ligand binding and molecular mechanics calculation of the streptavidin-biotin rupture force. *Science* **1996**, *271*, 997–999.
- [348] Leech, J.; Prins, J.; Hermans, J. SMD: visual steering of molecular dynamics for protein design. *IEEE Comp. Sci. & Eng.* **1996**, *3*, 38–45.
- [349] Carlsson, P.; Burendahl, S.; Nilsson, L. Unbinding of retinoic acid from the retinoic acid receptor by random expulsion molecular dynamics. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3151–3161.
- [350] Uppenberg, J.; Svensson, C.; Jaki, M.; Bertilsson, G.; Jendeberg, L.; Berkenstam, A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31108–31112.
- [351] Petrova, T.; Steuber, H.; Hazemann, I.; Cousido-Siah, A.; Mitschler, A.; Chung, R.; Oka, M.; Klebe, G.; El-Kabbani, O.; Joachimiak, A.; Podjarny, A. Factorizing Selectivity Determinants of Inhibitor Binding toward Aldose and Aldehyde Reductases: Structural and Thermodynamic Properties of the Aldose Reductase Mutant Leu300Pro-Fidarestat Complex. *J. Med. Chem.* **2005**, *55*, 805–813.
- [352] El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Schneider, T. R.; Hazemann, I.; Ruiz, F.; Oka, M.; Joachimiak, A.; Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Mitschler, A.; Podjarny, A. Ultrahigh resolution drug design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with Fidarestat and Minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *PROTEINS* **2004**, *48*, 5659–5665.
- [353] Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E. III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Merz, K.M.; Pearlman, D. A.; Crowley, M.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Wu, X.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Mathews, D. H.; Schafmeister, C.; Ross, W. S.; Kollman, P. A. In *Amber 10 Users' Manual; University of California, San Francisco, 2008; pp 105*.

- [354] El-Kabbani, O.; Darmanin, C.; Oka, M.; Schulze-Briese, C.; Tomizaki, T.; Hazemann, I.; Mitschler, A.; Podjarny, A. High-resolution structures of human aldose reductase holoenzyme in complex with stereoisomers of the potent inhibitor Fidarestat: stereospecific interaction between the enzyme and a cyclic imide type inhibitor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4530–4537.
- [355] Zhao, H.-T.; Hazemann, I.; Mitschler, A.; Carbone, V.; Joachimiak, A.; Ginell, S.; Podjarny, A.; El-Kabbani, O. Unusual Binding Mode of the 2S4R Stereoisomer of the Potent Aldose Reductase Cyclic Imide Inhibitor Fidarestat (2S4S) in the 15 K Crystal Structure of the Ternary Complex Refined at 0.78 Å Resolution: Implications for the Inhibition Mechanism. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1478–1481.
- [356] Yamaguchi, T.; Miura, K.; Usui, T.; Unno, R.; Matsumoto, Y.; Fukushima, M.; Mizun, K.; Kondo, Y.; Baba, Y.; Kurono, M. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 2-substituted-6-fluoro-2,3-dihydrospiro [4H-1-benzopyran-4, 4'-imidazolidine]-2',5'-diones. *Arzneimittelforschung* **1994**, *44*, 344–348.