

Aus dem Institut für Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor:
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

**Bestimmung der Bindungsepitope
von Trifluormethylketonen
als Inhibitoren der Pankreaslipase
mit Hilfe der NMR-Spektroskopie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-

Vorgelegt von
Maïke Wolff
aus Bielefeld

Lübeck, 2005

Dekan:	Prof. Dr. E. Hartmann, Universität zu Lübeck
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Peters, Universität zu Lübeck, Institut für Chemie
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Meyer, Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie
Tag der mündlichen Prüfung:	17.06.2005
Zum Druck genehmigt:	17.06.2005

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3

Verwendete Abkürzungen 7

Verwendete Substanzen 8

1 Einleitung 9

1.1 Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt 9

1.1.1 Fettverdauung in der Mundhöhle 9

1.1.2 Fettverdauung im Magen 10

1.1.3 Fettverdauung im Dünndarm 10

1.1.4 Resorption der Lipolyseprodukte..... 11

1.2 Anatomie des Pankreas und Struktur von Pankreaslipase, Colipase und Gallensäuren 12

1.2.1 Anatomie und Funktion des Pankreas 12

1.2.2 Struktur von Pankreaslipase 12

1.2.3 Struktur von Colipase..... 13

1.2.4 Struktur von Gallensäuren 14

1.3 Biologische Funktion von Pankreaslipase, Colipase und Gallensäuren..... 15

1.3.1 Biologische Funktion von Pankreaslipase 15

1.3.2 Biologische Funktion der Colipase 18

1.3.3 Biologische Funktion von Galle und Gallensäuren..... 18

1.4 Erkrankungen, die mit der Pankreaslipase in Verbindung stehen 19

1.4.1 Akute Pankreasinsuffizienz 19

1.4.2 Chronische Pankreasinsuffizienz 19

1.4.3 Obesitas 20

1.4.3.1 Lipaseinhibition durch Orlistat 20

2 Problemstellung 22

3 Theorie 24

3.1 Bindung von Liganden an Proteine 24

3.1.1 Bindungskinetik..... 24

3.1.2 Kompetitive Inhibition 25

3.2 Enzymkinetik..... 26

3.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik 26

3.2.2	Inhibierung	28
3.2.2.1	Reversible Inhibierung.....	28
3.2.2.2	Irreversible Inhibierung	31
3.3	NMR-Spektroskopie	34
3.3.1	Das STD-Experiment	35
3.3.2	¹³ C-NMR-Spektren mit und ohne Protonenkopplung	37
3.3.3	¹⁹ F-NMR-Spektroskopie	38
3.3.4	Das HSQC-Experiment und das HMBC-Experiment.....	38
3.3.5	INADEQUATE-Experimente	38
3.4	Molecular Modeling	39
3.4.1	Grundlagen	39
3.4.2	Quantenmechanische Methoden	40
	<i>Ab-initio-Methode</i>	40
	<i>Semi-empirische Methoden</i>	40
3.4.3	Molekülmechanik	41
	<i>Energieminimierung</i>	41
	<i>Docking-Verfahren</i>	42
4	Experimenteller Teil	43
4.1	Geräte	43
4.2	Chemikalien	43
4.3	Molecular Modeling.....	43
4.4	Methoden	44
4.4.1	Enzymaktivitätassays.....	44
4.4.1.1	Durchführung des <i>p</i> -Nitrophenylpalmitatassays	44
4.4.1.2	Durchführung des Olivenölassays.....	46
4.4.2	NMR Experimente.....	47
4.4.2.1	Herstellung der Enzymlösung.....	47
4.4.2.2	Herstellung der Inhibitorlösungen.....	47
4.4.2.3	Tributyrinlösung.....	50
4.4.2.4	Verschiebungsreagenzien für die NMR-Messungen	50
4.4.2.5	Bedingungen für die NMR-Messungen	50
4.4.2.6	Bedingungen für die STD-Messungen	51

5 Ergebnisse und Diskussion	52
5.1 STD-Ergebnisse zur Protease 3C	52
5.2 Enzymkinetik der Pankreaslipase. Inhibition der Pankreaslipase durch Trifluormethylketone im Vergleich zu Orlistat.....	52
5.2.1 Stabilität in wässriger Lösung	53
5.2.2 Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels	54
5.2.3 Stabilität in einer Wasser-DMSO-Mischung	56
5.2.4 Notwendigkeit von Colipase für die Aktivitätstests und für die NMR-Messungen.....	59
5.2.5 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m von rekombinanter menschlicher Pankreaslipase (rhPI) und porciner Pankreaslipase (pPI) unter Verwendung des Substrates <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat	60
5.2.6 Inhibition der porcinen Pankreaslipase durch Trifluormethylketone	61
5.2.6.1 Reversible oder irreversible Bindung der Trifluormethylketone an die Pankreaslipase.....	62
5.2.6.2 Einfluss von Präinkubation und Temperatur auf die inhibitorische Wirkung der Trifluormethylketone.....	64
5.2.6.3 Einfluss der Präinkubation auf die inhibitorische Wirkung von Orlistat	66
5.3 NMR-Ergebnisse zu Trifluormethylketonen als Inhibitoren der porcinen Pankreaslipase	69
5.3.1 Bestimmung der Löslichkeit der Trifluormethylketone mittels ^1H -NMR-Spektroskopie	70
5.3.1.1 Micellbildung von Trifluormethylketonen	70
5.3.1.2 Trifluormethylketone, die zur Aggregatbildung neigen bzw. nahezu löslich in einem D_2O - d_6 -DMSO-Gemisch sind.....	76
5.3.2 Signalzuordnung für die Trifluormethylketone.....	80
5.3.2.1 ^1H -NMR-Spektroskopie	80
5.3.2.2 ^{13}C -NMR-Spektroskopie.....	83
5.3.2.3 ^{19}F -NMR-Spektroskopie	85
5.3.2.4 HSQC- und HMBC-Experimente	86
5.3.2.5 INADEQUATE-Experimente.....	90
5.3.2.6 Ergebniszusammenfassung	95
5.3.2.7 Signalzuordnungen für weitere Trifluormethylketone	96
5.3.3 <i>Group epitope mapping</i> von porciner Pankreaslipase gebunden an Trifluormethylketone.....	101
5.3.3.1 STD-NMR-Experimente zu den Trifluormethylketonen mit porciner Pankreaslipase.....	102
5.3.3.2 Ergebniszusammenfassung des <i>group epitope mapping</i> von porciner Pankreaslipase an Trifluormethylketone	114

5.4	<i>Molecular Modeling</i>	115
5.4.1	Trifluormethylketon B 10646964	115
5.4.2	Trifluormethylketon B 10682871	117
5.5	Ergebnisdiskussion	119
6	Zusammenfassung	128
7	Literaturverzeichnis	129
8	Anhang	136
8.1	Spektren	136
8.2	Verwendete Pulsprogramme	141
8.2.1	Standardexperimente (Bruker)	141
8.2.2	1D STD	141
	Lebenslauf	143
	Danksagung	144

Verwendete Abkürzungen

Asp	Aspartat
CMC	kritische Micellbildungskonzentration
1D, 2D	ein-, zweidimensional
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
D ₂ O	deutertes Wasser
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FT	Fourier Transformation
GEM	<i>Group Epitope Mapping</i>
His	Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration bei 50 %-iger Inhibition
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer
K	Kelvin
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _I	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
pNpp	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
pPI	porcine Pankreaslipase
ppm	<i>parts per million</i>
rhPI	rekombinante humane Pankreaslipase
Ser	Serin
STD	Sättigungstransfer-Differenz
STD _{ampl.fac}	<i>STD Amplification Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit

Verwendete Substanzen

Verwendete Substanzen	IUPAC-Bezeichnung
B 10646964	6,6,6-Trifluoro-1-(4-methoxyphenyl)hexan-1,5-dion
B 10682871	1-[4-(2-Cyclohexylethoxy)phenyl]-6,6,6-trifluorohexan-1,5-dion
B 10683207	6,6,6-Trifluoro-1-[4-tetradecyloxy)phenyl]hexan-1,5-dion
B 10551089	1,1,1-Trifluoro-6-(4-methoxyphenyl)hexan-2-on
B 10539242	1,1,1-Trifluoro-5-(4-methylphenoxy)pentan-2-on
B 10694628	1,1,1-Trifluoroundecan-2,6-dion
Orlistat	(1S)-1-{[(3S-4S)-3-Hexyl-2-oxo-4-oxethanyl]methyl}dodecyl-(2S)-2-formylamino-4-methylpentanoat
Tributylin	Glyceroltributytrat

1 Einleitung

Im Vergleich zu niedermolekularen Wirkstoffen ist der Einsatz von Enzymen als Arzneistoffe aufgrund ihrer hohen Diversität und Komplexität mit besonderen Schwierigkeiten behaftet. Ein Problem in der therapeutischen Anwendung von Enzymen ist, dass das Enzym an die richtige Stelle im Körper gelangen muss. Je nach Enzym sind unterschiedliche Anwendungsformen zu wählen. Zu diesen zählen die intravenöse, subkutane und perorale Anwendung. Enzyme, die peroral angewendet werden, sind u. a. die Pankreasenzyme. Zu diesen Enzymen gehören die pankreatische Lipase, Amylasen und Proteasen, die z. B. bei Pankreasinsuffizienz als Arzneimittel verabreicht werden. Bei Verdauungsenzymen ist es allerdings nicht erwünscht, dass sie resorbiert werden, da sie lokal im Zwölffingerdarm, dem Duodenum, wirken sollen. Weiterhin ist es möglich, Enzyme mit Hemmstoffen zu blockieren und somit ihre physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozesse zu hemmen. Mit einem Inhibitor zur Blockade der Pankreaslipase ist es möglich, den Triglyceridabbau im Zwölffingerdarm zu verhindern.

1.1 Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt

Die Verdauung von Nahrungsfetten findet in verschiedenen Kompartimenten des Gastrointestinaltrakts statt. Diese Kompartimente umfassen die Mundhöhle mit dem Speichel, den Magen und den Darm, der aus Dünndarm und Dickdarm besteht. Der Dünndarm als wichtigster Abschnitt zur Aufnahme von Nahrungsbestandteilen setzt sich aus Duodenum, Jejunum und Ileum zusammen.

1.1.1 Fettverdauung in der Mundhöhle

In der Mundhöhle findet der erste Kontakt mit der Nahrung statt. Bei Kontakt mit der Nahrung wird reflektorisch die Speichelproduktion angeregt. Der Speichel ist eine wässrige Elektrolytlösung mit verschiedenen Makromolekülen wie α -Amylase und verschiedenen Glykoproteinen. Für die aufgenommenen Nahrungsfette findet in der Mundhöhle nur eine Mischung mit dem Speichel statt. Die Nahrung wird zerkleinert. Eine Verdauung der Fette findet nicht statt.

1.1.2 Fettverdauung im Magen

Nachdem der Speisebrei die Mundhöhle verlassen hat, gelangt dieser durch die Speiseröhre in den Magen. Durch die gastrische Lipase werden Triglyceride aus aliphatischen Fettsäuren, die mindestens drei Kohlenstoffatome enthalten, in freie Fettsäuren und 2-Monoglyceride gespalten. Für die maximale Aktivität der gastrischen Lipase wird eine Emulgierung der Nahrungsfette benötigt. Die Emulgierung erfolgt durch amphiphile Moleküle, die durch die Lipolyse entstehen. Außerdem sind für die Lipolyse im Magen neben der gastrischen Lipase noch weitere Verdauungsenzyme und Phospholipide verantwortlich. Für Jahrzehnte wurde die gastrische Lipolyse im Vergleich zur Lipolyse im Duodenum als unbedeutend angesehen. Die Wichtigkeit wurde erkannt, als festgestellt werden konnte, dass Patienten mit einem Mangel an Pankreaslipase trotzdem Nahrungsfette aufnehmen (Lapey *et al.*, 1974). Die gastrische Lipase liegt im menschlichen Magen in den Hauptzellen vor, die auch Pepsinogen bilden (Moreau *et al.*, 1988a). In *in vitro* Experimenten verliert die gastrische Lipase ihre Aktivität nach 3 Stunden Präinkubation bei 37 °C, wenn der pH-Wert > 7 ist. Im Gegensatz dazu verliert die Pankreaslipase unter diesen Versuchsbedingungen bei einem pH-Wert < 5,5 ihre Aktivität (Carrière *et al.*, 1993). Signale für die Produktion von gastrischer Lipase sind die Magenmotilität, die cholinergen Einflüsse und die Nahrungsaufnahme an sich (Carrière *et al.*, 1993). Die Hormone Cholezystokinin und Sekretin haben keinen Einfluss auf die Sekretion der gastrischen Lipase (Moreau *et al.*, 1988b).

1.1.3 Fettverdauung im Dünndarm

Durch die Bewegungen des Dünndarms wird der Speisebrei mit den Verdauungssäften, besonders dem Pankreassaft und der Galle, intensiv durchmischt. Zusammen mit der Colipase und den Gallensäuren wirkt die Pankreaslipase an der Lipolyse im Duodenum mit. Wie schon in Kapitel 1.1.2 beschrieben, spaltet die Lipase Triglyceride in freie Fettsäuren und 2-Monoglyceride. Die Lipolyse im Duodenum ist verglichen zur Lipolyse im Magen wesentlich effektiver, da die Pankreaslipase etwa 80 % der Triglyceride hydrolysiert (Carrière *et al.*, 1993). Die Abgabe von Pankreassaft und Pankreaslipase in das Duodenum wird durch die gastrointestinalen Hormone Cholezystokinin und Sekretin geregelt, die aus endokrinen Zellen in der Dünndarmschleimhaut freigesetzt werden. Werden

diese Hormone inhibiert, wird auch die Sekretion von Pankreassaft und -lipase gehemmt (Hildebrand *et al.*, 1998). Die gastrische Lipase wird nicht beeinflusst.

1.1.4 Resorption der Lipolyseprodukte

Die während des Verdauungsvorgangs entstandenen Lipolyseprodukte werden von Enterozyten resorbiert. Kurzkettige und mittelkettige Fettsäuren und Glycerol werden direkt aufgenommen, während die 2-Monoacylglyceride, Cholesterol, langkettige Fettsäuren und Lysophospholipide in Micellen, die durch die Gallensalze gebildet werden, von den Enterozyten resorbiert werden. Nach der Passage durch die Enterozytenzellmembran werden langkettige Fettsäuren und 2-Monoglyceride in den Enterozyten wieder zu Triglyceriden resynthetisiert. In ähnlicher Weise werden auch Phospholipide und Cholesterol erneut gebildet. Triglyceride, Phospholipide und Cholesterol werden, mit einer besonderen Proteinhülle umgeben, als so genannte Chylomikronen in die Lymphbahn abgegeben und gelangen so in das Blut. Die kurz- und mittelkettigen Fettsäuren sowie das Glycerol und daraus gebildete Triglyceride diffundieren von den Enterozyten direkt ins Blut (Abb. 1.1).

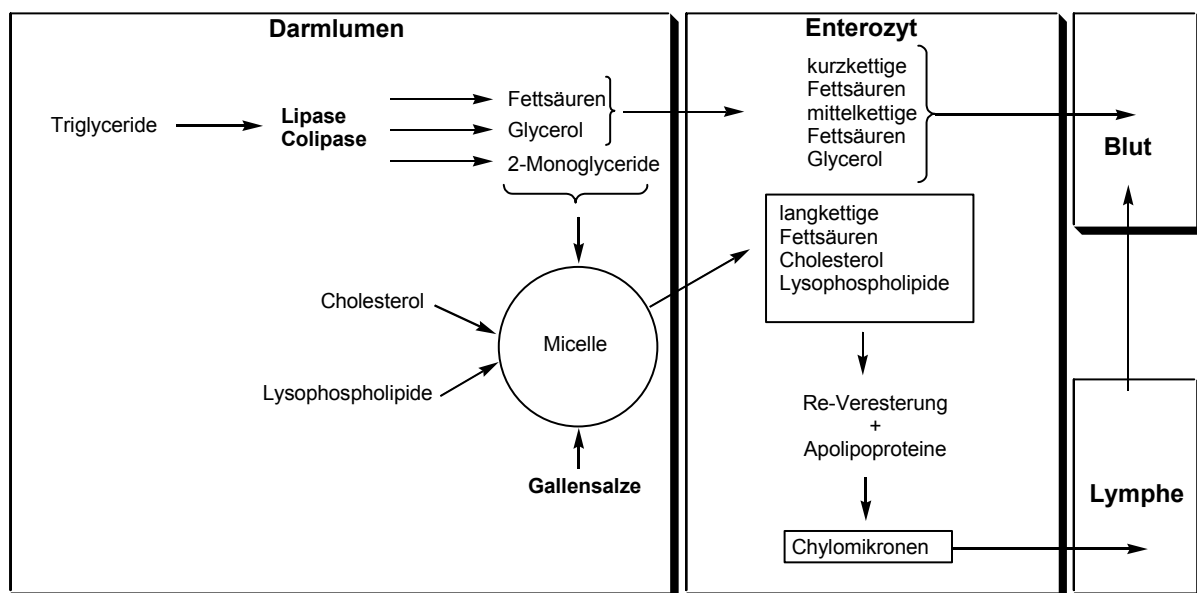


Abb. 1.1 Fettverdauung und Resorption der Lipolyseprodukte. Triglyceride werden im Darmlumen durch Colipase und Lipase in Fettsäuren und 2-Monoglyceride gespalten, micellar gelöst und aus den Micellen in den Enterozyten aufgenommen. Die in der Zelle aus langkettigen Fettsäuren und 2-Monoglyceriden resynthetisierten Triglyceride gelangen, mit einer Eiweißhülle versehen, als Chylomikronen in die Lymphe. Kurz- und mittelkettige freie Fettsäuren werden nach der Resorption direkt ins Blut abgegeben (Abbildung nach Thews *et al.*, 1999).

1.2 Anatomie des Pankreas und Struktur von Pankreaslipase, Colipase und Gallensäuren

Um die biologische Funktion der Pankreaslipase, der Colipase und der Gallensäuren zu verstehen, wird zunächst ein kurzer Überblick über deren Struktur und über die Anatomie und Funktion des Pankreas gegeben. Lipolytische Enzyme sind unverzichtbar für die Verdauung von Fetten. Lipasen sind Enzyme, die ubiquitär in Säugetieren, Menschen und Pflanzen vorkommen.

1.2.1 Anatomie und Funktion des Pankreas

Das Pankreas ist ein lang gestrecktes, etwa 100 g schweres Organ, das im Oberbauch hinter dem Magen liegt. Unterschieden werden drei Teile: der Pankreaskopf, der Pankreaskörper und der Pankreasschwanz. Das Organ wird in seiner gesamten Länge von einem Ausführungsgang durchzogen, der meist mit dem zum Teil im Pankreaskopf verlaufenden Gallengang gemeinsam ins Duodenum mündet.

Die Hauptmasse des Organs bildet der sekretorische Anteil. Die beerenförmigen Drüsenendstücke (Acini) der Azinuszellen weisen viele Zymogengranula auf, welche die Enzyme bzw. ihre Vorstufen enthalten. Die Drüsenendstücke stehen mit den Ausführungsgängen in Verbindung. So gelangen die Enzyme in das Duodenum.

Die Langerhans-Inseln, die vor allem im Pankreasschwanz liegen, sind für die Bildung von Insulin und Glukagon verantwortlich.

Das exokrine Pankreas produziert täglich etwa 2 l eines alkalischen Sekrets, das neben Elektrolyten eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme für die Verdauung enthält. Dazu gehört auch die Pankreaslipase, die für die Spaltung der Nahrungstriglyceride verantwortlich ist. Bei Bedarf werden die Komponenten in den Zwölffingerdarm sekretiert. Allerdings macht die Lipase bei Säugetieren und Menschen nur 1 – 3 % der Proteine im Pankreassaft aus.

1.2.2 Struktur von Pankreaslipase

Bei der Pankreaslipase handelt es sich um ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 38 kDa. Sie besteht aus 449 Aminosäuren. Für die Hydrolyse der Triglyceride ist die Aminosäure Serin 152 verantwortlich. Das Serin bildet zusammen mit Aspartat 176 und Histidin 263 die katalytische Triade (Abb. 1.2). Die

Triade liegt in der N-terminalen Domäne des Enzyms. Außerdem gehört zum katalytischen Zentrum eine Oxyanion-Höhle, wie sie bei Serin-Proteasen beobachtet wird (Winkler *et al.*, 1990; Blow, 1991; Roussel *et al.*, 1999). Das aktive Zentrum der Pankreaslipase wird durch ein Lid aus 23 Aminosäuren verschlossen. Dieses Lid wird durch die Colipase geöffnet. Zwischen der humanen und der porcinen Pankreaslipase besteht eine 86%ige Identität der Aminosäuren (Winkler *et al.*, 1990) und auch die katalytische Triade ist konserviert.

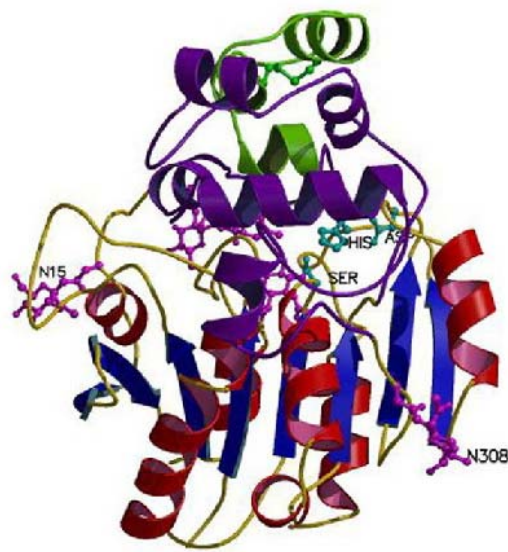


Abb. 1.2 Struktur der Pankreaslipase mit der Kennzeichnung der Aminosäuren des aktiven Zentrums. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um das Serin 152 (Ser), das Aspartat 176 (Asp) und das Histidin 263 (His).

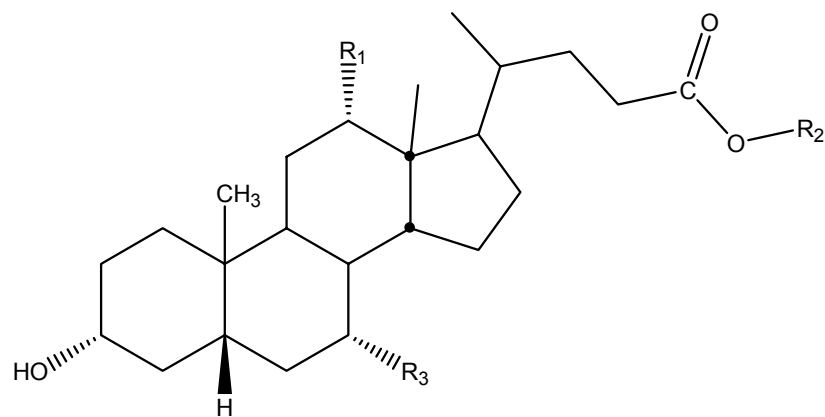
1.2.3 Struktur von Colipase

Die Colipase ist ein kleines Pankreasprotein mit einem Molekulargewicht von 10 kDa. Sie zeigt eine große Stabilität gegenüber pH-Wertschwankungen, Hitze und organischen Lösungsmitteln. In Substratabwesenheit bindet die Colipase an den nicht-katalytischen C-Terminus der Pankreaslipase (van Tilbeurgh *et al.*, 1992; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Bei der Anlagerung von Lipase an die Phasengrenze kommt es zu einer Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Lipase, die zu einer zweiten Bindungsstelle für die Colipase führt (Egloff *et al.*, 1995). Die Colipase gelangt so in Kontakt mit dem Lid der Lipase, welches das aktive Zentrum der Lipase bedeckt und dieses dadurch öffnet. Strukturell stellt die Colipase drei Finger dar. Die

Oberfläche der Colipase kann unterteilt werden in einen hydrophilen Teil, der an die Lipase bindet, und einen hydrophoben Teil, den Spitzen der Finger, die für die Wechselwirkungen zu der Phasengrenze zwischen den Lipiden und der wässrigen Phase verantwortlich sind. So wird der Lipase der Kontakt zur Phasengrenze erleichtert (Egloff *et al.*, 1995).

1.2.4 Struktur von Gallensäuren

Die Struktur der Gallensäuren leitet sich vom Cholesterol ab. Unterschieden wird zwischen primären, direkt in den Leberzellen gebildeten Säuren wie Cholsäure und Chendesoxycholsäure und sekundären Säuren wie Desoxycholsäure und Lithocholsäure, die durch Rezirkulation in die Leber gelangen (Abb. 1.3).



	R ₁ =	R ₂ =	R ₃ =
Cholsäure	OH	H	OH
Chendesoxycholsäure	H	H	OH
Desoxycholsäure	OH	H	H
Lithocholsäure	H	H	H

Abb. 1.3 Strukturen der wichtigsten Gallensäuren.

1.3 Biologische Funktion von Pankreaslipase, Colipase und Gallensäuren

Pankreaslipase, Colipase und Gallensäuren tragen entscheidend zur Fettverdauung im Duodenum bei. Sie werden in verschiedenen Organen gebildet und bei Bedarf in das Duodenum sezerniert.

1.3.1 Biologische Funktion von Pankreaslipase

Zunächst werden die Pankreasenzyme als inaktive Form, auch Zymogene genannt, in der Bauchspeicheldrüse gebildet. Bei Bedarf werden sie u. a. durch Kinasen, wie z. B. die Enterokinase, oder durch das Enzym selbst (Autokatalyse) in die aktive Form überführt. Die Enzyme werden im Pankreassaft in das Duodenum abgegeben. Der Pankreassaft enthält neben der Lipase weitere für die Verdauung wichtige Enzyme, wie zum Beispiel Amylase und Trypsin, und Elektrolyte. Die Pankreaslipase bildet zusammen mit der Amylase, einem Enzym zur Spaltung von Kohlenhydraten, die Ausnahme und wird bereits in der aktivierten Form sezerniert. Stimuliert wird die Bildung der Lipase durch die Hormone Cholezystokinin und Sekretin, die im Darm vorkommen (Zieve *et al.*, 1966a, b). Darüber hinaus stimulieren die durch Lipolyse gebildeten freien Fettsäuren die Lipaseproduktion indirekt durch die Cholezystokinin-Aktivität (Hildebrand *et al.*, 1998). Die Lipase stellt keine klassische Esterase dar, da sie ihre volle Aktivität erst dann erhält, wenn sie an die Phasengrenze zwischen wässriger und fetthaltiger Phase absorbiert wird und das Lid durch die Colipase im geöffneten Zustand vorliegt (Winkler *et al.*, 1990; Roussel *et al.*, 2002). Das geschlossene Lid soll das aktive Zentrum vor dem Eindringen des Substrats schützen (Yang und Lowe, 2000). Dieses Verhalten erklärt, warum die Pankreaslipase nicht als Zymogen, sondern direkt als aktive Form gebildet wird. Obwohl der Anteil an Lipase im Pankreassaft sehr gering ist, spaltet ein Molekül Lipase unter optimalen Bedingungen nahezu 700 Esterbindungen in einer Sekunde. Als natürliches Substrat dienen der Lipase ausschließlich Triglyceride aus aliphatischen Fettsäuren mit wenigstens drei Kohlenstoffatomen. Durch nucleophilen Angriff des Serins 152 an die Triglyceride werden diese hydrolytisch gespalten (Abb. 1.4). Lipolytische Enzyme können definiert werden als Esterasen, die langkettige Fettsäureester spalten.

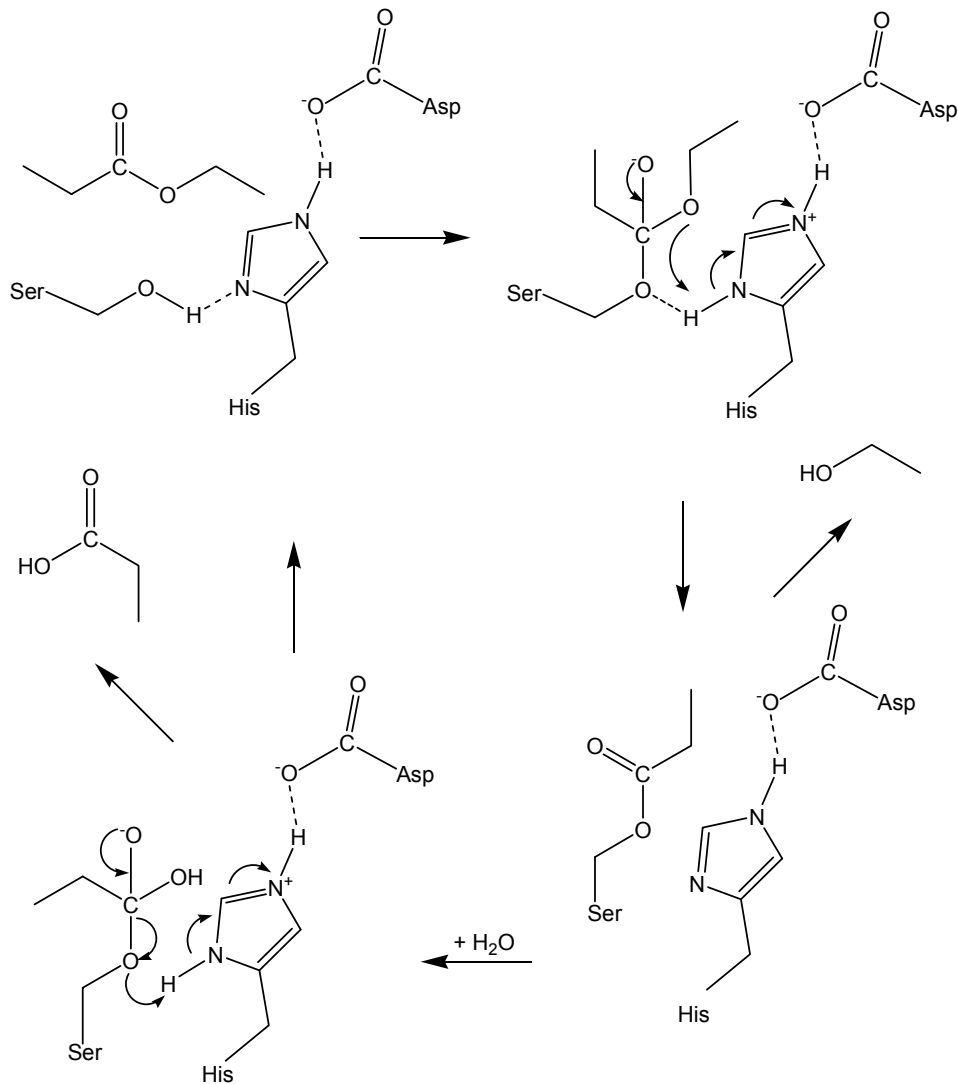


Abb. 1.4 Gängige Annahme des katalytischen Mechanismus für die Hydrolyse der Triglyceride mit der katalytischen Triade, gebildet durch Serin 152 (Ser), Aspartat 176 (Asp) und Histidin 263 (His) (nach Beer *et al*, 1996).

Die Hydrolyse erfolgt regioselektiv an den Positionen *sn*-1 und *sn*-3 des Esters, so dass die entsprechenden 2-Monoglyceride als Resultat aus der Hydrolyse hervorgehen (Abb. 1.5). Die Lipase zeigt eine höhere Aktivität gegenüber den Triglyceriden als gegenüber den Diglyceriden. Die Monoglyceride sind resistent gegenüber der Lipase. Phospholipide werden von der Pankreaslipase nicht hydrolysiert.

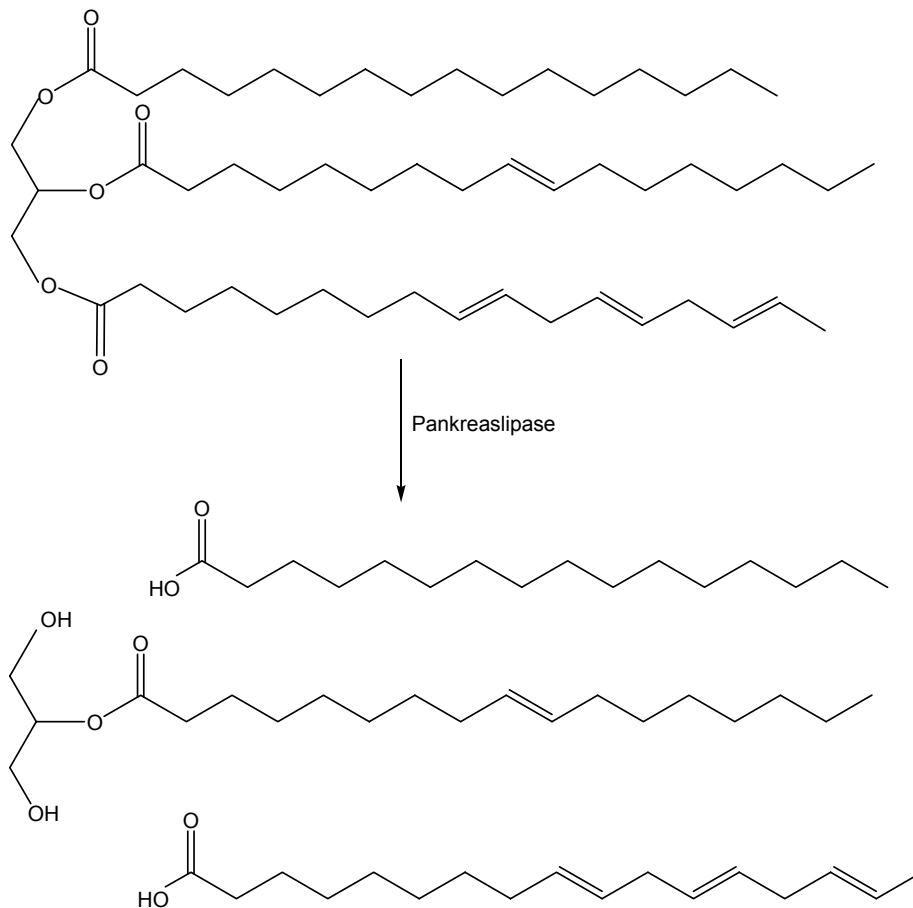


Abb. 1.5 Fettsäure-Glycerol-Ester, die durch Pankreaslipase gespalten werden. Es entstehen zwei Fettsäuren aus den Spaltstellen 1 (*sn*-1) und 3 (*sn*-3) und ein 2-Monoglycerid.

Die Bildung der Monoglyceride ist von physiologischer Bedeutung. Einerseits werden sie zur Emulgierung des Nahrungsbreis verwendet, andererseits werden sie in Enterozyten aufgenommen und zur Resynthese der Triglyceride verwendet (Abb. 1.1). Damit die Lipase ihre volle Aktivität erreicht, liegt sie im Darm gekoppelt an die Colipase vor.

Neben der Lipase sind noch andere lipidspaltende Pankreasenzyme wirksam, die durch Trypsin in ihre aktive Form überführt werden. Dazu gehören die Phospholipase A, die das Phospholipid Lecithin in Fettsäuren und Lysophospholipide spaltet. Weiterhin hydrolisiert die Cholesterolesterase Cholesterolester in Cholesterol und Fettsäuren.

1.3.2 Biologische Funktion der Colipase

Die Colipase wird von der Bauchspeicheldrüse als das Zymogen Procolipase, das durch Trypsin in die aktive Form überführt wird, sekretiert. Die Aktivierung der Colipase unterliegt der limitierten Proteolyse (Abb. 1.6). Das Trypsin wird aus seiner inaktiven Form Trypsinogen durch das Enzym Enterokinase, einer Endopeptidase in der Duodenalschleimhaut, gebildet. Die Colipase erleichtert der Lipase den Kontakt zur Phasengrenze zwischen fettlöslicher und wasserlöslicher Phase des Speisebreis. Sie stabilisiert den offenen Zustand der Pankreaslipase, da sie durch die Bindung an das Lid das aktive Zentrum öffnet. Außerdem wirkt die Colipase den inhibitorischen Effekten der Gallensäuren entgegen. Zusammen mit der Pankreaslipase bildet die Colipase einen 1:1-Komplex (van Tilbeurgh *et al.*, 1992).

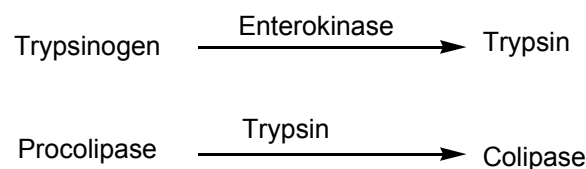


Abb. 1.6 Limitierte Proteolyse zur Aktivierung von Colipase aus Procolipase durch Trypsin.

1.3.3 Biologische Funktion von Galle und Gallensäuren

Die tägliche Gallenproduktion beträgt 600 - 700 ml, von denen der Hauptteil durch Leberzellen gebildet wird. Bei der Bildung wirken zwei Mechanismen zusammen, die gallensäureabhängige und -unabhängige Sekretion. An dieser Stelle wird nur auf die gallensäureabhängige Sekretion eingegangen. Bei dieser werden die in den Leberzellen aus Cholesterol gebildeten primären Gallensäuren wie Cholsäure und Chenodesoxycholsäure und die durch Rezirkulation in die Leber gelangten sekundären Gallensäuren wie Desoxycholsäure und Lithocholsäure in die Gallenkanälchen sezerniert. Aus osmotischen Gründen folgt Wasser nach. In den Verdauungsphasen fließt die Lebergalle direkt in das Duodenum ab.

Die wichtigste Aufgabe der Gallensäuren ist die Lösungsvermittlung für fettlösliche Verbindungen. Gallensäuremoleküle sind amphiphile Moleküle, das heißt, sie verfügen über einen hydrophilen und einen hydrophoben Molekülabschnitt. Aufgrund dieser Eigenschaft lagern sie sich an die Phasengrenze zwischen Öl und Wasser an und bilden Micellen. In dem inneren, lipophilen Kern der Micellen können Lipide wie

Cholesterol, Phospholipide und 2-Monoglyceride inkorporiert sein. Diese „gemischten“ Micellen sind für die Fettverdauung und -resorption essentiell (Abb. 1.5). Schon bei physiologischer Konzentration der Gallensäuren (20 mM) inhibieren diese die Pankreaslipase. Dieser Inhibierung wirkt die Colipase entgegen.

1.4 Erkrankungen, die mit der Pankreaslipase in Verbindung stehen

Wie im Kapitel 1.1 beschrieben wird, nimmt die Pankreaslipase eine entscheidende Position in der Verdauungskette von Nahrungsfetten ein. Liegt ein Mangel an Pankreaslipase vor, können schwerwiegende Erkrankungen entstehen. Dieser Mangel kann durch eine akute oder chronische Pankreasinsuffizienz oder eine Fibrose entstehen. Übergewicht kann durch Inhibierung der Pankreaslipase therapiert werden.

1.4.1 Akute Pankreasinsuffizienz

Der akuten Pankreasinsuffizienz liegt eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse zugrunde. Durch Autolyse (Selbstverdauung) kommt es zur Zerstörung von Pankreasgewebe. Ursachen können Alkoholabusus, Infektionskrankheiten oder eine Abflussstauung des Pankreassaftes in das Duodenum sein. Durch diese Ursachen kommt es zu einer vorzeitigen Aktivierung der Zymogene, die dann die Autolyse hervorrufen. Die Pankreaslipase zerstört das Fettgewebe. Die entstanden Fettsäuren fallen als Calciumsalze aus, wodurch unter Umständen ein Mangel an Calcium im Blut entstehen kann. Aus dem abgestorbenen Gewebe können entweder eine Fibrose, ein Abszess durch Infektion oder eine Zyste durch Abkapselung entstehen. Symptome sind eine Erhöhung der Pankreasenzyme im Blut sowie Fieber.

1.4.2 Chronische Pankreasinsuffizienz

Ursachen für diese Erkrankung können Alkoholabusus und eine akute Pankreatitis sein. Bei der chronischen Pankreasinsuffizienz kommt es zu Eiweißausfällungen in den Pankreasgängen, in die sich Calcium einlagert. Diese Einlagerungen führen zu Verkalkungen, durch die Gangsysteme verlegt werden. Dadurch steigt der Druck in diesen an und die Pankreasenzyme werden aktiviert. Schließlich bildet sich ein bindegewebsartiger Umbau des Pankreas, eine Fibrose, mit unzureichender Bauchspeichelsekretion. Dieser Mangel an Pankreassaft führt zu einer Verdauungsinsuffizienz, bei der die Störung der Fettverdauung im Vordergrund steht.

Als Folge der Verdauungsstörung treten stark fetthaltige, breiige Stühle und eine mangelnde Resorption fettlöslicher Vitamine auf.

1.4.3 Obesitas

Übergewicht, auch Obesitas genannt, bezeichnet eine die Normgrenze übersteigende Erhöhung des Körpergewichts. Angegeben wird es in Form des Körpermasse-Index (body mass index, BMI). Übergewicht entsteht in den Industrienationen infolge von Überernährung, Fehlernährung oder Bewegungsmangel. So nimmt die Gefahr von kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall schon bei einem BMI > 30 signifikant zu. Darüber hinaus steigt bei einem zu hohen BMI die Gefahr, an Diabetes und Arteriosklerose zu erkranken, erheblich an. Diabetes und Arteriosklerose fördern wiederum die Gefahr eines Herzinfarkts oder Schlaganfalls durch Plaque-Ablagerungen in den Arterien. Ist es aus gesundheitlichen Gründen notwendig, dass das Körpergewicht schnell reduziert werden muss, können neben einer Diät Arzneimittel eingesetzt werden, welche die Pankreaslipase blockieren. Allerdings muss mit Nebenwirkungen wie einem stark fetthaltigen, breiigen Stuhl und einer mangelnden Resorption fettlöslicher Vitamine gerechnet werden. Eine fettreduzierte Nahrung ist daher wichtig.

Arzneistoffe, die den Appetit durch Wirkung im zentralen Nervensystem hemmen sollen, gelten aufgrund von kardiovaskulären Nebenwirkungen als obsolet.

1.4.3.1 Lipaseinhibition durch Orlistat

Ist aufgrund von gesundheitsschädlichem Übergewicht eine Lipaseinhibition erforderlich, kann dieses mit dem Lipaseinhibitor Orlistat therapiert werden. Orlistat (Tetrahydrolipstatin), ein hydriertes Lipstatin-Analogon, isoliert aus *Streptomyces toxytricini*, ist ein potenter Inhibitor der Pankreaslipase. Es bildet einen langlebigen kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex, der durch nucleophilen Angriff des katalytischen Serins 152 der Pankreaslipase an die β -Lacton-Acyl-Gruppe des Orlistats entsteht (Abb. 1.7) (Hadvàry *et al.*, 1991; Lüthi-Peng *et al.*, 1992). Durch die kovalente Blockade des aktiven Zentrums der Pankreaslipase ist eine Hydrolyse der Triglyceride nicht mehr möglich. Es werden keine Lipolyseprodukte, Monoglyceride und freie Fettsäuren mehr resorbiert, so dass keine Re-Veresterung der Spaltprodukte möglich ist und diese nicht mehr in das Blut oder in die Lymphe

aufgenommen werden können. Daher wirkt das Orlistat gegen Obesitas und die durch Obesitas entstehenden Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose.

Orlistat inhibiert neben der Pankreaslipase auch die gastrische Lipase und die Cholesterolesterase. Die Serin-Proteasen Trypsin und Chymotrypsin hingegen werden durch Orlistat nicht inaktiviert (Hadvàry *et al.*, 1988).

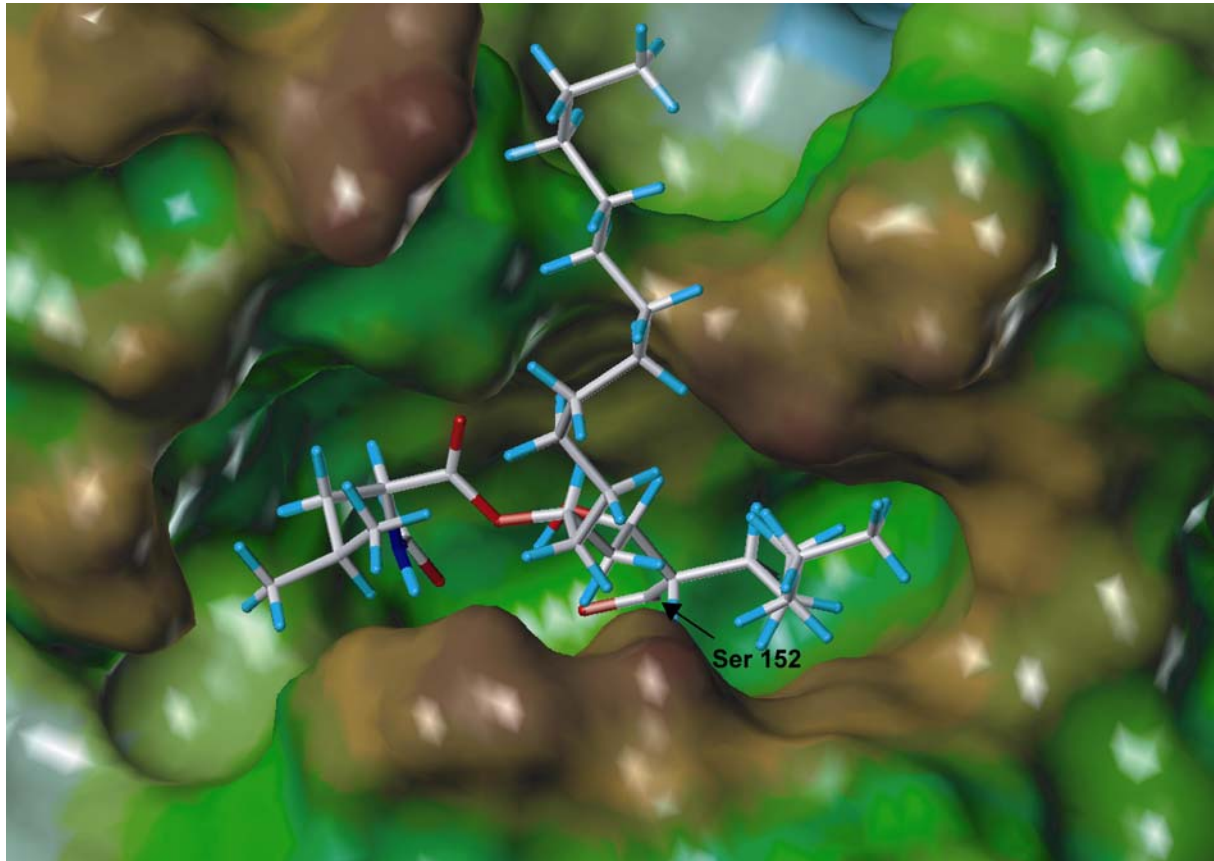


Abb. 1.7 Bindung des Lipaseinhibitors Orlistat in der Lipasebindungstasche. Sie erfolgt über den nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serins (Ser) 152 des aktiven Zentrums an die β -Lacton-Acyl-Gruppe im aktiven Zentrum (Abbildung nach persönlicher Mitteilung von M. Gramer, Solvay Pharmaceuticals).

2 Problemstellung

Lipasen sind essentielle Enzyme zum Abbau von Fetten wie zum Beispiel von Triglyceriden und Cholesterol. Die Pankreaslipase ist für den Menschen essentiell zum Abbau der durch die Nahrung aufgenommenen Triglyceride. Diese Triglyceride werden durch die Lipase zu Monoglyceriden abgebaut, die durch die Darmschleimhaut resorbiert werden und so in die Blutbahn gelangen. Die durch diesen Prozess freigesetzten Fettsäuren werden ebenfalls durch die Darmschleimhaut in das Blut aufgenommen. In der Blutbahn werden sie wieder mit dem Monoglycerid zu einem Triglycerid zusammengesetzt.

Die Pankreaslipase gehört zu der Familie der Serinesterasen, die strukturell starke Ähnlichkeit zu den Serinproteasen zeigen, zu denen u. a. auch das α -Chymotrypsin und die Acetylcholinesterase gehören (Liang und Abeles, 1987; Gelb *et al.*, 1985). Für die Serinproteasen ist bekannt, dass sie durch Peptidyl-fluoromethylketon-inhibitoren blockiert werden. Serinproteasen wie die Acetylcholinesterase bilden mit Difluormethylketonen ein Hemiketal, das sich zwischen dem Serin 195 des aktiven Zentrums und dem Difluormethylketon ausbildet (Gelb *et al.*, 1985). Ebenso bildet ein Trifluormethylketon mit dem α -Chymotrypsin ein Hemiketal (Liang und Abeles, 1987).

In dieser Arbeit gilt es zu klären, ob Trifluormethylketone die Pankreaslipase in der gleichen Weise blockieren wie dies bei den Peptidyl-fluoromethylketonen der Fall ist. Ziel der Trifluormethylketone als Lipaseinhibitoren ist es, dass die Pankreaslipase blockiert wird und dadurch keine Spaltung der Triglyceride mehr möglich ist. Zum Einsatz kommen Lipaseinhibitoren bei Obesitas, das zu Folgeerkrankungen wie zum Beispiel Herzinfarkt, Schlaganfall, Arteriosklerose und Diabetes führen kann. Wichtig für diese Inhibitoren ist, dass keine Resorption der Hemmstoffe in die Blutbahn stattfindet, wodurch die unerwünschten Wirkungen durch die Bindung an strukturverwandte Enzyme im systemischen Blutkreislauf verhindert werden.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob die Trifluormethylketone als Lipaseinhibitoren die Pankreaslipase inhibieren und ob es sich, wenn eine Hemmung messbar ist, um eine reversible oder irreversible Inhibition der Lipase handelt. Als Vergleichssubstanz dient der Lipaseinhibitor Orlistat, von

dem bekannt ist, dass er irreversibel kovalent an das aktive Zentrum der Lipase bindet (Hadvàry *et al.*, 1991). Insbesondere soll ermittelt werden, wie stark die inhibitorische Wirkung für die Trifluormethylketone ist. Für die durchzuführenden Experimente ist es wichtig zu wissen, wie stabil und aktiv die porcine Pankreaslipase in einem Lösungsmittelgemisch aus Dimethylsulfoxid und Wasser ist. In der Literatur gibt es Angaben, dass die Aktivität einiger Lipasen in Anwesenheit von Dimethylsulfoxid verstärkt wird (Tsuzuki *et al.* 2001).

Ein weiterer Abschnitt wird der Strukturaufklärung der Trifluormethylketone gewidmet. Mit Hilfe verschiedener NMR-Verfahren soll die Struktur der Trifluormethylketone in wässrigem und nichtwässrigem Medium geklärt werden. Die vollständige Signalzuordnung ist eine Voraussetzung für weiterführende NMR-spektroskopischen Experimente, die zur Charakterisierung der Ligandenbindung herangezogen werden sollen.

Im dritten Abschnitt wird der Frage nachgegangen, ob NMR-Experimente das gezielte Design von Trifluormethylketonderivaten unterstützen können. Durch das Verwenden neuerer NMR-Verfahren wie der STD-NMR-Methode (Mayer und Meyer, 1999 und 2001) können schnelle und präzise Informationen über die Wechselwirkungen von Liganden mit Proteinen geliefert werden. Mit Hilfe der STD-NMR-Methode sollen die Bindungsepitope von verschiedenen Trifluormethylketonen an die porcine Pankreaslipase bestimmt werden. Mit STD-NMR und klassischen enzymatischen Assays sollen darüber hinaus Bindungsaffinitäten und enzymkinetische Daten ermittelt werden. Diese Experimente sollen die Korrelation zwischen Bindungsaffinität und Inhibition der enzymatischen Aktivität ermöglichen. Zur Interpretation der experimentellen Daten werden begleitend *Molecular Modeling* und *Docking*-Studien an den Trifluormethylketonen im Komplex mit der Lipase durchgeführt.

3 Theorie

Dieses Kapitel enthält die theoretischen Grundlagen zu den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten. Es wird auf die Bindungs- und Enzymkinetik, insbesondere auf die Enzyminhibition eingegangen (Bisswanger, 2000). Weiterhin werden die in dieser Arbeit benötigten Theorien der NMR-Spektroskopie und des *Molecular Modeling* dargestellt.

3.1 Bindung von Liganden an Proteine

3.1.1 Bindungskinetik

Die Bindung eines Liganden A an ein Protein E kann durch folgende Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden:



Es besteht folgender Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstante K_D , den Gleichgewichtskonstanten k_{on} und k_{off} und den Konzentrationen (Massenwirkungsgesetz):

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[A][E]}{[EA]} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Die Anfangskonzentrationen an eingesetztem Protein $[E]_0$ und Ligand $[A]_0$ lassen sich durch folgende Gleichungen berechnen:

$$[A]_0 = [A] + [EA] \quad (\text{Gl. 3.3})$$

$$[E]_0 = [E] + [EA] \quad (\text{Gl. 3.4})$$

Werden die Gleichungen 3.3 und 3.4 in die Gleichung 3.2 eingesetzt, ergibt sich für die Dissoziationskonstante die nachstehende Gleichung.

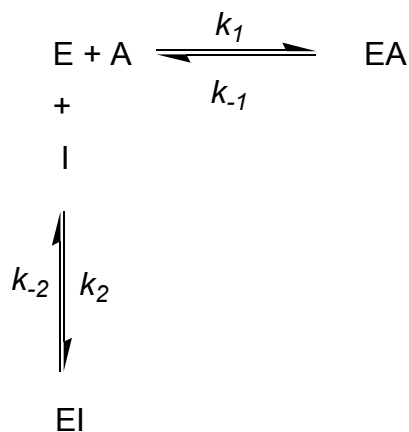
$$K_D = \frac{([E]_0 - [EA])[A]}{[EA]} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Wird davon ausgegangen, dass das Protein für den Liganden genau eine Bindungsstelle besitzt, entspricht der gebundene Anteil des Liganden $[A]_{\text{geb}}$ dann $[EA]$.

$$[A]_{\text{geb}} = [EA] = \frac{[E]_0[A]}{K_D + [A]} \quad (\text{Gl. 3.6})$$

3.1.2 Kompetitive Inhibition

Aufgrund der hohen Bindungsspezifität von Proteinen, insbesondere von Enzymen, wird in der Regel nur das von der Natur vorgesehene Substrat gebunden. Strukturanaloge Verbindungen zum natürlichen Substrat wie z. B. Inhibitoren werden mehr oder weniger gut von der Bindungsstelle akzeptiert und binden sogar teilweise deutlich stärker. Sie blockieren dann die Bindungsstelle für das Substrat. Dieser Vorgang der Konkurrenz um eine Bindungsstelle wird Konkurrenz genannt. Die Konkurrenz kann für ein Enzym E, Substrat A und Inhibitor I folgendermaßen dargestellt werden:



(Gl. 3.7)

Die Dissoziationskonstante K_D und die Inhibitionskonstante K_I lassen sich nach den Gleichungen 3.8 und 3.9 berechnen.

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad (\text{Gl. 3.8})$$

$$K_I = \frac{k_{-2}}{k_2} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (\text{Gl. 3.9})$$

Die Protein-Ligand-Konzentration kann auch hier für die Anwesenheit eines Inhibitors berechnet werden.

$$[EA] = \frac{[E]_0[A]}{[A] + K_D \left(\frac{[I]}{K_I} + 1 \right)} \quad (\text{Gl. 3.10})$$

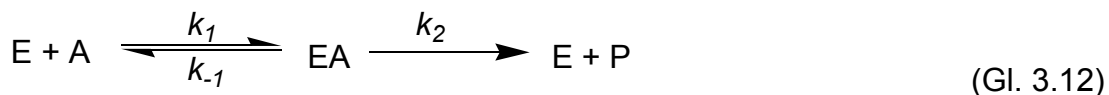
Werden die Gleichungen 3.6 und 3.10 unter der Voraussetzung, dass die vorhandene Konzentration des Inhibitors ($[I] = IC_{50}$; Cheng und Prusoff, 1973) 50 % der Enzymreaktion hemmt ($[EA]/2 = [EA]_i$) kombiniert, ergibt sich die Beschreibung des K_D -Wertes (Gl. 3.11).

$$K_D = \frac{[A]K_I}{IC_{50} - K_I} \quad (\text{Gl. 3.11})$$

3.2 Enzymkinetik

3.2.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Der einfachste Fall einer enzymatischen Katalyse ist eine irreversible Reaktion, bei der ein Substrat A mit einem Enzym E zu einem Produkt P umgesetzt wird.



Liegt ein Gleichgewichtszustand (*Steady-State*) und ein großer Substratüberschuss vor ($[A] \gg [E]$), kann die Reaktionsgeschwindigkeit des Produktes P ($v = d[P]/dt$) durch Gleichung 3.13 ausgedrückt werden.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA] = \frac{k_2[E]_0[A]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]} \quad (\text{Gl. 3.13})$$

Der Quotient $(k_{-1} + k_2)/k_1$ wird zu der Michaelis-Menten-Konstante K_m zusammengefasst. Das Produkt $k_2[E]_0$ wird Maximalgeschwindigkeit V_{\max} genannt, da die gesamte eingesetzte Enzymmenge an der Reaktion teilnimmt. Die von Briggs und Haldane entwickelte Gleichung 3.14 kann vereinfacht dargestellt werden:

$$v = \frac{V_{\max}[A]}{K_m + [A]} \quad (\text{Gl. 3.14})$$

Diese Gleichung wurde zwar nur für den einfachsten Fall einer Enzymreaktion, der die Reaktion eines Enzyms mit einem Liganden in Abwesenheit von weiteren Liganden beschreibt, abgeleitet, jedoch gilt sie unter bestimmten Bedingungen auch für komplexere Mechanismen.

Abweichungen der Messwerte von der Gesetzmäßigkeit der Michaelis-Menten-Beziehung geben sich durch charakteristische Abweichungen vom linearen Verlauf zu erkennen. Auch um verschiedene Arten der Inhibierung, wie sie im folgenden Kapitel behandelt werden, unterscheiden zu können, ist ein linearisiertes Auswertungsverfahren von Vorteil. Die einfachste Form der Linearisierung ist die doppelt-reziproke Form der Michaelis-Menten-Gleichung, die auch als Lineweaver-Burk-Diagramm bezeichnet wird (Gl. 3.15).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[A]} \quad (\text{Gl. 3.15})$$

Die Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit $1/v$ gegen die reziproke Substratkonzentration $1/A$ ergibt bei Gültigkeit der Beziehung eine Gerade. Der wesentliche Nachteil dieser Auswertung ist, dass nicht-lineare Daten linearisiert werden. Es kommt zu einer Ungleichverteilung der Daten, da unter Annahme eines gleichen absoluten Fehlers über den gesamten Messbereich die Fehlergrenzen für $1/v$ von der Ordinate weg extrem aufgeweitet werden. Somit ist eine einfache lineare Regression nicht mehr möglich.

Um diese Aufweitung zu verhindern, kann die Gleichung 3.15 mit der Substratkonzentration A multipliziert werden, wodurch sich die Hanes-Gleichung erstellt wird:

$$\frac{[A]}{v} = \frac{[A]}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (\text{Gl. 3.16})$$

Bei dieser Darstellung wird in einem Diagramm $[A]/v$ gegen $[A]$ aufgetragen. Die Gerade erhält dadurch die Steigung $1/V_{\max}$, also den reziproken Wert der Maximalgeschwindigkeit. Der Schnittpunkt liegt auf der Abszisse bei $-K_m$, der so den negativen Wert der Michaelis-Menten-Konstante beschreibt, und auf der Ordinate bei

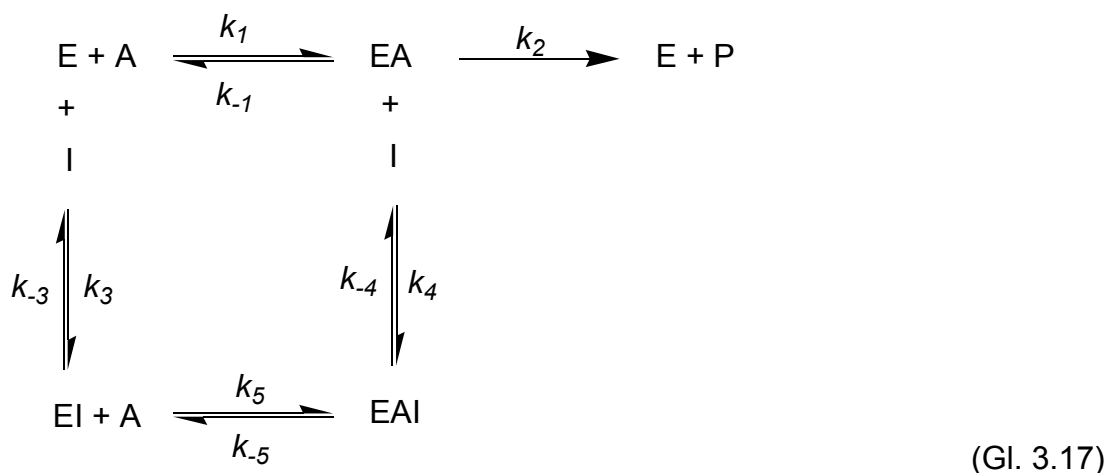
K_m/V_{\max} . Die Fehlergrenzen werden hier nur unwesentlich verzerrt, so dass eine lineare Regression ohne Einschränkung anwendbar ist.

3.2.2 Inhibierung

Unter Enzymhemmung wird die negative Beeinflussung der Enzymaktivität durch spezifisch an katalytische oder regulatorische Zentren bindende Liganden verstanden. Diese Liganden werden Hemmstoffe oder Inhibitoren genannt. Unterschieden werden reversibel und irreversibel bindende Inhibitoren. Die Art der Bindung eines spezifischen Inhibitors ist für die Behandlung der Enzyminhibierung von Bedeutung.

3.2.2.1 Reversible Inhibierung

Ein entscheidendes Merkmal der reversiblen Enzyminhibierung ist, dass der Ligand wieder vom Enzym abgelöst bzw. verdrängt werden kann, ohne dass das Enzym geschädigt wird. Bindet ein Inhibitor I reversibel an ein Enzym E, wird die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms beeinflusst und dadurch die enzymatische Umsetzung des Substrats A behindert. Der Inhibitor hat verschiedene Möglichkeiten, das Enzym zu blockieren.



Die drei verschiedenen Inhibitionsmechanismen werden anhand der Bindungsstelle, die der Inhibitor belegt, unterschieden. Jeder dieser Mechanismen ist durch eine charakteristische Veränderung in den Auftragungen der Messwerte zur Auswertung gemäß einer linearisierten Form von Gleichung 3.16 zu identifizieren. Im Folgenden werden die Veränderungen einer Auftragung nach Hanes beschrieben, die durch den Inhibitoreinsatz einhergehen.

a) Bei der nicht-kompetitiven Hemmung sind alle Gleichgewichte aktiv. Der Grund dafür ist, dass das Substrat und der Hemmstoff am Enzym unterschiedliche Bindungsstellen haben. Durch den Einfluss des Inhibitors wird sowohl die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante K_m' als auch die Maximalgeschwindigkeit V_{max} verändert.

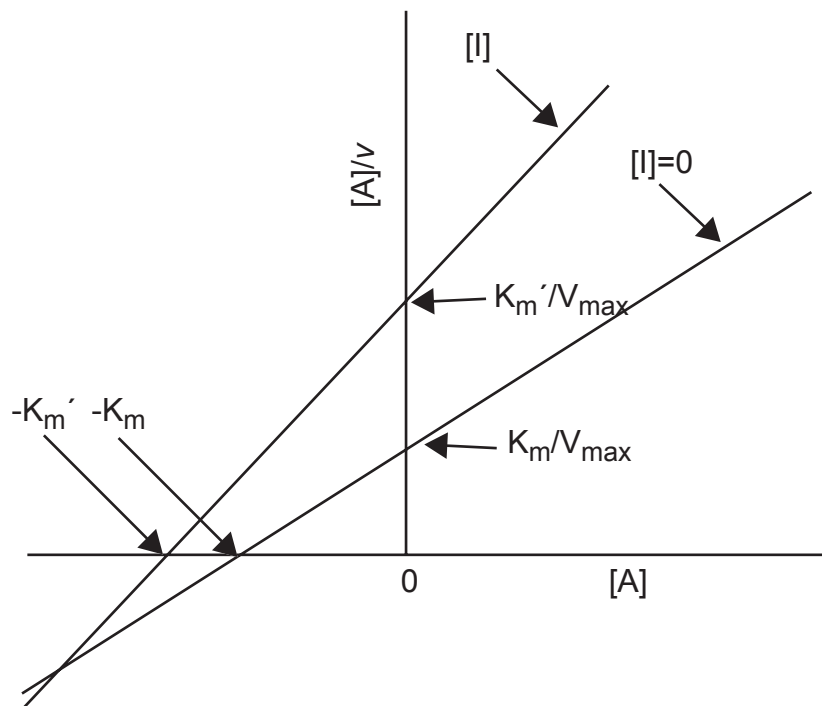


Abb. 3.1 Nicht-kompetitive Hemmung einer Enzymreaktion im Vergleich zu einer ungehemmten Reaktion in der Darstellung nach Hanes. In der Abbildung ist zu erkennen, dass sich bei diesem Hemmtyp durch den Inhibitor sowohl die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante K_m' als auch die Maximalgeschwindigkeit V_{max} ändert. Die Michaelis-Menten-Konstante erscheint höher, während die Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Reaktion nicht mehr erreicht wird.

Die ursprüngliche Maximalgeschwindigkeit V_{max} wird nicht mehr erreicht. Die Michaelis-Menten-Konstante wird durch den Einfluss des Inhibitors größer, da die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms durch die Hemmung abnimmt. Daraus ergibt sich für die Auftragung nach Hanes, dass sich die Geraden in ihrer Steigung ($1/V_{max}$) und auch in ihrem Ordinatenabschnitt von der ungehemmten Reaktion unterscheiden. Die Geraden haben einen gemeinsamen Schnittpunkt unterhalb der Abszisse (Abb. 3.1).

b) Konkurriert der Inhibitor mit dem Enzymsubstrat um die gleiche Bindungsstelle am aktiven Zentrum, wird von einer kompetitiven Hemmung gesprochen. Es kann entweder nur das Substrat oder der Hemmstoff gebunden werden, eine gleichzeitige Bindung ist nicht möglich. Die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} wird bei dieser Hemmung nicht verändert, da das Substrat bei sehr großem Überschuss den Inhibitor vollständig verdrängt. In der Darstellung nach Hanes zeigt sich diese indikative Eigenschaft an parallel zueinander verlaufenden Geraden mit derselben Steigung $1/V_{\max}$. Durch diese Hemmung wird lediglich die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante K_m' , die den Abszissenschnittpunkt darstellt und größere Werte annimmt, beeinflusst (Abb. 3.2).

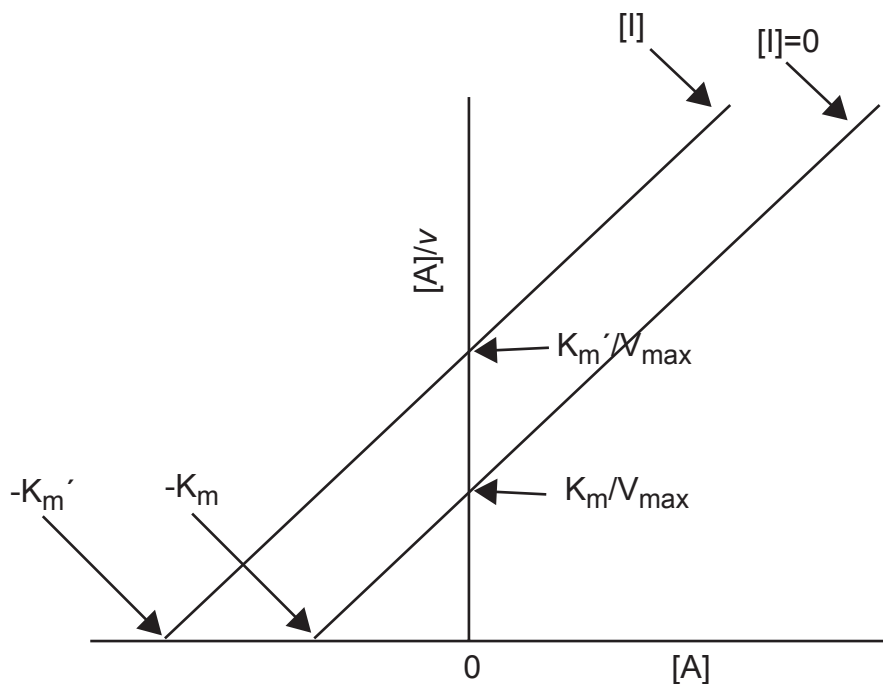


Abb. 3.2 Darstellung der kompetitiven Hemmung nach Hanes durch einen Inhibitor im Vergleich zu einer ungehemmten Reaktion. Der parallele Geradenverlauf, bedingt durch dieselbe Steigung der Geraden, verdeutlicht, dass die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} bei diesem Hemmtyp nicht beeinflusst wird. Die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante K_m' wird durch den Abszissenabschnitt beschrieben und nimmt größere Werte an.

c) Ein seltener Hemmtyp ist die unkompetitive Hemmung, bei der der Hemmstoff ausschließlich an den Enzym-Substrat-Komplex bindet, das heißt, dass die Bindungsstelle für den Hemmstoff erst in der Wechselwirkung mit dem Substrat gebildet wird. Kennzeichnend für diesen Hemmtyp ist, dass die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} nicht mehr erreicht wird und dass die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante K_m' kleinere Werte annimmt (Abb. 3.3). Im Hanes-Diagramm zeigen die Geraden einen gemeinsamen Ordinatenabschnitt bei K_m/V_{\max} . Die Michaelis-Menten-Konstante wird als Schnittpunkt auf dem negativen Teil der Abszisse dargestellt.

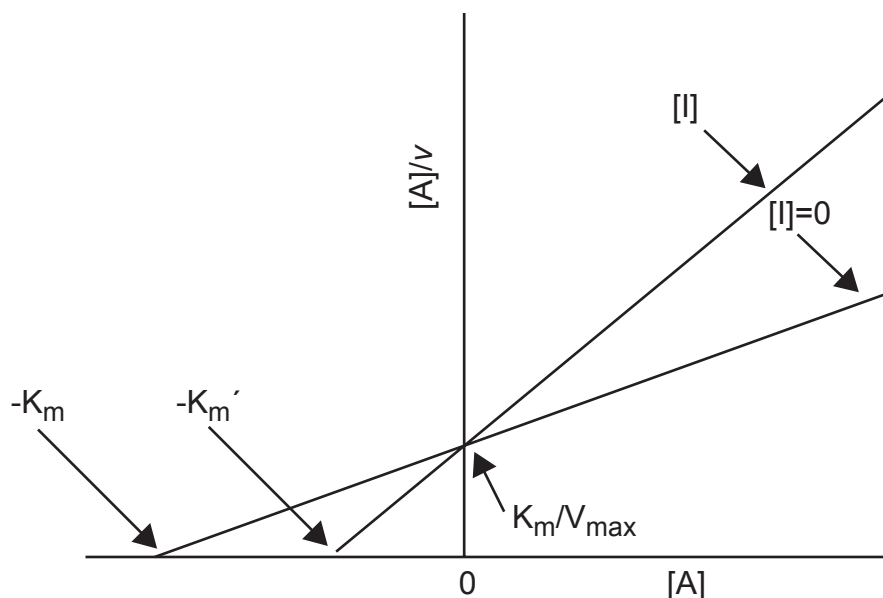
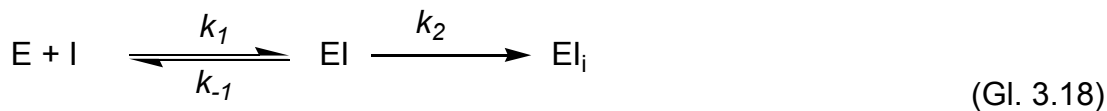


Abb. 3.3 Darstellung der unkompetitiven Hemmung nach Hanes durch einen Inhibitor im Vergleich zu einer ungehemmten Reaktion. Durch diesen Hemmtyp nimmt die scheinbare Michaelis-Menten-Konstante K_m' kleinere Werte an, die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} wird bei diesem Hemmtyp nicht erreicht. Charakteristisch ist der gemeinsame Ordinatenabschnitt. Er stellt den Quotienten aus der Michaelis-Menten-Konstante und der Maximalgeschwindigkeit dar.

3.2.2.2 Irreversible Inhibierung

Bestimmte Inhibitoren binden derart stark, dass sie vom Enzym nicht mehr abzulösen sind. Dies wird in der Regel durch kovalente Bindung einer funktionellen Gruppe an das Enzym verursacht. Die Gleichung 3.18 ist kennzeichnend für irreversible Reaktionen.



Zunächst bildet der Inhibitor mit dem Enzym einen reversiblen Komplex EI, der dann in einem irreversiblen Prozess in die inaktive EI_i-Form übergeht. Durch diese Tatsache wird das Enzym nicht schlagartig inhibiert, sondern durchläuft eine „Überbrückungsphase“, die durch einen exponentiellen Abfall der Enzymaktivität gekennzeichnet ist.

Die Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms E₀ verteilt sich auf folgende Enzymformen:

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [EI]_i \quad (\text{Gl. 3.19 a})$$

$$[E] + [EI] + [EI]_i = [E]_a + [EI]_i \quad (\text{Gl. 3.19 b})$$

Wenn ein Substratüberschuss vorliegt, sind [E] und [EI] der Anteil an dem aktiven Enzym [E]_a, da bei Substratüberschuss im Enzymtest der Hemmstoff aus dem reversiblen Komplex EI verdrängt wird (Gl. 3.19 b). In Anlehnung an die Michaelis-Menten-Gleichung ist unter der Voraussetzung [I] >> [E]₀ die zeitliche Bildung der inaktiven Enzymform [EI]_i der Konzentration des reversiblen [EI]-Komplexes direkt proportional. Es ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit ein Potenzansatz 1. Ordnung:

$$\frac{d[EI]_i}{dt} = \frac{d([E]_0 - [E]_a)}{dt} = k_2[EI] \quad (\text{Gl. 3.20})$$

Da die Gesamtmenge des Enzyms [E]₀ konstant bleibt ($d[E]_0/dt = 0$), vereinfacht sich die Gleichung wie folgt:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_2[EI] \quad (\text{Gl. 3.21})$$

Unter Berücksichtigung der Hemmkonstanten für die reversible Bindung des Hemmstoffs K_i ($K_i = [E][I]/[EI]$, (Gl. 3.9)), kann die Konzentration EI durch folgende Gleichungen dargestellt werden:

$$[E]_a = [EI] + [E] \quad (\text{Gl. 3.22 a})$$

$$[EI] = \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (\text{Gl. 3.22 b})$$

Wird in der Gleichung 3.21 die Konzentration des reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes durch die Gleichung 3.22 b substituiert, ergibt sich die folgende Formel für die Reaktionsgeschwindigkeit:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = \frac{k_2[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (\text{Gl. 3.23})$$

Um die Inhibitionskonstante K_i und die Konstante k_2 für den irreversiblen Anteil der Reaktion zu berechnen, wird in Gleichung 3.23 eine Separation der Variablen vorgenommen und in den Grenzen $t = 0$ bis t und $[E]_0$ bis $[E]_a$ integriert.

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -\frac{k_2 t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (\text{Gl. 3.24})$$

Durch Auftragung der logarithmischen Restaktivitäten des Enzyms ($[E]_a/[E]_0$) gegen die Zeit t werden Geraden mit unterschiedlichen Steigungen m erhalten (Gl. 3.25).

$$m = -\frac{k_2}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (\text{Gl. 3.25})$$

Wird die reziproke Steigung $1/m$ gegen die reziproke Hemmstoffkonzentration $1/[I]$ aufgetragen, ergibt sich in einem Diagramm ein gemeinsamer Ordinatenschnittpunkt. Dieser entspricht dem reziproken Wert von der Konstanten k_2 . Der Abszissenabschnitt zeigt die negativ reziproke Inhibitionskonstante $-1/K_i$.

Konkurriert das Substrat A mit dem Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, ändert sich die Gleichung 3.24, da unter diesen Bedingungen die Substratkonzentration $[A]$ und die Michaelis-Menten-Konstante K_m mit in die Berechnung eingehen.

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = \frac{k_2 t}{\left(1 + \frac{K_I}{[I]\right) \left(1 + \frac{[A]}{K_m}\right)} \quad (\text{Gl. 3.26})$$

Um die Inhibitionskonstante K_I und die Konstante k_2 für den irreversiblen Anteil der Reaktion zu berechnen, wird die Berechnung für die Steigung ebenfalls durch die Substratkonzentration A und die Michaelis-Menten-Konstante K_m erweitert.

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_I \left(1 + \frac{[A]}{K_m}\right)}{k_2 [I]} \quad (\text{Gl. 3.27})$$

Durch die Inhibierung des Enzyms wird die Umsetzung des Substrats vermindert. In Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration $[A]$ ändert sich die Michaelis-Menten-Konstante K_m . Je höher der Substratüberschuss ist, desto größer wird die Michaelis-Menten-Konstante K_m . Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass der Beginn einer irreversiblen Reaktion, wie oben beschrieben, reversibel verläuft. Das heißt, je höher der Substratüberschuss, desto mehr Inhibitor lässt sich aus dem reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex verdrängen und desto mehr nicht-inhibiertes Enzym liegt zur Bildung eines Enzym-Substratkomplexes vor.

Für unterschiedliche Substratkonzentrationen $[A]$ können verschiedene Michaelis-Menten-Konstanten K_m mittels einer Auftragung berechnet werden. Die Geraden für die unterschiedlichen Substratkonzentrationen $[A]$ haben den gleichen Ordinatenabschnitt bei $1/k_2$, aber unterschiedliche Abszissenschnittpunkte, aus denen die Michaelis-Menten-Konstanten K_m berechnet werden können.

3.3 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*) ist ein Verfahren zur Strukturaufklärung von Substanzen. Aussagen über Konformation und Konfiguration dieser Substanzen sind möglich. Der am häufigsten beobachtete Kern ist der ^1H -Wasserstoffkern, da dieser mit einem Anteil von 99,99 % im natürlich gebundenen Wasserstoff leichter verfügbar ist als ^{13}C -Kohlenstoff (1,11 % im Kohlenstoff) und ^{15}N -Stickstoff (0,37 % im Stickstoff).

3.3.1 Das STD-Experiment

Das STD-Experiment (Sättigungstransfer-Differenz) wird zur Charakterisierung von Protein-Ligand-Komplexen verwendet (Mayer und Meyer, 1999). Das Protein wird jeweils jenseits der Ligandensignale, die aufgrund ihrer Molekülgröße sehr scharf sind, selektiv gesättigt. Die angeregten Atomkerne des Proteins übertragen diese Energie auf räumlich benachbarte Kerne.

Es ist möglich, alle Protonen eines Proteins zu sättigen, indem nur auf die Resonanzfrequenz einiger Methylprotonen eingestrahlt wird. Auch auf Liganden, die an ein Protein gebunden sind, während das Protein gesättigt ist, wird so ebenfalls Sättigung übertragen. Es wird ein *on-resonance* Spektrum mit den Signalintensitäten I_{sat} erhalten. Die Dissoziationskonstante K_D für einen solchen Liganden sollte in einem Bereich von 10^{-3} bis 10^{-9} M liegen. Sind die Bindungskonstanten außerhalb dieses Bereichs, resultieren daraus nur sehr kleine STD-Effekte, da einerseits die Anzahl der gebundenen Liganden sehr gering ist, andererseits die Kontaktzeit zwischen dem Protein und dem Liganden zu kurz ist, um eine ausreichende Sättigung zu übertragen. Die Dissoziationsrate k_{off} sollte für ein effizienten Austausch zwischen freiem und gebundenem Liganden größer als ca. 1 s^{-1} sein. Ist die Verweilzeit zu lang, wie z. B. bei irreversibel kovalent bindenden Liganden, so sind keine STD-Effekte messbar, da die Dissoziationskonstante näherungsweise gleich null ist.

Außerdem wird ein so genanntes *off-resonance* Spektrum aufgenommen, bei dem der Puls für die selektive Proteinsättigung außerhalb des spektralen Fensters des Proteins, zum Beispiel bei -20 ppm, liegt. Durch die Wahl dieser Pulsfrequenz wird weder der Ligand noch das Protein gesättigt, sie behalten ihre normale Intensität I_0 . Durch Differenzbildung zwischen dem *off-resonance* und dem *on-resonance* Spektrum ergibt sich ein Spektrum, welches nur noch die Signale des Liganden enthält, die über das Protein einen Sättigungstransfer erhalten haben und somit binden.

Zwei Vorteile liegen in dieser Methode. Der erste Vorteil ist, dass aus einem Substanzgemisch die gebundene Komponente direkt identifiziert werden kann (Mayer und Meyer, 1999; Vogtherr und Peters, 2000b). Dabei werden nur die Signale der Substanzen gesättigt, die mit dem Protein in Wechselwirkung treten. Die Signale

aller anderen Substanzen verschwinden. Der Molekülteil, der am nächsten zum Protein liegt, liefert die stärksten NMR-Signale.

Der zweite Vorteil ist die Anwendung des so genannten *group epitope mapping* (Mayer und Meyer, 2001). Bei diesem Verfahren wird das Bindungsepitop eines Liganden an ein Rezeptormolekül bestimmt. Mit zunehmendem Abstand zu den Proteinprotonen erfahren die Ligandenprotonen einen immer geringeren Sättigungstransfer (Abb. 3.4).

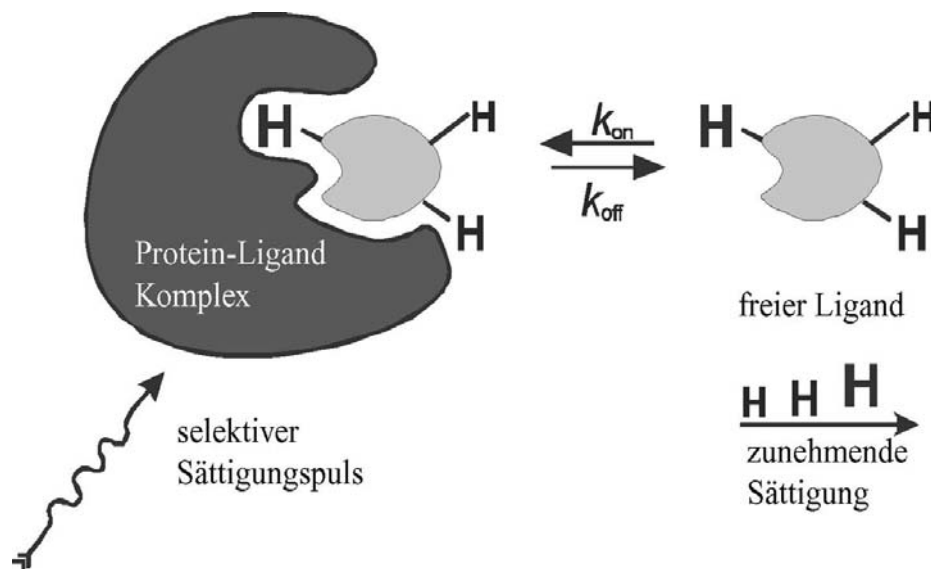


Abb. 3.4 Schematische Darstellung des *group epitope mapping* (GEM) anhand des STD-NMR-Verfahrens (Mayer und Meyer, 2001). Das Protein wird durch einen selektiven Puls angeregt. Es erfolgt ein Sättigungstransfer auf den Wasserstoff des Liganden. Je enger die Ligandprotonen in Kontakt mit dem Protein stehen, desto stärker ist der Sättigungstransfer auf die Ligandprotonen (Abbildung nach Mayer und Meyer, 2001).

Weiterhin zeigt diese Methode eine hohe Sensitivität, so dass bei einem Protein mit einem Molekulargewicht von > 10 kDa nur ungefähr ein nmol eingesetzt werden muss (Mayer und Meyer, 2001).

Aus den Signalintensitäten lassen sich Rückschlüsse auf den relativen Abstand der einzelnen Protonen von der Proteinoberfläche ziehen. Denn je näher ein Proton an dem Protein ist, desto effektiver ist der Sättigungstransfer und desto stärker ist das STD-Signal.

Zur Ermittlung der prozentualen STD-Werte wird der Sättigungsgrad im STD-NMR-Spektrum bestimmt (Gl. 3.28). Dafür wird die relative Stärke des Sättigungstransfers auf die einzelnen Protonen des Moleküls bezogen auf das Proton mit dem stärksten Sättigungstransfer ermittelt.

$$\text{Sättigungsgrad} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} \quad (\text{Gl. 3.28})$$

Das Protonensignal mit dem stärksten Sättigungsgrad wird als Referenz mit 100 % für die restlichen Signale verwendet. Wird dieser Sättigungsgrad mit dem Verhältnis der Stoffmenge an Ligand, der immer im Überschuss eingesetzt wird, zur Stoffmenge des Proteins (Ligandenüberschuss) multipliziert, ergibt sich daraus der so genannte *STD-amplification-factor* ($\text{STD}_{\text{ampl. fac.}}$; Gl. 3.29).

$$\text{STD}_{\text{ampl. fac.}} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0} * \text{Ligandenüberschuss} \quad (\text{Gl. 3.29})$$

Dieser Faktor gibt das Verhältnis der Signalintensität des Liganden im STD-NMR-Spektrum zu der Signalintensität eines Proteinprotons im *off-resonance* Spektrum an und dient somit der Referenz.

Die *on-resonance* Frequenz wird so gewählt, dass nur das Protein, nicht aber der Ligand angeregt wird. Üblicherweise liegt diese Frequenz zwischen -1 und -2 ppm, da in diesem Bereich keine Ligand-Resonanzen liegen und die signifikante Linienbreite des Proteinsignals eine selektive Anregung zulässt. Enthält der Ligand keine Aromaten, ist auch eine Anregung des Proteins im tiefen Feld bei 7 - 9 ppm möglich.

3.3.2 ¹³C-NMR-Spektren mit und ohne Protonenkopplung

¹³C-NMR-Spektren sind aufgrund der Kopplungen mit den Wasserstoffatomen komplex und linienreich, weshalb ihre Analyse meistens Schwierigkeiten bereitet. Zudem verteilen sich die ohnehin schon kleinen Intensitäten der ¹³C-Spektren auf Multipletts. Um diese negativen Auswirkungen der C,H-Kopplungen zu vermeiden, ist es üblich, die Protonen während der Aufnahme zu entkoppeln und dadurch eine Signalverstärkung für die Kohlenstoffatome zu erreichen. Zusätzlich erfolgt eine

Verstärkung der Kohlenstoff-Signale durch den Kern-Overhauser-Effekt. Es wurden breitbandenkoppelte und gekoppelte ^{13}C -Spektren aufgenommen, um u. a. die quartär gebundenen Kohlenstoffatome von den Kohlenstoff, die direkt mit Protonen koppeln, zu unterscheiden.

3.3.3 ^{19}F -NMR-Spektroskopie

^{19}F ist wie ^1H ein Kern mit einem großen gyromagnetischen Verhältnis bei 100 % natürlicher Häufigkeit. Gegenüber ^1H hat jedoch der Fluorkern den Vorzug, dass der Bereich der chemischen Verschiebungen wesentlich größer ist, das heißt, die Spektren sind im allgemeinen einfacher als die der entsprechenden Wasserstoffverbindungen, weil sich die Signalgruppen weniger überlagern. Die Anwendung ist allerdings eingeschränkt, da einerseits nur ein geringer Teil der Liganden in ihrer Struktur ein Fluoratom enthalten, andererseits ein spezieller Probenkopf für diese Messungen nötig ist.

3.3.4 Das HSQC-Experiment und das HMBC-Experiment

Die Strategie des *Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence*-Experiment (HSQC) und des *Heteronuclear-Multiple-Bond-Correlation*-Experiment (HMBC) besteht darin, Korrelationen zwischen Protonen und Heterokernen zu messen. In dieser Arbeit bezieht sich diese Korrelation auf die Kerne ^1H und ^{13}C . Je nach Größe der skalaren Kopplungskonstanten werden $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen ($^1J = 145 \text{ Hz}$) wie beim HSQC-Experiment erhalten. Liegen die Kopplungskonstanten zwischen 4 und 12 Hz, werden die $^2J_{\text{C,H}}$ - und die $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen erfasst.

3.3.5 INADEQUATE-Experimente

Das 1D INADEQUATE-Experiment (*Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer*) dient zum Nachweis von $^1J_{\text{C,C}}$ -Kopplungskonstanten und damit zur Aufklärung der Struktur und der Nachbarschaftsbeziehungen (Bax *et al.*, 1980).

Durch die geringe natürliche Häufigkeit (1,1 %) des ^{13}C -Isotops sind sehr hohe Stoffmengenkonzentrationen und eine lange Messzeit nötig, um die C,C-Kopplungen messen zu können. Um die Signalintensitäten von einer C,C-Kopplung sichtbar zu machen, wird das Spinsystem durch zwei aufeinander folgende 90° -x-Pulse so präpariert, dass die Doppelquantenübergänge im ^{13}C , ^{13}C -System angeregt sind. Die zu erwartenden Kopplungskonstanten für $^1J_{\text{C,C}}$ liegen zwischen 30 und 70 Hz.

Wird dagegen nur ein Kohlenstoff-Atom selektiv angeregt, wird ein Signal für den entsprechenden Kopplungspartner der 1J -Kopplung und die dazugehörige Kopplungskonstante erhalten. Dieses Experiment wird als selektives INADEQUATE-Experiment bezeichnet.

Um die Verknüpfung des Kohlenstoffgerüsts festzustellen, wird das 2D INADEQUATE-Experiment verwendet (Bax *et al.*, 1981). Auf beiden Achsen wird die chemische Verschiebung wiedergegeben, wobei durch die Doppel-Quantum-Frequenz auf der einen Achse die Verschiebungsfrequenzen für die Kohlenstoffatome nicht direkt abgelesen werden können. Intensitäten treten dort auf, wo ^{13}C -Atome über eine $^1J_{\text{C,C}}$ -Kopplung direkt verbunden sind. Vorteil des 2D INADEQUATE-Experimentes ist es, dass die ^{13}C -Signale und ihre Verknüpfung direkt gemessen werden können.

3.4 Molecular Modeling

3.4.1 Grundlagen

Ziel bei der Simulation von molekularen Systemen in der Wirkstoffentwicklung ist es, ein tieferes Verständnis pharmakologischer Vorgänge auf molekularer Ebene zu schaffen und mit virtuellen Experimenten die Wirkstoffentwicklung zu unterstützen.

Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Protein. Die Wechselwirkungen zwischen der Bindung eines Substrats an ein Enzym werden qualitativ und quantitativ beschrieben.

Zur theoretischen Voraussage und Darstellung stabiler Molekülstrukturen, zur Berechnung von Spektren und zur Simulierung zeitabhängiger Prozesse wie Konformationsänderungen oder chemischen Reaktionen sind Modelle nötig. Solche Modelle betrachten meist die potentielle Energie eines Moleküls in Abhängigkeit von der räumlichen Lage seiner Atome. Eine zentrale Frage des *Molecular Modeling* ist die Ermittlung des energetischen Minimums bzw. der günstigsten Molekülgeometrie. Es können zwei große Klassen von Modellen unterschieden werden:

- Modelle auf der Grundlage quantenmechanischer Grundlagen, mit oder ohne Nutzung experimenteller Parameter („ab initio“ bzw. semiempirische Methoden)
- Modelle auf der Grundlage der klassischen Mechanik (Molekülmechanik) (Petersen, 2005)

3.4.2 Quantenmechanische Methoden

Ab-initio-Methode

Diese Methode berechnet die Schrödinger Gleichung für das jeweilige Molekül oder den Molekülverband. Die Lösung der Schrödingergleichung liefert die Elektronenwellenfunktion, die Informationen über die Verteilung der Elektronen in den Molekülen enthält. Da sich eine exakte Lösung für die Elektronenwellenfunktion nur für eine geringe Anzahl an Atomen angeben lässt, wird die Wellenfunktion für die anderen Atome und für Moleküle zusammengesetzt. Die Beiträge der einzelnen exakten Lösungen zur Gesamtwellenfunktion werden dabei so gewählt, dass die sich aus der Rechnung ergebene Gesamtenergie einem Minimum zustrebt. Sie setzt keine Kenntnis über die genaue Geometrie des zu untersuchenden Moleküls voraus. Wegen des hohen Rechenaufwandes zum Lösen der Schrödingergleichung sind Näherungsmethoden entwickelt worden (Krauch, 2003).

Semi-empirische Methoden

In dieser Methode werden ähnlich wie bei der ab-initio Methode die Elektronenwellenfunktionen aus den Lösungen für die exakt berechenbaren Atome zusammengesetzt. Besonders komplizierte Teilschritte werden nicht berechnet, sondern empirisch ermittelt. Die Wellenfunktion wird so näherungsweise bestimmt (Krauch, 2003). Die empirischen Daten werden so ermittelt, dass sie möglichst genau den experimentellen Daten entsprechen.

Eine weitere Anwendung der semi-empirischen Methoden besteht darin, nur die Valenzelektronen der miteinander korrespondierenden Atome zu betrachten (Höltje *et al.*, 2003). Diese beeinflussen in der Regel die wichtigen Moleküleigenschaften. Durch diese Betrachtung wird die Computerberechnungszeit minimiert.

Mit den quantenmechanischen Methoden Verfahren lassen sich aus den optimierten Molekülstrukturen folgende Eigenschaften berechnen: molekulares elektrostatisches Potential (MEP), Dipolmoment, Bindungskonstanten, Atomabstände, Molekülenergien und Elektronenaffinitäten.

3.4.3 Molekülmechanik

Diese Berechnungen dienen dazu, Wechselwirkungsenergien von Protein-Ligand-Komplexen zu bestimmen. Anstelle der expliziten Behandlung von Elektronen und Kernen wie im quantenmechanischen Rechenverfahren werden optimale Bindungen und Molekülgeometrien von kleinen Molekülfragmenten definiert, die in den quantenmechanischen Verfahren gewonnen werden. Geometrische Abweichungen von diesen optimalen Verhältnissen führen zum Aufbau von Spannungsenergien.

In anschaulicher Weise können die Atome in Molekülen als Massenkugeln dargestellt werden, die über Federn miteinander verbunden sind. Diese Spannungsenergien werden energetisch über Potentialfunktionen der klassischen Mechanik beschrieben. Diese Potentialfunktionen zur Bestimmung der potentiellen Gesamtenergie (E_{tot}) des Moleküls setzen sich aus Beiträgen der Bindungslängendeformation (E_{str}) und der Bindungswinkel- (E_{bend}) und Torsionswinkeldeformation (E_{tors}) zusammen. Die Wechselwirkungen zwischen Atomen, die nicht kovalent gebunden sind, werden über das Coulombpotential (E_{elec}) und das Lennard-Jones-Potential (E_{vdW}) für van der Waals Wirkungen beschrieben. Die Gesamtenergie E_{tot} wird also relativ zu den intramolekularen „Spannungen“ bestimmt. E_{tot} ist somit ein Maß für die intramolekulare Spannung eines Moleküls relativ zum hypothetischen Molekül mit idealer Geometrie. Durch Variation der Molekülgeometrie kann mit Hilfe der Gradientenmethode eine geometrieoptimierte Struktur berechnet werden.

Die Gleichgewichtswerte für die optimalen Bindungsparameter und die entsprechenden Kraftkonstanten der Potentialfunktionen werden als das so genannte Kraftfeld definiert. Für die verschiedenen Anwendungszwecke stehen verschiedene Kraftfelder zur Verfügung (Yarim *et al.*, 2001).

Energieminimierung

Im Vorfeld der molekularmechanischen Simulationen werden die Protein-Ligand-Komplexe einer Energieminimierung unterzogen. Energetisch ungünstige Bindungslängen und Bindungswinkel erhöhen die innere Energie des Systems. Um Bereiche ungünstiger geometrischer Anordnungen rasch zu entspannen, werden der Simulation die Energieminimierung vorgeschaltet (Scheib, 1999). Mathematisch gesehen entspricht dies der Minimumsuche in der Energiefunktion E_{tot} in Abhängigkeit der Atompositionen. Um diese Aufgabe zu lösen, werden verschiedene

mathematische Algorithmen angewendet, bei denen entweder alle Atome gleichzeitig oder einzelne Atompositionen nacheinander optimiert werden.

Docking-Verfahren

Mit Hilfe der Molekülmechanik, der Kraftfelder und der Bestimmung der relativen Bindungsenergien kann auf Bindungseigenschaften verschiedener Liganden mit einem Protein geschlossen werden. So ist es möglich, auf die Aktivität der Liganden als Substrat oder Inhibitor zu schließen. Wenn die Bindungstasche bekannt ist, können Substrate konstruiert werden, die optimal in das aktive Zentrum des Proteins passen.

Ein häufig angewandtes Verfahren wird als Docking bezeichnet. Unter dem Begriff Docking wird beim *Molecular Modeling* der Versuch verstanden, für die Bindung eines Liganden an ein Rezeptormolekül intermolekulare Wechselwirkungen zu visualisieren und Interaktionsenergien zu berechnen (Rademacher, 2003). Dabei werden Dockingprogramme angewendet, die eine Energieminimierung des Substrates in der Umgebung der Bindungstasche erlauben. Beachtet werden muss, dass sich sowohl die Struktur der Bindungstasche als auch die Konformation des Substrates während der gegenseitigen Wechselwirkungen verändern und beeinflussen können.

Es besteht dann die Möglichkeit, STD-NMR-Ergebnisse der Bindungsepitope zu nutzen und sie mit dem Docking-Ergebnis abzugleichen. Als zweite Möglichkeit können die Bindungsintensitäten des Bindungsepitops für das Docking verwendet werden, um aus diesen die Bindungsverhältnisse des Substrates in der Bindungstasche zu simulieren. Dadurch können Informationen darüber gewonnen werden, ob die Ergebnisse des Bindungsepitops einen energetisch günstigen Protein-Ligand-Komplex liefern. In der Literatur wird beschrieben, dass es möglich war, mit Hilfe von STD-NMR-Daten die Konformation von $\beta 4$ GalT1 kokristallisiert mit UDP-Gal neu zu definieren (Jayalakshmi *et al.*, 2004).

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte

- Photometer EPAC 6140, Eppendorf mit einem auf 37 °C temperierbaren 8-fach Küvettenrotor und Schüttler
- Ultraschall-Homogenisator: Bandelin HD 2200 mit Sonotrode KE76
- Magnetrührer mit geregelter Drehzahl: Ika RETvisc
- Einweg K-Küvetten, Eppendorf Nr. 4071
- Haushaltsmixer, Braun Typ 4184
- Titrator, Radiometer mit Autobürette ABU901 und Titrationsmanager TIM 900
- Thermostat 37 °C, Lauda E200
- Bruker Avance DRX 500 NMR-Spektrometer
- Bruker Avance DPN 250 NMR-Spektrometer
- NAPTM-25 Column, Pharmacia Biotech

4.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Sigma-Aldrich, Roth, Merck, J.T. Baker und Radiometer in Deutschland bestellt. Die porcine Pankreaslipase wurde freundlicherweise aufgereinigt von der Firma Solvay Pharmaceuticals in Deutschland zur Verfügung gestellt. Die aufgereinigte rekombinate humane Pankreaslipase wurde von der Firma IBA in Deutschland bezogen.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit einer Milipore Filtrationsanlage (in Lübeck) oder einer MembraPure Filtrationsanlage (in Hannover) angesetzt.

4.3 Molecular Modeling

Als Computersoftware für das *Molecular Modeling* kam das Programm Sybyl der Firma Tripos in der Version 6.9.2 aus dem Jahr 2004 zum Einsatz.

4.4 Methoden

4.4.1 Enzymaktivitätassays

Zur Anwendung kamen zwei verschiedene Assays, um die Aktivität der Pankreaslipase zu bestimmen. Beide Verfahren beruhen auf der Hydrolyse einer Esterbindung.

1. Bei dem *p*-Nitrophenylpalmitatassay (pNpp-Assay) dient das *p*-Nitrophenylpalmitat als Substrat, das durch die Lipase zu gelbem *p*-Nitrophenol hydrolysiert wird. Das *p*-Nitrophenol wird photometrisch bei 405 nm erfasst.
2. Bei dem Olivenölassay wird Olivenöl als Lipasesubstrat verwendet. Die Triglyceride des Olivenöls werden hydrolytisch zu zwei Fettsäuren und einem 2-Monoglycerid gespalten. Die freien Fettsäuren werden gegen Natronlauge titriert.

4.4.1.1 Durchführung des *p*-Nitrophenylpalmitatassays

60 mg *p*-Nitrophenylpalmitat wurden in 20 ml 2-Propanol mit Hilfe eines Ultraschallgerätes gelöst. Währenddessen wurden 67,5 mg Arabisch Gummi und 558 mg Natriumdeoxycholat in 135 ml eiskalter Natriumphosphat-Pufferlösung (0,05 M, pH 8,0) in Lösung gebracht. 15 ml der *p*-Nitrophenylpalmitatlösung wurden unter Rühren in die Pufferlösung eingespritzt und 60 Minuten im Eisbad weiter gerührt. Das *p*-Nitrophenylpalmitat lag in einer Konzentration von 0,8 mM vor. Diese Lösung diente als Substratlösung für die Kinetikmessungen.

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik wurde eine Substratlösung hergestellt, die nur eine *p*-Nitrophenylpalmitatkonzentration von 0,65 mM enthielt. Dafür wurden statt 60 mg nur 48,75 mg *p*-Nitrophenylpalmitat in 20 ml 2-Propanol gelöst und davon 15 ml in die Pufferlösung eingespritzt.

Aus dieser Stammlösung ist mit Natriumphosphat-Pufferlösung (0,05 M, pH 8,0) eine Verdünnungsreihe in Verdünnungsschritten von 0,05 mM bis zu einer Konzentration von 0,15 mM erstellt worden. Zusätzlich wurden noch die Verdünnungen 0,13 mM und 0,10 mM hergestellt.

Für alle Substratkonzentrationen galt, dass sie nur über 4 Stunden stabil waren. Die Ausgangsextinktion durfte eine Extinktionsänderung von 0,250 pro Minute nicht überschreiten. Als Messplatz diente das Photometer EPAC 6140 von der Firma Eppendorf mit den auf 37 °C temperierbaren 8-fach Küvettenrotoren und einem Schüttler.

Enzymlösungen

Für die Herstellung der Enzymlösung wurde die porcine Pankreaslipase in Natriumchloridlösung (1 %) gelöst. Die Einwaage wurde so gewählt, dass in einem Milliliter 40 Units Lipase enthalten waren. Ausgangsaktivität der porcinen Pankreaslipase waren 2200 U/mg. Zusätzlich zu der Lipase wurde noch die Colipase gelöst, und zwar mit 120 U/ml. Die Colipase besaß eine Aktivität von 130 U/mg.

Für die Enzymlösung mit rekombinanter humaner Lipase (Ausgangsaktivität 4000 U/mg) musste die humane Lipase erst entsalzt werden. Folgende Stoffe mussten entfernt werden: Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Natriumchlorid, EDTA und Desthiobiotin. Als Entsalzungssäule diente eine NAPTM-25 Column der Firma Pharmacia Biotech. Nach dem Entsalzen musste die Aktivität der humanen Lipase mit Hilfe des Olivenölassays (siehe 4.4.1.2) neu bestimmt werden, da durch den Reinigungsprozeß auch ein geringer Teil des Enzyms entfernt wurde. Die Lipase zeigte eine Aktivität von 3760 U/mg. Die Herstellung der Lipase-Colipaselösung erfolgte auf die gleiche Weise wie die Herstellung für die porcine Lipaselösung.

Inhibitorlösungen

Als Lösungsmittel für das Trifluormethylketon B 10682871 und das Orlistat für die kinetischen Messungen diente Dimethylsulfoxid.

Für das Trifluormethylketon wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 4000 µM hergestellt. Aus dieser wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 und 2000 µM. Als Verdünnungsreagenz wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt.

Für das Orlistat ist als Ausgangskonzentration eine Lösung mit 50 µM hergestellt worden. Als Verdünnungen wurden folgende Lösungen eingesetzt: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 und 10 µM.

Für den Versuch, ob das Trifluormethylketon B 10682871 reversibel oder irreversibel bindet, kamen die Inhibitorkonzentrationen von 4, 8, 20 und 80 nM zum Einsatz.

Unabhängig davon, welcher Versuch mit dem *p*-Nitrophenylpalmitat durchgeführt wurde, wurden von dem Substrat jeweils 1 ml und von der Inhibitor- und Enzymlösung jeweils 100 µl im Test eingesetzt.

4.4.1.2 Durchführung des Olivenölassays

Die Pufferlösung (1) bestand aus 0,303 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan und 1,17 g Natriumchlorid in 500 ml Wasser gelöst. Für die 8%ige Natriumtaurocholatlösung wurden 8 g Natriumtaurocholat in 100 ml Wasser gelöst. Die 10%ige Arabisch Gummi-Lösung enthielt 50 g Arabisch Gummi in 500 ml Wasser gelöst.

Als Reagenzienmischung (2) wurden 100 ml Natriumtaurocholatlösung, 400 ml Pufferlösung und 450 ml Wasser gemischt. Die Olivenöl-Emulsion bestand aus 40 ml Olivenöl, 330 ml Arabisch Gummi-Lösung und 30 g Eis. Sie wurde durch 15 minütiges Mixen im Haushaltsmixer emulgiert.

Für das Lipaselösungsmittel (3) wurden 5 g Natriumchlorid, 3,03 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 2,45 g Maleinsäureanhydrid in 500 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Die Natriumtaurocholatlösung und das Olivenölsubstrat mussten arbeitstäglich hergestellt werden.

Die Enzymlösungen für die humane und die porcine Pankreaslipase erfolgte in der gleichen Weise wie die Herstellung für den pNpp-Assay. Allerdings waren zwei Unterschiede zu beachten. Die Lipase wurde hier statt in Natriumchloridlösung (1 %) in Lipaselösungsmittel (3) pH 7,0 gelöst und nur auf eine Konzentration von 12 U/ml Lipase eingestellt. Es wurden 36 U/ml Colipase benötigt. Im Test wurde ein Milliliter Enzymlösung eingesetzt.

Die Titration erfolgte in einer automatischen Titrationsapparatur bei konstantem pH-Wert. In das thermostatisierte Reaktionsgefäß wurden 10,0 ml Olivenöl-Emulsion und 19,0 ml Reagenzienmischung (2) gegeben. Diese Mischung wurde auf 37 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Lipaselösung (12 U/ml) gestartet. Die freigesetzte Säure ist mit 0,1 N Natronlauge bei pH 9 über 5 Minuten titriert worden. Zur Auswertung wurde der Verbrauch zwischen der ersten und der fünften Minute eingesetzt.

4.4.2 NMR Experimente

Für alle NMR-Messungen ist als Lösungsmittel für die Inhibitoren d_6 -DMSO verwendet worden. Als Lösungsmittel für die Lipase diente deuteriertes Wasser (D_2O), versetzt mit 1 % Natriumchlorid.

4.4.2.1 Herstellung der Enzymlösung

Die von Solvay Pharmaceuticals zur Verfügung gestellte, aufgereinigte porcine Pankreaslipase konnte direkt für die STD-NMR-Messungen eingesetzt werden. Für die Messungen ist ein Konzentrationsverhältnis von Ligand zu Lipase von 100 : 1 gewählt worden. Die eingesetzte Pankreaslipase lag bei den STD-NMR-Messungen in einer Konzentration von 10 μM vor, das heißt, dass bei einem Molekulargewicht von 38 kDa 0,228 mg Lipase in 600 μl Lösungsmittelgemisch aus D_2O und d_6 -DMSO benötigt wurden. Die Lipase wurde in 60 μl einer wässrigen Natriumchloridlösung (1 %) gelöst. Diese Lösung wurde anschließend zu den 540 μl Inhibitorlösung (s. u.) gegeben.

Für die inaktivierte, denaturierte porcine Pankreaslipase wurden die 60 μl Lipaselösung für 60 Minuten auf 90 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert. Der erkaltete Überstand wurde für die STD-Messungen verwendet und zu den 540 μl Inhibitorlösung pipettiert.

4.4.2.2 Herstellung der Inhibitorlösungen

Trifluormethylketon B 10682871

Für die Bestimmung der Löslichkeit wurde eine Stammlösung mit 8,88 mg des Trifluormethylketons ($M_r = 370,5$) in 2400 μl d_6 -DMSO hergestellt (10 mM). Aus dieser Stammlösung wurde jeweils eine Verdünnung mit unterschiedlichem D_2O -Anteil hergestellt, und zwar von 0 % - 90 % D_2O in 5%-Schritten. Jede dieser Lösungen enthielt 1 mM Inhibitor in 600 μl Lösungsmittelgemisch. Gemischt wurde die Lösung direkt im NMR-Röhrchen. Diese Spektren wurden sowohl bei 12 °C als auch bei 37 °C gemessen.

Für die STD-NMR-Messungen wurden 0,222 mg Hemmstoff in 300 μl d_6 -DMSO und in 240 μl 1%ige Natriumchloridlösung gelöst (1 mM). Nach dem Erkalten dieser Lösung wurden 60 μl der unter 4.4.2.1 beschriebenen Lipaselösung zugesetzt.

Für die Signalzuordnung wurde eine d_6 -DMSO-Stammlösung des Inhibitors hergestellt, die 100 mM (88,8 mg) in 600 μ l d_6 -DMSO enthielt. Die Stammlösung wurde so verdünnt, dass in 600 μ l eines Lösungsmittelgemisches aus 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O 10 mM (8,88 mg) Substanz enthalten waren.

Trifluormethylketon B 10646964

Um die Löslichkeit der Substanz zu bestimmen, wurde eine Stammlösung der Substanz in d_6 -DMSO mit 10 mM erstellt ($M_r = 275$), das entspricht einer Einwaage von 4,95 mg in 1800 μ l. Aus dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen D_2O -Anteilen hergestellt. Die Konzentration jeder Lösung betrug 1 mM. Die Verdünnungen hatten einen D_2O -Anteil von 50 % - 90 %, und zwar in 5%-Schritten.

Für die STD-NMR-Messungen wurde in gleicher Weise verfahren wie für das Trifluormethylketon B 10682871. In einem Gemisch aus 300 μ l d_6 -DMSO und 240 μ l Natriumchloridlösung (1 %) wurden 0,165 mg Hemmstoff (1 mM) gelöst. Nach dem Erkalten dieser Lösung wurden 60 μ l der unter 4.4.2.1 beschriebenen Lipaselösung zugesetzt.

Für die Signalzuordnung wurden Lösungen von Konzentrationen mit 50 mM (8,25 mg), 1 M (165 mg) und 3 M (495 mg) in 600 μ l d_6 -DMSO hergestellt. Die Konzentration von 3 M wurde für die INADEQUATE-Experimente benötigt. Für diese Versuche sind sehr hohe Substanzkonzentrationen erforderlich.

Trifluormethylketon B 10551089

Die Lösung für die STD-NMR-Messungen wurde identisch zu dem Trifluormethylketon B 10682871 hergestellt. Für eine 1 mM Probe wurden 0,157 mg Inhibitor in einem Gemisch aus 300 μ l d_6 -DMSO und 240 μ l Natriumchloridlösung (1 %) gelöst. Nach dem Erkalten der Lösungen wurden 60 μ l Enzymlösung, wie in Kapitel 4.4.2.1 beschrieben, hinzugefügt.

Um die Struktur für diese Substanz ($M_r = 261$) zu klären, wurde eine Lösung mit 33 % D_2O und 67 % d_6 -DMSO, in der 50 mM (7,83 mg in 600 μ l) des Trifluormethylketons gelöst waren, hergestellt. Aufgrund der hohen Konzentration

musste der Anteil an d_6 -DMSO von 50 % auf 67 % erhöht werden, damit die Substanz löslich war.

Trifluormethylketon B 10539242

Für die Durchführung der STD-NMR-Messungen wurde eine 1 mM Lösung des Inhibitors (0,148 mg, $M_r = 246$) in einem Lösungsmittelgemisch aus 300 μ l d_6 -DMSO und 240 μ l Natriumchloridlösung (1 %) hergestellt. Die Herstellung erfolgte in gleicher Weise wie für den Hemmstoff B 10682871. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden 60 μ l Lipaselösung, hergestellt wie in Kapitel 4.4.2.1 beschrieben, hinzugegeben.

Die Lösung für die Aufklärung der Struktur enthielt 7,38 mg (50 mM) Substanz, die in 600 μ l eines Gemisches aus 67 % d_6 -DMSO und 33 % D_2O gelöst wurde. Es war ein erhöhter d_6 -DMSO-Anteil nötig, damit die Substanz in Lösung gebracht werden konnte.

Trifluormethylketon B 10694628

Die für diese Substanz ($M_r = 238$) benötigte Lösung zur Strukturaufklärung enthielt 50 mM (7,14 mg in 600 μ l) Hemmstoff, gelöst in einem Lösungsmittelgemisch aus einem Teil d_6 -DMSO und einem Teil D_2O .

Für die Aufnahme des STD-NMR-Spektrums wurde eine 1 mM (0,143 mg) Probe hergestellt. Als Lösungsmittel diente eine Mischung aus 300 μ l DMSO und 240 μ l Natriumchloridlösung (1 %). Nach Erkalten dieser Lösung wurden 60 μ l Lipaselösung zugegeben, die, wie in Kapitel 4.4.2.1 beschrieben, hergestellt wurde.

Trifluormethylketon B 10683207

Für diese Substanz ($M_r = 457$) wurde nur der Versuch zur Löslichkeit durchgeführt. Ausgehend von einer 100 μ M Probe (0,007 mg in 600 μ l) in 100 % d_6 -DMSO wurde eine Mischungsreihe mit D_2O in 5%-Schritten erstellt, wobei es wichtig war, dass jede Mischung dieselbe Menge an Substanz, nämlich 100 μ M, enthielt. Es wurden immer drei Mischungsverhältnisse in einem NMR-Röhrchen hergestellt. Zwischen 35 % und 45 % D_2O -Anteil wurde die Mischungsreihe in 1%-Schritten wiederholt, um den exakten Punkt für die kritische Micellbildungskonzentration zu ermitteln.

Orlistat

Die für die STD-NMR-Messungen benötigte Lösung enthielt 0,0297 mg Hemmstoff ($M_r = 495$) in 6 μl d_6 -DMSO (100 μM). Diese Lösung wurde benutzt, um die Bindungsstelle für das Trifluormethylketon B 10682871 zu bestimmen.

4.4.2.3 Tributyrinlösung

Eine Stammlösung mit 50 mM Glyceroltributyrat (Tributyrin) ($M_r = 302$) in 600 μl d_6 -DMSO wurde hergestellt. Für die NMR-Messungen wurden 6 μl (500 μM) dieser Stammlösung eingesetzt.

4.4.2.4 Verschiebungsreagenzien für die NMR-Messungen

Mit diesen Reagenzien wurden jeweils Stammlösungen erstellt, die 5 mM Substanz in 600 μl D_2O enthielten. Zum Einsatz kamen vier verschiedene Substanzen.

Als erstes wurde die Substanz Europium tris[3-(heptafluoropropylhydroxymethyl)-(+)-camphorat], 98 % mit einem Molekulargewicht von 1193 verwendet. Ein weiteres Reagenz war Resolve-AlTM AgFOD, 99 % mit einem Molekulargewicht von 403. Darüber hinaus kam die Verbindung Resolve-AlTM EuFOD, 99 % ($M_r = 1037$) zur Anwendung. Als viertes Verschiebungsreagenz wurde Resolve-AlTM Yb, 98 % eingesetzt. Diese Verbindung hat ein Molekulargewicht von 723.

Die Messlösung enthielt 240 μl d_6 -DMSO, 60 μl einer 10 mM d_6 -DMSO-Stammlösung des Trifluormethylketons B 10646964, 60 μl einer D_2O -Stammlösung mit 5 mM Verschiebungsreagenz und 240 μl D_2O . Für jedes der vier Verschiebungsreagenzien wurde eine Messlösung hergestellt.

4.4.2.5 Bedingungen für die NMR-Messungen

Die in dieser Arbeit aufgeführten ^1H -, ^{13}C -, ^{19}F -, INADEQUATE- und 2D NMR-Spektren wurden bei 37 °C an einem 6,05 T (für ^1H 250 MHz, für ^{13}C 67,5 MHz, für ^{19}F 235 MHz) Bruker DPN Spektrometer, ausgestattet mit einem QNP z-Achsen Gradient Probenkopf, aufgenommen. Falls andere Temperaturen verwendet wurden, ist dies bei dem jeweiligen Experiment erwähnt. Die Messungen wurden in einem 5 mm Norell 502 NMR-Tube mit einem Probenvolumen von 600 μl durchgeführt.

4.4.2.6 Bedingungen für die STD-Messungen

Die ^1H -STD-NMR Experimente wurden bei $12\text{ }^\circ\text{C}$ an einem $12,1\text{ T}$ (für ^1H $500,35\text{ MHz}$) Bruker DRX Spektrometer, ausgestattet mit einem 5 mm TXI HCN z-Achsen Gradient Probenkopf, aufgenommen. Die Messungen wurden in einem $5\text{ mm Norell 502 NMR-Tube}$ mit einem Probenvolumen von $600\text{ }\mu\text{l}$ durchgeführt. Die Proteinkonzentration lag jeweils zwischen 1 und $10\text{ }\mu\text{M}$, während die Ligandenkonzentration zwischen 100 und 1000 mM lag. Die STD-NMR- und die Referenz-Experimente wurden mit der in Abbildung 4.1 dargestellten Pulsfrequenz durchgeführt. Es wurde eine Sättigungszeit von 2 sec mit einer *off-resonance* Frequenz von -20 ppm und einer *on-resonance* Frequenz von -2 ppm gewählt. Die Ausnahme von diesen Bedingungen war die Substanz B 10694628. Für diese wurde eine *on-resonance* Frequenz von 8 ppm gewählt. Die Sättigung wird durch 40 $49\text{ msec Gauss-Pulse}$ (1000 Punkte mit 1% Truncation), jeweils mit einer Feldstärke von 110 Hz und durch einen Delay von 1 msec getrennt, erreicht. STD-Spektren wurden mit 2048 Scans und Referenz-Spektren mit 1024 Scans aufgenommen.

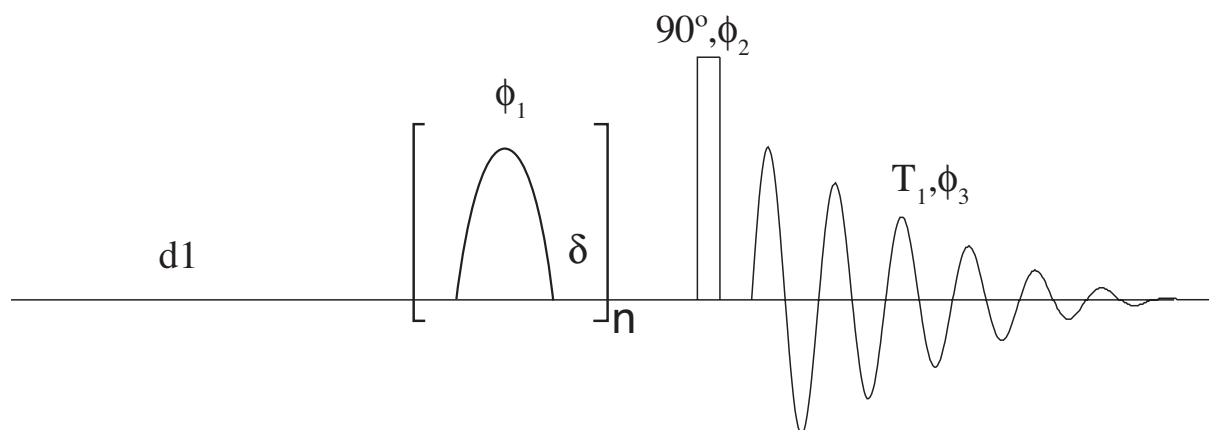


Abb. 4.1 Pulssequenz für STD-NMR-Experimente. Die Proteinsättigung wird durch selektive Pulse mit der Phase $\phi_1 = x$, die durch den Delay δ getrennt sind, erreicht. Der anschließende starke 90° Puls bringt die Magnetisierung des Liganden in die x,y -Ebene. Anschließend erfolgt die Detektion. Die Differenzbildung erfolgt über den Phasenzyklus nach jedem Scan. Die *on-* und *off-resonance* Frequenzen liegen bei -2 (8) ppm und -20 ppm . Für die Spektren wurden die Pulsphase $\phi_2 = 2x,4-x,2x,2y,4-y,2y$, für die STD-Spektren die Pulsphase $\phi_3 = x,2-x,x,-x,2x,-x, y, 2-y,y,-y,2y,-y$ und für die Referenz-Spektren $\phi_3 = 2x,4-x,2x,2y,4-y,2y$ verwendet. $d1$ ist ein zusätzlicher Relaxations-Delay, damit die Probe zwischen den Pulsen wieder in den Gleichgewichtszustand zurückkehren kann.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 STD-Ergebnisse zur Protease 3C

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst ^1H -STD-NMR-Messungen mit dem Enzym Protease 3C des Hepatitis A Virus durchgeführt. Die Protease 3C spielt eine Schlüsselrolle für das Virus, da es für die Bildung von Virusprotein aus dem Vorläufer-Polyprotein verantwortlich ist. Zum Einsatz kam die inaktive Doppelmutante C24S/C172A, die es erlaubte, als Liganden Peptide mit Spaltstelle zu untersuchen, ohne dass diese gespalten wurden. Außerdem wurde durch die Verwendung der Doppelmutante verhindert, dass sich Dimere der Protease ausbilden, die bei dem Wildtyp entstehen. Als Liganden kam u. a. das Peptid mit der natürlichen Sequenz Ac-LRTQSFSNL-OH zum Einsatz. Mittels STD-NMR-Spektroskopie sollte die Bindung des Peptids an die Protease 3C bestimmt werden. Für keinen Liganden konnte, trotz Veränderung der Messbedingungen wie z. B. Temperaturänderung und Änderung des Ligandenüberschusses, ein STD-Effekt gemessen werden. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte festgestellt werden, dass die Dissoziationsrate k_{off} kleiner als 1 s^{-1} ist und somit die Voraussetzungen für die STD-Messungen nicht erfüllt waren (Peters *et al.*, 2005). Die Verweilzeit des Peptids an die Protease 3C ist zu lang und daher ist kein effektiver Austausch zwischen gebundenem und freiem Liganden möglich.

5.2 Enzymkinetik der Pankreaslipase. Inhibition der Pankreaslipase durch Trifluormethylketone im Vergleich zu Orlistat

Trifluormethylketone sind als Pankreaslipaseinhibitoren ausgewählt worden, da in der Literatur (u. a. Gelb *et al.*, 1985; Liang und Abeles, 1987) Peptidyl-fluoromethylketone als Serinproteaseinhibitoren erwähnt werden. Analog zur Serinproteaseinhibition wird davon ausgegangen, dass auch Serinesterasen wie die Pankreaslipase durch Trifluormethylketone blockiert werden, da ihre aktiven Zentren eine Homologie aufweisen.

Serinproteasen zeigen wie die Lipase ebenfalls eine katalytische Triade, die aus den Aminosäuren Serin, Aspartat und Histidin besteht. Auch die Oxyanion-Höhle, gebildet aus Glycin und dem Serin der katalytischen Triade, die strukturell zum aktiven Zentrum gehört, ist identisch. Daher kann vermutet werden, dass sich die

Trifluormethylketone als Inhibitoren für die Lipase identisch wie die Peptidylfluoromethylketone als Inhibitoren für die Serinproteasen verhalten.

Zu der Gruppe der Serinproteasen gehören u. a. das α -Chymotrypsin, die Schweinepankreaselastase, die Acetylcholinesterase und die menschliche Leukozytenelastase.

5.2.1 Stabilität in wässriger Lösung

Die Stabilität von porciner und rekombinanter humaner Lipase in wässriger Lösung wurde anhand des Olivenölassays nachgewiesen. Die porcine und humane Lipase wurden jeweils in Lipaselösungsmittel pH 7,0 (siehe 4.4.1.2) gelöst. Zusätzlich war jeweils Colipase in den Lösungen anwesend. Die Aktivität beider Lipasen wurde innerhalb von 24 Stunden in regelmäßigen Abständen gemessen, wobei die Lösung bei 4 °C gelagert wurde (Abb. 5.1). Die Ausgangsaktivität der porcinen Lipase betrug 2200 U/mg, die der humanen Lipase 3760 U/mg.

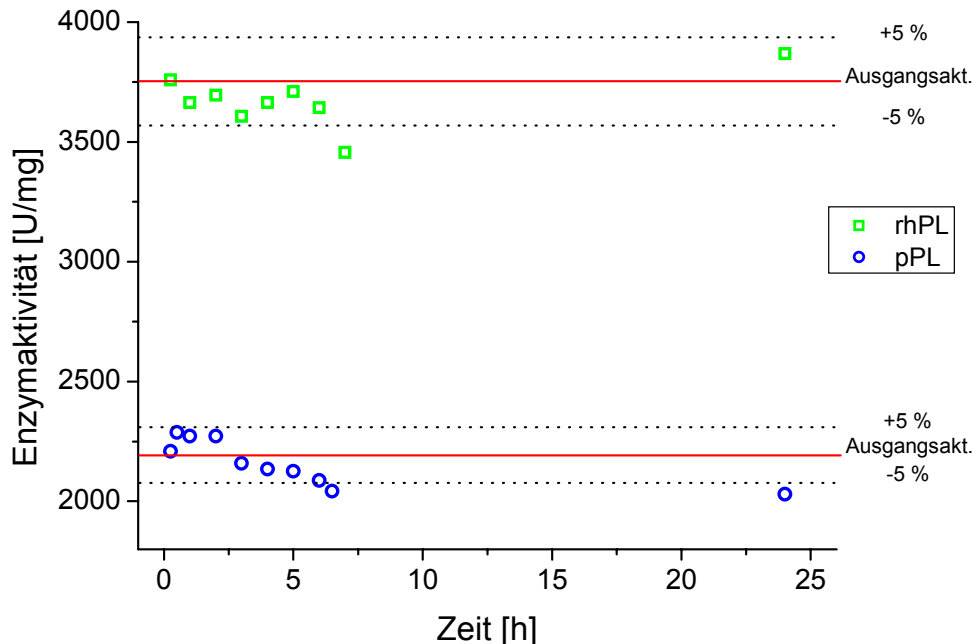


Abb. 5.1 Aktivitätsverlust über 24 h von porciner (pPI) und humaner (rhPI) Pankreaslipase in Anwesenheit von Colipase, der im Olivenölassay nachgewiesen wurde. Die Enzymlösungen wurden bei 4 °C gelagert. Die Ausgangsaktivität der pPI betrug 2200 U/mg, die der rhPI 3760 U/mg.

Nach 24-stündiger Lagerung der wässrigen Lipaselösungen kam es bei der porcinen Lipase zu einem Aktivitätsverlust von 8 %, der zum einen durch Messfehler (bis 5 %) zum anderen möglicherweise durch Denaturierung zu erklären ist. Die Denaturierung überlagert die Messfehler, die somit nicht diskriminierbar sind. Bei einer Denaturierung kommt es zu einer Zerstörung der Raumstruktur von Proteinen, die durch das Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine begründet ist. Des Weiteren kann der Aktivitätsverlust auch durch die Spuren von Proteasen, bewirkt werden, die bei der Aufreinigung nicht beseitigt wurden. Sie zerstören die Lipase.

Die 24-stündige Lagerung der humanen Lipase zeigte nur eine Änderung der Ausgangsaktivität, die im Bereich des Messfehlers liegt, das heißt, es kam nicht zu einem Aktivitätsverlust. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass ein Messwert außerhalb des Messfehlerbereiches von 5 % liegt. Dieser Wert zeigt eine Abweichung von 5,8 % vom Mittelwert. Eine Erklärung für diese Abweichung gibt es nicht, da der nachfolgende Wert bei 24 h wieder im Intervall des Messfehlers von 5 % liegt. Eine Denaturierung der humanen Lipase erfolgte scheinbar nicht.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass für alle Versuche im wässrigen Milieu eine ausreichende Stabilität der Lipasen vorlag, da keines der durchgeführten NMR-Experimente mehr als 24 h benötigte.

War neben der Pankreaslipase keine Colipase anwesend, konnte nachgewiesen werden, dass die Nachweisgrenze des Assays für die Aktivität unterschritten wurde. Für dieses Ergebnis können drei Gründe angeführt werden: Durch das Fehlen der Colipase in der Substratemulsion ist die Anlagerung der Lipase an die Phasengrenze erschwert, wodurch die Hydrolyse der Triglyceride verlangsamt ist. Des Weiteren wird das Lid, welches das aktive Zentrum der Lipase bedeckt, nicht durch die Colipase geöffnet. Dadurch ist der Zugang für das Substrat zum aktiven Zentrum blockiert. Als dritter Grund ist anzuführen, dass die Lipase durch die Gallensäuren in der Substratlösung inhibiert wird. Dieser Inhibition würde die Colipase entgegenwirken.

5.2.2 Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels

Für die Inhibitionsversuche musste aufgrund der Unlöslichkeit der Trifluormethylketone in Wasser ein organisches Lösungsmittel gefunden werden, in dem die Lipase aktiv war und zugleich die Hemmstoffe löslich waren. Viele

Lösungsmittel führen, wenn sie ohne Wasser gemischt vorliegen, bei der Anwesenheit eines Alkohols zu einer Lipase-katalysierten Umesterung (Zaks und Klibanov, 1985). Zu diesen Lösungsmitteln zählen n-Hexan, Acetonitril, Tetrahydrofuran und Ethylether. Wurden diese Lösungsmittel mit Wasser gemischt bzw. als Zweiphasensystem mit Wasser eingesetzt und die Lipase in diesem neuen System gelöst bzw. suspendiert, war die Lipase im *p*-Nitrophenylpalmitatassay inaktiv. Auch in Aceton, Aceton-Wassergemischen, Acetonitril-Methanolgemischen, *tert*-Butanol, Dichlormethan, Dimethylformamid und Trichlormethan zeigte die Lipase, keine Aktivität im Test, wenn sie in diesen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen gelöst oder suspendiert wurde (Tab. 5.1).

Als geeignetes Lösungsmittelgemisch hat sich eine Mischung aus 1 Teil DMSO und 1 Teil Wasser herausgestellt. Durch den Anteil an DMSO konnten auch die Inhibitoren in Lösung gebracht werden.

Tab. 5.1 Darstellung der Lipaseaktivität in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. verschiedenen Lösungsmittelgemischen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigt die Pankreaslipase nur in einem Lösungsmittelgemisch aus DMSO und Wasser in einem Verhältnis von 1 : 1 Aktivität. Als Aktivitätstest diente der pNpp-Assay.

Lösungsmittel/-gemische	aktiv
Aceton	-
Aceton-Wassergemische	-
Acetonitril-Methanolgemische	-
<i>tert</i> -Butanol	-
Dichlormethan	-
Trichlormethan	-
Dimethylformamid	-
DMSO	-
DMSO-Wasser (1 : 1)	+

5.2.3 Stabilität in einer Wasser-DMSO-Mischung

DMSO beeinflusst die Aktivität verschiedener Lipasen. Es gibt zum Teil mikrobiell gewonnene Lipasen, die durch einen hohen Anteil an DMSO (bis zu 50 %) ihre Aktivität bis zum Vierfachen steigern. Die Aktivität der porcinen Pankreaslipase wird allerdings durch den Zusatz von DMSO vermindert. Als Substrat wurde Methylumbelliferyloleat (4MUO) verwendet (Tsuzuki *et al.*, 2001).

Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, wie stark der Aktivitätsverlust der Lipase bei der Anwesenheit von DMSO war. Hinsichtlich eines Gemisches aus 1 Teil Wasser und 1 Teil DMSO wurde in Bezug auf die Lipasestabilität ein Kompromiss eingegangen. Zwar verlor die Lipase an Aktivität, aber die lipophilen Trifluormethylketone als Lipaseinhibitoren waren unter diesen Bedingungen löslich, so dass Inhibitionsstudien durchgeführt werden konnten. Um die Aktivitätsverluste zu ermitteln, wurden mit Hilfe des pNpp-Assays Lipaseaktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur, der Zeit und dem Lösungsmittelverhältnis untersucht. Es wurde eine Zeitdauer für die Präinkubation von 10 min und 240 min gewählt. Die Präinkubationsdauer von 10 min sollte den sofortigen Aktivitätsverlust ermitteln. Verglichen wurde dieser Verlust mit dem Aktivitätsverlust bei 240 min Präinkubation, der für die STD-NMR-Messungen relevant war. Die Dauer für eine STD-Messung umfasste 240 min. Als Präinkubationstemperatur wurde zum einen eine Temperatur von 4 °C verwendet, da die meisten Enzyme umso stabiler sind, wenn sie bei niedrigen Temperaturen gelagert werden. Zum anderen wurde auch 37 °C als Präinkubationstemperatur gewählt, da diese Temperatur der menschlichen Körpertemperatur entspricht.

Wie aus der Tabelle 5.2 hervorgeht, war der Aktivitätsverlust für die porcine Pankreaslipase bei 37 °C und 240 min Präinkubation bei 50 % DMSO-Anteil während der Präinkubation am größten. Die Lipase behielt unter diesen Bedingungen nur eine Restaktivität von 29 %. Als Vergleichswert diente der Aktivitätsverlust ohne Präinkubation, bei dem die Lipaseaktivität direkt im pNpp-Assay nach dem Mischen von Lipaselösung und DMSO gemessen wurde. Die Restaktivität betrug unter diesen Bedingungen 97 %.

Tab. 5.2 Darstellung des Einflusses der Präinkubationszeit und Präinkubationstemperatur auf die Restaktivität der porcinen Pankreaslipase in Anwesenheit von 50 % DMSO. Als Vergleichswert dient der Wert ohne Präinkubation, bei dem die Restaktivität direkt nach dem Mischen der Lipase mit dem DMSO im pNpp-Assay gemessen wurde.

50 % DMSO-Anteil	Lipaserestaktivität [%]
ohne Präinkubation	97
240 min Präinkubation bei 37 °C	29
10 min Präinkubation bei 37 °C	70
240 min Präinkubation bei 4 °C	74
10 min Präinkubation bei 4 °C	83

Nach der Änderung der Präinkubationstemperatur von 37 °C auf 4 °C bei derselben Präinkubationszeit und demselben DMSO-Anteil zeigte die Lipase eine Restaktivität von 74 %. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Präinkubationstemperatur einen starken Einfluss auf die Lipasestabilität und Lipaseaktivität hat. Wurde die Präinkubationszeit von 240 min auf 10 min verkürzt, war auch der Aktivitätsverlust bei 37 °C stark vermindert. Die Restaktivität lag dann noch bei 70 %. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Präinkubationstemperatur als auch die Präinkubationszeit die Restaktivität beeinflussen. Auch für die Präinkubationstemperatur von 4 °C für eine Präinkubationszeit von 10 min konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Restaktivität erhöhte sich um 9 % auf 83 % gegenüber dem Wert bei 240 min. Der Aktivitätsverlust scheint bei allen Messungen durch Denaturierung zustande zu kommen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei einem DMSO-Wassergemisch von 1 : 1 der Aktivitätsverlust der Lipase zum einen von der Präinkubationszeit, aber auch von der Präinkubationstemperatur abhängig ist.

Weiterhin galt es zu klären, wie stark der Aktivitätsverlust durch das DMSO ist. Um den Einfluss zu ermitteln, wurden unter denselben Präinkubationsbedingungen statt 50 % nur 43 % DMSO eingesetzt (Tab. 5.3).

Tab. 5.3 Darstellung des Einflusses der Präinkubationszeit und Präinkubationstemperatur auf die Restaktivität der porcinen Pankreaslipase in Anwesenheit von 43 % DMSO. Als Vergleichswert dient der Wert ohne Präinkubation, bei dem die Restaktivität direkt nach dem Mischen der Lipase mit dem DMSO im pNpp-Assay gemessen wurde.

43 % DMSO-Anteil	Lipaserestaktivität [%]
ohne Präinkubation	97
240 min Präinkubation bei 37 °C	48
10 min Präinkubation bei 37 °C	77
240 min Präinkubation bei 4 °C	86
10 min Präinkubation bei 4 °C	86

Aus den Ergebnissen in Tabelle 5.3 geht eindeutig hervor, dass auch die Menge an DMSO, die während der Präinkubation anwesend war, einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Restaktivität der porcinen Pankreaslipase hat. So zeigte die Lipase nach 240 min Präinkubation bei 37 °C und 43 % DMSO eine um 19 % höhere Restaktivität gegenüber dem Wert bei 50 % DMSO (29 % Restaktivität). Bei einer Präinkubationstemperatur von 4 °C machte der Unterschied in der Restaktivität 12 % aus, wenn das DMSO nur in einer Konzentration von 43 % vorlag. Sie lag bei 86 %. Auch für die Präinkubationszeit von 10 min bei 43 % DMSO wurde die Restaktivität erhöht. Der Aktivitätsverlust durch DMSO beruhte scheinbar auf der Denaturierung des Enzyms.

Diese Werte zeigen, dass in Gegenwart von 43 - 50 % DMSO die NMR-Messungen nicht bei 37 °C durchgeführt werden sollten, da die Dauer der Messungen eher im 240 min Zeitraum als im 10 min Zeitraum liegen und unter diesen Bedingungen dann Aktivitätsverluste von mindestens 50 % hingenommen werden müssten.

Anhand dieser Ergebnisse ist für die NMR-Messungen eine Temperatur von 12 °C gewählt worden. Einige Trifluormethylketone führten scheinbar zu einer Gefrierpunktserhöhung und daher waren die Messungen bei 4 °C nicht möglich. Mittels NMR-Spektroskopie konnte eine ausreichende Stabilität und Aktivität der porcinen Pankreaslipase für die Dauer der NMR-Messungen belegt werden (Kap. 5.3.3).

5.2.4 Notwendigkeit von Colipase für die Aktivitätstests und für die NMR-Messungen

Die Colipase erleichtert der Lipase den Zugang zur Phasengrenze zwischen der lipophilen und der hydrophilen Phase. Bei der Anlagerung von Lipase an die Phasengrenze kommt es zu einer Konformationsänderung am aktiven Zentrum der Lipase, die zu einer zweiten Bindungsstelle für die Colipase führt (Egloff *et al.*, 1995). Die Colipase gelangt so in den Kontakt mit dem Lid der Lipase, welches das aktive Zentrum bedeckt und dieses dadurch öffnet. So sorgt die Colipase für eine Verstärkung der Wechselwirkungen an der Phasengrenze. Außerdem wirkt die Colipase den inhibitorischen Effekten der Gallensäuren entgegen. Weiterhin verschiebt sie das Gleichgewicht zwischen „offener“ und „geschlossener“ Form der Lipase zugunsten der „offenen“ Form, das heißt, dass das Lid über dem aktiven Zentrum im geöffneten Zustand vorliegt.

Sowohl im *p*-Nitrophenylpalmitatstest als auch im Olivenölassay muss Colipase im Testansatz vorhanden sein, da in beiden Verfahren Gallensäuren anwesend sind, die ansonsten zu einer Inhibierung der Pankreaslipase führen würden. Weiterhin liegt in beiden Assays als Substratlösung eine Emulsion vor, die den Speisebrei simulieren soll. Dieses ist der zweite Grund für die Verwendung der Colipase im Testansatz, da so der Kontakt zur Phasengrenze hergestellt wird.

In Abwesenheit der Colipase liegt zwar aufgrund des Gleichgewichts auch immer die „offene“ Form der Lipase vor, aber die Reaktionsgeschwindigkeit des Substrates ist stark vermindert. Die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} wird somit nicht erreicht.

Beide Testverfahren sind nicht für diese verminderte Reaktionsgeschwindigkeit ausgelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze unterschritten wurde.

Die Umsetzung des *p*-Nitrophenylpalmitats ohne Anwesenheit von Colipase konnte daher nur visuell erfasst werden. Nach 12 Stunden konnte bei identischen Substratkonzentrationsverhältnissen wie bei einem colipasehaltigen Ansatz die Umsetzung durch eine schwache Gelbfärbung, die durch die enzymatische Hydrolyse des Substrats entstanden ist, nachgewiesen werden. Ein visueller Vergleich mit einem colipasehaltigen Ansatz und ein Blindversuch, in dem keine Lipase anwesend war, wurden durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hydrolyse durch die Lipase hervorgerufen wurde.

Für die NMR-Versuche war die Anwesenheit der Colipase nicht erforderlich, da weder ein zweiphasiges System noch Gallensalze vorlagen. Da aufgrund des

Gleichgewichts auch immer die „offene“ Form der Lipase vorliegt, war der „offene“ Anteil ausreichend, um die NMR-Experimente durchzuführen.

5.2.5 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m von rekombinanter menschlicher Pankreaslipase (rhPI) und porciner Pankreaslipase (pPI) unter Verwendung des Substrates *p*-Nitrophenylpalmitat

Zur Durchführung dieser Bestimmung wurde der *p*-Nitrophenylpalmitatassay verwendet, in dem *p*-Nitrophenylpalmitat durch die Lipase zu gelbem *p*-Nitrophenol hydrolysiert wird.

Mit einer Lipaselösung mit 40 U/ml und Substratkonzentrationen zwischen 0,10 mM und 0,65 mM, welche den gesamten Reaktionsbereich des Enzyms abdeckten, wurden die Michaelis-Menten-Konstanten K_m von porciner und humaner Pankreaslipase für das Substrat *p*-Nitrophenylpalmitat bestimmt (Abb. 5.2).

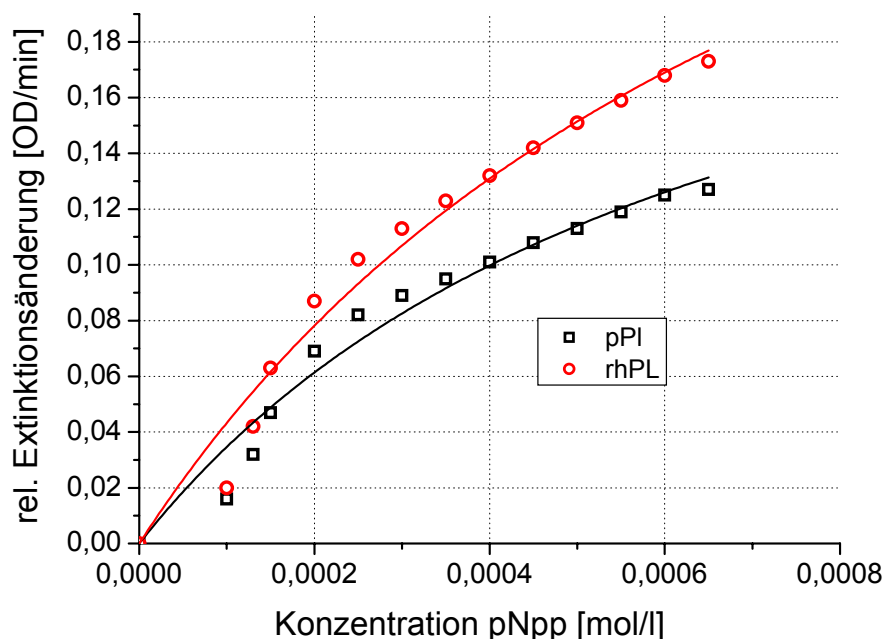


Abb. 5.2 Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik für porcine (pPI) und humane (rhPI) Pankreaslipase mit *p*-Nitrophenylpalmitat (pNpp) als Substrat. Als Ergebnis für die Michaelis-Menten-Konstante K_m wird für die pPI ein Wert von $6,7 \cdot 10^{-4}$ M und für die rhPI ein Wert von $8,3 \cdot 10^{-4}$ M erhalten.

Die Konstante K_m gibt diejenige Substratkonzentration an, für welche die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms halbmaximal ist. Sie stellt näherungsweise ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar. Als Michaelis-Menten-Konstante ergab sich für die porcine Pankreaslipase ein K_m -Wert von $6,7 \cdot 10^{-4}$ M und für die humane Pankreaslipase ein K_m -Wert von $8,3 \cdot 10^{-4}$ M für das Substrat *p*-Nitrophenylpalmitat.

Durch diese Bestimmung wurde gezeigt, dass das Verhalten beider Lipasen gegenüber *p*-Nitrophenylpalmitat nahezu identisch ist. Auffallend ist, dass die Reaktionsgeschwindigkeit von humaner Lipase etwas höher ist. Die Affinität des Enzyms zum Substrat scheint höher zu sein. Als Grund für dieses Verhalten ist möglicherweise eine tatsächlich höhere Affinität der rhPI gegenüber der pPI anzuführen. Auch sind herstellungsbedingte Gründe, wie z. B. die Herstellung der Enzymlösung denkbar. Allerdings beinhaltet jede Konzentration eine Mehrfachbestimmung ($n = 45$), so dass die herstellungsbedingten Gründe eher eine untergeordnete Rolle spielen.

Die ermittelten Werte gelten für ein wässriges System. Für die in Kapitel 5.3 folgenden NMR-Ergebnisse wurde ein Lösungsmittelgemisch aus einem Teil Wasser und einem Teil DMSO gewählt, da nur für dieses Gemisch gewährleistet war, dass sowohl die porcine Pankreaslipase aktiv war als auch die Inhibitoren in Lösung gehalten werden konnten. Die Durchführung des pNpp-Testes für dieses Lösungsmittelgemisch war nicht möglich, da weder das Arabisch Gummi noch das Deoxycholat und *p*-Nitrophenylpalmitat in Lösung blieben.

5.2.6 Inhibition der porcinen Pankreaslipase durch Trifluormethylketone

Für die Pankreaslipase, die zur Gruppe der Serinesterasen gehört, wurden Trifluormethylketone als Inhibitoren ausgewählt, da Peptidyl-fluoromethylketone als Inhibitoren für Serinproteasen gelten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Trifluormethylketone die Lipase nach dem identischen Schema wie die Serinproteasen inhibieren. Die Serinprotease Acetylcholinesterase wird durch Ausbildung eines stabilen Hemiketals mit dem Serin 195 des aktiven Zentrums und einem Difluormethylketonrestes des Hemmstoffs inhibiert (Gelb *et al.*, 1985). α -Chymotrypsin als weitere Serinprotease bildet ebenfalls ein Hemiketal zwischen demselben Serin und einem Trifluormethylketonrest des Inhibitors aus (Liang und Abeles, 1987). Durch den nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serins wird

eine kovalente Bindung zum elektrophilen Kohlenstoff der Carbonylgruppe angenommen. Weitere Beispiele für diesen Inhibitionsmechanismus sind in der Literatur zu finden. Dazu zählen u. a. die Inhibition der humanen Leukozytenelastase (Brown *et al.*, 1994; Damewood *et al.*, 1994) und der Protease des humanen Cytomegalie-Virus (Ogilvie *et al.*, 1997) durch Peptidyl-fluoromethylketone. Bei allen Beispielen handelt es sich um reversibel kovalent bindende Inhibitoren (Imperiali und Abeles, 1986).

5.2.6.1 Reversible oder irreversible Bindung der Trifluormethylketone an die Pankreaslipase

Peptidyl-fluoromethylketone als Inhibitoren für Serinproteasen zeigen eine reversible Bindung im aktiven Zentrum als Inhibitionsmechanismus.

Es galt zu zeigen, dass auch bei Serinesterasen, im speziellen bei der Pankreaslipase, eine Inhibition durch die Trifluormethylketone erreicht wird und dass der Inhibitionsmechanismus reversibel verläuft.

Ein zuverlässiger und rascher Test für reversible bzw. irreversible Hemmung ist die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung. Außerdem kann mit demselben Test ermittelt werden, ob der Inhibitor wirksam ist. Wäre der Hemmstoff unwirksam, würden bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen die Hemmkurven nahezu deckungsgleich verlaufen. Der reversible Hemmstoff bewirkt eine augenblickliche Verminderung der Enzymaktivität auf einen bestimmten Wert, der sich zeitabhängig nicht mehr ändert. Bei einer irreversiblen Hemmung nimmt dagegen die Enzymaktivität zeitlich exponentiell ab. Die Ursache dieses Effekts liegt in der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration nach einem Potenzansatz zweiter Reaktionsordnung, die es ermöglicht, die Hemmstoffmenge soweit zu reduzieren, bis der Verlauf der Reaktion zeitlich verfolgt werden kann. Dabei kann anfänglich die Hemmwirkung noch nicht erkennbar sein. Liegt der Hemmstoff in zumindest gleicher Menge vor wie das Enzym, so wird dieser schließlich sämtliche Enzymmoleküle inaktivieren (Bisswanger, 2000)S.

Als Trifluormethylketon zur Inhibition der Pankreaslipase wurde folgende Substanz eingesetzt (Abb. 5.3):

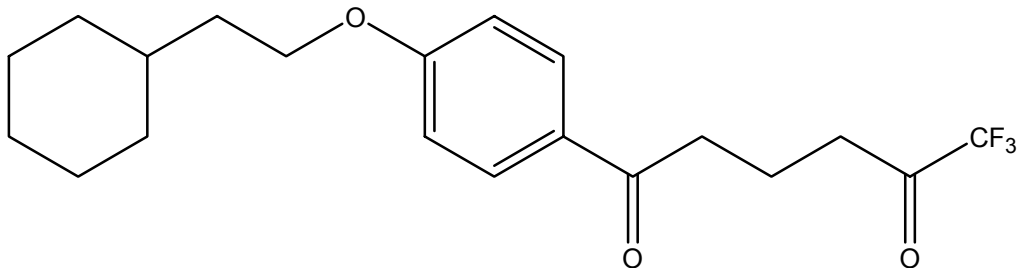


Abb. 5.3 Trifluormethylketon B 10682871, das zur Bestimmung der Inhibitionsdaten eingesetzt wurde.

Diese Verbindung wird im Folgenden mit der Bezeichnung B 10682871 geführt. Die in DMSO gelöste Substanz wurde in den Konzentrationen 80 nM, 20 nM, 8 nM und 4 nM mit jeweils 100 μ l eingesetzt. Unter diesen Versuchsbedingungen war kein Ausfallen der Substanz zu beobachten. Im Test wurden 0,8 Units porcine Pankreaslipase eingesetzt. Ansonsten wurden die Bedingungen des pNpp-Assays gewählt.

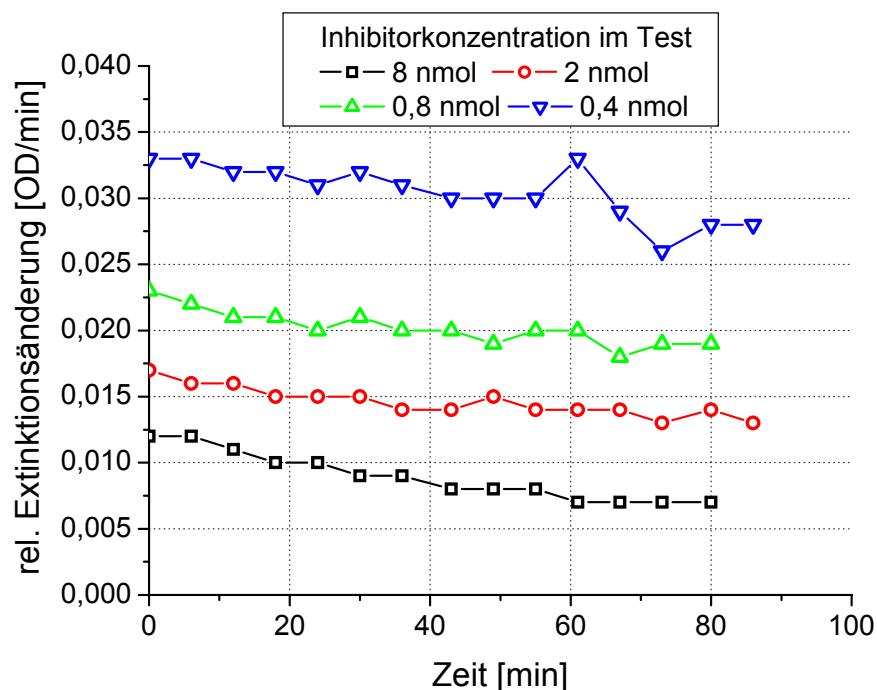


Abb. 5.4 Darstellung der reversiblen Inhibition der porcinen Pankreaslipase (pPI) durch das Trifluormethylketon B 10682871. Im Test wurden 0,8 Einheiten pPI und unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors eingesetzt.

Aus dem über die Zeit annähernd konstanten Kurvenverlauf bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration kann auf einen reversiblen Inhibitionsmechanismus geschlossen werden (Abb. 5.4), da es zu einer augenblicklichen Verminderung der Lipaseaktivität kommt, die sich über die Zeit kaum ändert. Durch diesen Versuch konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass die Lipase mit dieser Substanz inhibiert wird. Läge keine Inhibition vor, würden die Kurven für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen deckungsgleich verlaufen, da die Aktivität nicht beeinflusst würde.

Ein Blindwert wurde durchgeführt, um äußere Einflüsse wie z. B. Substratveränderungen rechnerisch aus den Ergebnissen zu eliminieren. Somit enthalten die Graphen nur den Substratumsatz, der aufgrund der Pankreaslipase hervorgerufen wurde. Würde ein irreversibler Inhibitionsmechanismus vorliegen, ließe sich dieser durch einen exponentiellen Abfall der Kurve erkennen, die bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen nach kurzer Zeit nahezu deckungsgleich verlaufen würde.

Abschließend lässt sich feststellen, dass auch die porcine Pankreaslipase als Vertreter der Serinesterasen genauso wie die Serinproteasen reversibel durch Trifluormethylketone inhibiert wird.

An dieser Stelle kann allerdings noch keine Aussage über den Inhibitionsmechanismus der Trifluormethylketone bei Serinesterasen getroffen werden. Dieses wird in dem Kapitel 5.3.3.1 mit Hilfe der STD-NMR-Spektroskopie untersucht.

5.2.6.2 Einfluss von Präinkubation und Temperatur auf die inhibitorische Wirkung der Trifluormethylketone

Als Grundlage dieses Versuches diene die Überlegung, dass die inhibitorische Wirkung der Trifluormethylketone durch die Dauer der Präinkubation, also der Kontaktzeit des Hemmstoffs mit der Lipase ohne Substratanwesenheit, in Abhängigkeit der Präinkubationstemperatur steigt. Solch ein Phänomen war im Rahmen der Experimente dieser Arbeit für den Inhibitor Orlistat zu beobachten. Dieser Vorgang wird im nächsten Kapitel 5.2.6.3 genauer beschrieben.

Der Einfluss der Präinkubation wurde auch wieder mit dem Trifluormethylketon B 10682871 (Abb. 5.3) untersucht. Ansätze mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0,1 – 4000 μM) wurden 10 bzw. 240 min mit der Pankreaslipase präinkubiert, bevor mit Hilfe des pNpp-Assays die Inhibition gemessen wurde. Die Präinkubation erfolgte bei 4 °C bzw. 37 °C. Die Substratkonzentration wurde

konstant gehalten. Für die Auswertung wurde die relative Restaktivität der Lipase (Ordinate) gegen den Logarithmus der InhibitorKonzentration (Abszisse) aufgetragen. Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Trifluormethylketon B 10682871 um einen reversiblen Hemmstoff der porcinen Pankreaslipase handelt, das heißt, dass die Hemmwirkung des Inhibitors direkt und nicht, wie bei einem irreversiblen Inhibitor, verzögert einsetzt. Daher kann vermutet werden, dass die inhibitorische Wirkung des Trifluormethylketons sich nicht verbessert, wenn die Lipase und der Hemmstoff zusammen präinkubiert werden. Ein Blindwert wurde durchgeführt, um äußere Einflüsse wie z. B. Substratveränderungen rechnerisch aus den Ergebnissen zu eliminieren. Somit enthalten die Graphen nur den Substratumsatz, der aufgrund der Pankreaslipase hervorgerufen wurde.

Die Vermutung, dass die Präinkubation keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung des Trifluormethylketons hat, wird durch die Abbildung 5.5 bestätigt. Unabhängig von der Präinkubationszeit und der Präinkubationstemperatur zeigte der Hemmstoff nahezu dasselbe inhibitorische Potential. Reversible Inhibitoren zeichnen sich u. a. dadurch aus, dass sie bei Substratüberschuss durch das Substrat teilweise von der Bindungsstelle verdrängt werden können, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen inhibierter und nicht inhibierter Enzymform einstellt. Dadurch kann erklärt werden, dass die Präinkubation scheinbar keinen Einfluss auf das inhibitorische Potential zeigt. Die inhibitorische Wirkung des Ansatzes aus Lipase und Inhibitor wurde nach der Präinkubation im pNpp-Assay gemessen. Im Assay lag ein Substratüberschuss vor. Durch den Substratüberschuss wurde das Trifluormethylketon teilweise aus dem aktiven Zentrum verdrängt, das heißt, dass eine Konkurrenzsituation von Inhibitor und Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum vorlag. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Präinkubation keinen Einfluss auf das inhibitorische Potential des Trifluormethylketons zeigt.

Als IC_{50} -Werte ergaben sich Daten zwischen 27 und 36 μ M. Diese Werte geben darüber Auskunft, bei welcher Hemmstoffkonzentration das Enzym zu 50 % inhibiert ist, also noch die Hälfte seiner Aktivität zeigt. Aus den IC_{50} -Werten kann geschlossen werden, dass es sich bei dem Trifluormethylketon B 10682871 um einen nicht so guten Inhibitor für die porcine Pankreaslipase handelt.

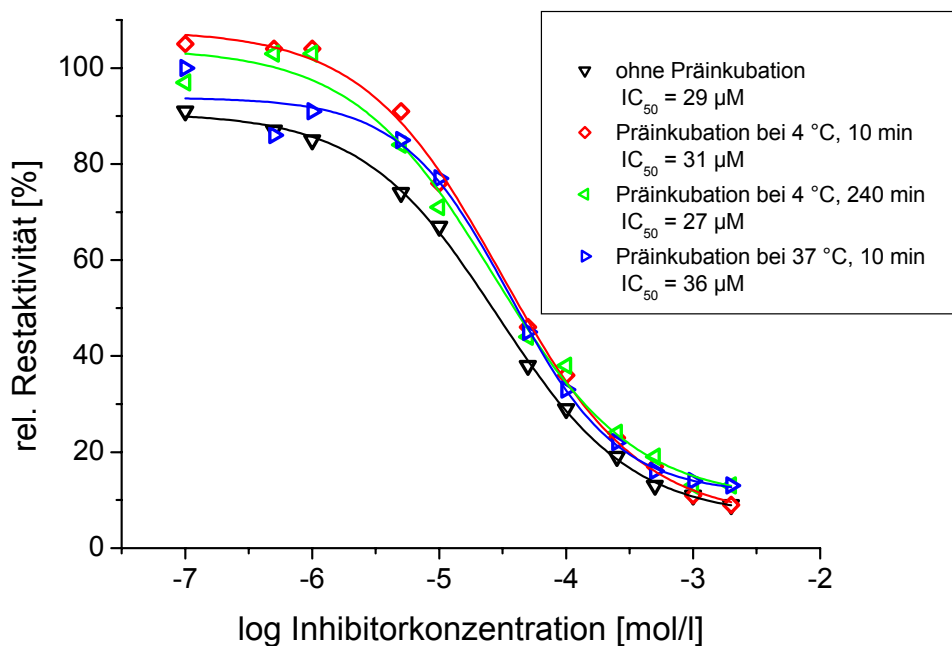


Abb. 5.5 Darstellung des Einflusses von Temperatur und Präinkubationszeit auf die Stärke der Hemmwirkung des Inhibitors B 10682871 auf die porcine Pankreaslipase. Es wird ein Vergleich von den Inhibitionsdaten ohne und mit Präinkubation zwischen Hemmstoff und Lipase gezeigt. Der IC_{50} -Wert gibt diejenige Konzentration an, bei welcher das Enzym zu 50 % inhibiert vorliegt.

Im Vergleich zu dem Inhibitor Orlistat, dessen inhibitorisches Potential im nachfolgenden Kapitel beschrieben wird, zeigt das Trifluormethylketon nur eine sehr geringe Hemmung der Lipase. Auf einen detaillierten Vergleich wird im nächsten Kapitel eingegangen.

5.2.6.3 Einfluss der Präinkubation auf die inhibitorische Wirkung von Orlistat

Tetrahydrolipstatin, auch Orlistat genannt, ist ein Analogon zu Lipstatin, das durch das Myzel des Pilzes *Streptomyces toxytricini* gebildet wird. Orlistat enthält eine β -Lactoneinheit, die für die inhibitorische Wirkung entscheidend ist (Abb. 5.6). Durch den nucleophilen Angriff des Serins 152 des katalytischen Zentrums an das Lacton entsteht ein langlebiger kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex, der eine irreversible Bindung an das Enzym darstellt (Hadvary *et al.*, 1991; Luthi-Peng *et al.*, 1992).

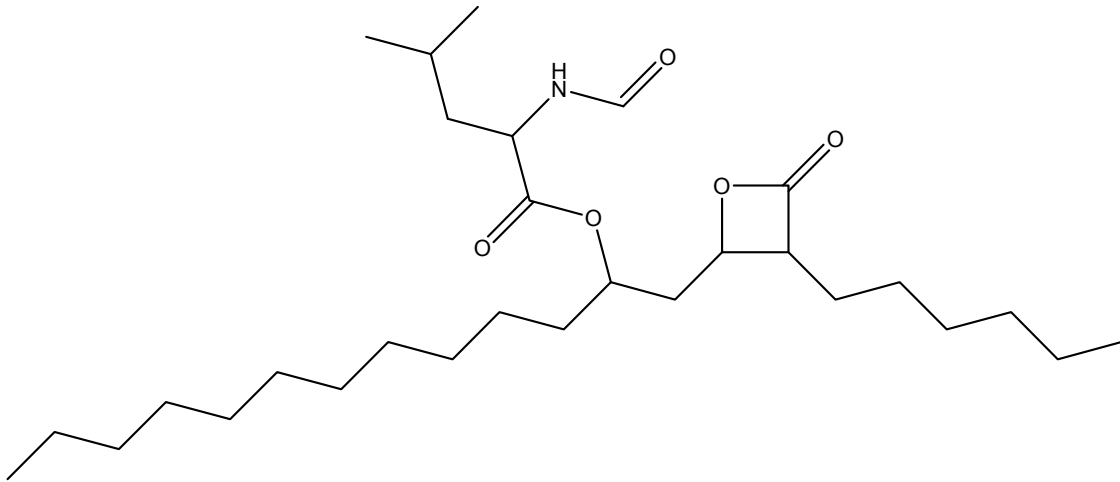


Abb. 5.6 Orlistat, ein irreversibel bindender Hemmstoff der Pankreaslipase.

Im Vergleich zu den Trifluormethylketonen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Inhibitor Orlistat eine stärkere Hemmwirkung zeigt, wenn die Pankreaslipase mit diesem Inhibitor präinkubiert wird.

Ansätze mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (0,1 – 25 μM) wurden ohne Präinkubation gemessen bzw. 10 min mit dem Hemmstoff präinkubiert, bevor mit Hilfe des pNpp-Assays die Inhibition gemessen wurde. Die Präinkubation erfolgte bei 4 °C. Die Substratkonzentration wurde konstant gehalten. Ein Blindwert wurde durchgeführt, um äußere Einflüsse wie z. B. Substratveränderungen rechnerisch aus den Ergebnissen zu eliminieren. Somit enthalten die Graphen nur den Substratumsatz, der durch die Pankreaslipase hervorgerufen wurde. Für die Auswertung wurde die relative Restaktivität der Lipase (Ordinate) gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration (Abszisse) aufgetragen.

Es galt zu klären, warum der irreversible Inhibitor Orlistat durch die Präinkubation mit der Pankreaslipase eine verbesserte Hemmwirkung zeigt.

Bei der irreversiblen Inhibierung kommt es zu einer zeitlichen Änderung der Enzymaktivität, die durch einen exponentiellen Abfall der Hemmkurve gekennzeichnet ist (Bisswanger, 2000). Der Grund dafür ist, dass der irreversibel bindende Hemmstoff zunächst einen reversiblen Assoziationskomplex EI bildet, der in einem irreversiblen Prozess in die inaktive EI_i-Form übergeht (s. Kap. 3.2.2.2). Zunächst muss sich also erst der irreversible Zustand einstellen.

Dieser Vorgang der „Komplex“-Bildung ist eine mögliche Erklärung, warum das Orlistat nach einer Präinkubation mit der Pankreaslipase eine bessere Inhibition zeigte, das heißt, warum die Restaktivität nach einer Präinkubation von 10 Minuten

bei 4 °C stärker abnimmt (Abb. 5.7). Nach 10 min Präinkubation ist eine deutliche Änderung im IC_{50} -Wert zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass bei einer noch längeren Präinkubationszeit die Änderung des IC_{50} -wertes minimaler ist, da sich das Gleichgewicht bei einer Präinkubationszeit von 10 Minuten schon zugunsten des irreversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes verschoben hat. Als Resultat wurde für Orlistat ohne Präinkubation ein IC_{50} -Wert von 14 nM und mit Präinkubation von 10 Minuten ein IC_{50} -Wert von 6 nM erhalten. Es ist also eindeutig erkennbar, dass das Orlistat zwar auch ohne Präinkubation schon eine starke inhibitorische Wirkung durch Bildung des reversiblen Assoziationskomplexes zeigte, die Hemmwirkung aber mit Bildung des irreversiblen Inhibitionskomplexes deutlich zunahm.

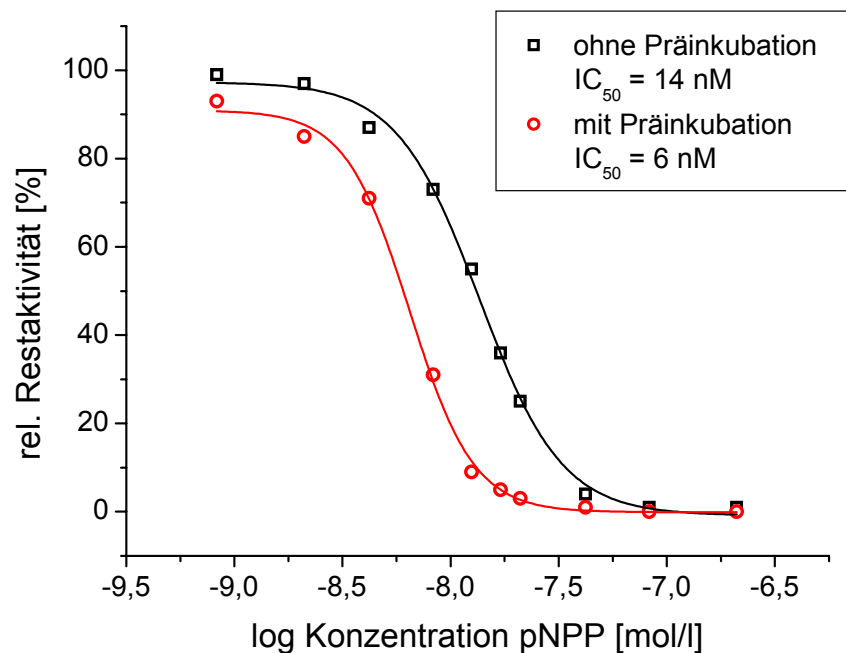


Abb. 5.7 Inhibition der Pankreaslipase durch den Hemmstoff Orlistat unter Verwendung von *p*-Nitrophenylpalmitat als Substrat. Einfluss der Präinkubation von 10 min bei 4 °C ($IC_{50} = 6$ nM) auf die Hemmwirkung gegenüber der Hemmwirkung ohne Präinkubation ($IC_{50} = 14$ nM). Bezogen auf die entsprechend gleich behandelten Kontrollexperimente können die relativen Restaktivitäten der Lipase ermittelt werden.

Werden die inhibitorischen Daten des Orlistats mit denen des Trifluormethylketons B 10682871 verglichen, ist als Resultat eindeutig festzustellen, dass das Orlistat mit einem IC_{50} -Wert von 6 nM bei 4 °C eine weitaus stärkere inhibitorische Wirkung auf die porcine Pankreaslipase ausübt als das Trifluormethylketon B 10682871 mit einem IC_{50} -Wert von 10 μ M bei einer Präinkubationszeit von 10 Minuten bei 4 °C.

Eine mögliche Erklärung für die verbesserte Inhibition ist die irreversible Hemmung der Lipase durch das Orlistat. Durch die irreversible Hemmung entsteht eine dauerhafte Blockade des aktiven Zentrums der Lipase, die durch das Trifluormethylketon nicht erreicht werden kann, da es sich um einen reversiblen Hemmstoff handelt. Das hat zur Folge, dass sich ein Gleichgewicht zwischen inhibierter und nicht inhibierter Form einstellt, wobei noch immer ein erheblicher Anteil der Lipase nicht inhibiert vorliegt. Dagegen wird durch das Orlistat das Gleichgewicht ständig zugunsten der inhibierten Form verschoben.

5.3 NMR-Ergebnisse zu Trifluormethylketonen als Inhibitoren der porcinen Pankreaslipase

Wie schon im vorherigen Kapitel 5.2 beschrieben, stellte die Unlöslichkeit der Trifluormethylketone in Wasser ein großes Problem bei der Durchführung der Experimente dar. Als ideales Lösungsmittelgemisch, in dem die Trifluormethylketone löslich und die porcine Pankreaslipase aktiv ist, stellte sich ein Gemisch aus 50 % Wasser und 50 % DMSO heraus. In diesem Verhältnis verliert die Lipase bei einer Temperatur von 4 °C innerhalb von 4 Stunden nur etwa 25 % ihrer Aktivität (siehe Tab. 5.2). Da die Inhibitoren scheinbar den Gefrierpunkt der Lösung erhöhen, waren die Messungen bei 4 °C nicht möglich. Als Messtemperatur wurde 12 °C gewählt, da bei dieser Temperatur die Lösung gerade nicht mehr gefriert.

Es wurden folgende Experimente zur Signalzuordnung der eingesetzten Trifluormethylketone angewendet: Als 1D Experimente wurden ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Experimente und das selektive INADEQUATE, als 2D Experimente wurden HSQC, HMBC und das 2D INADEQUATE eingesetzt.

Die Bindungsexperimente sind mit Hilfe eines ^1H -STD-Experiments durchgeführt worden.

5.3.1 Bestimmung der Löslichkeit der Trifluormethylketone mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Die Löslichkeit eines Stoffes beschreibt die Menge eines Stoffes, die sich in einer bestimmten Menge eines Lösungsmittels bei einer bestimmten Temperatur gerade noch lösen lässt. Darüber hinaus zugegebene feste Substanz bleibt als feste Phase zurück. Die Löslichkeit ist bei vielen Verbindungen stark temperaturabhängig und nimmt in der Regel mit steigender Temperatur zu. Je nach Beschaffenheit der Substanzen bilden diese entweder Aggregate oder Micellen, wenn die Löslichkeit überschritten ist.

Für die NMR-Messungen ist es von großer Bedeutung, dass die Löslichkeit der Trifluormethylketone für ein Lösungsmittelverhältnis von 1 : 1 für ein $\text{D}_2\text{O-d}_6\text{-DMSO}$ -Gemisch gegeben ist, da ansonsten keine Messungen mit diesen Substanzen möglich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Trifluormethylketone mittels NMR-Spektroskopie untersucht, die teilweise völlig unterschiedliche Löslichkeitsphänomene zeigten.

Ausgehend von einer $\text{d}_6\text{-DMSO}$ -Lösung des Liganden wurde eine Mischungsreihe in 5 %-Schritten mit D_2O erstellt, wobei die Konzentration des Liganden bei allen $\text{D}_2\text{O-d}_6\text{-DMSO}$ -Mischungen konstant gehalten wurde.

5.3.1.1 Micellbildung von Trifluormethylketonen

Amphiphile Substanzen bilden im Allgemeinen energiereiche instabile kolloiddisperse Lösungen (Partikelgröße 1 – 500 nm). Die Anreicherung der Moleküle aus dem Phaseninneren an Grenzflächen z. B. der Oberfläche ist daher stets mit einem Energiegewinn verbunden. Dieser führt gleichzeitig zu einer Erniedrigung der Grenzflächenspannung sowie der Oberflächenspannung.

Die Substanzen ordnen sich in der Oberfläche der wässrigen Phase in der Weise an, dass die mehr oder minder stark hydratisierten polaren Gruppen in die wässrige Phase eintauchen. Der unpolare Rest liegt bei geringer Besetzung der Oberfläche mit amphiphilen Molekülen auf der Oberfläche. Er ist mit dieser über Van der Waals Wechselwirkungen verbunden. Bei höherer Substanzkonzentration in der Oberfläche richten sich die unpolaren Gruppen auf und treten untereinander in Wechselwirkung. Eine Kugelmicelle kommt dadurch zustande, dass eine größere Anzahl von amphiphilen Molekülen zu einem kugelförmigen Gebilde assoziiert (Abb. 5.8). Die Zahl der am Aufbau der Kugelmicelle beteiligten Moleküle liegt in der Größenordnung zwischen 50 und 200. Es handelt sich also um Oligo- bzw. Polymere der amphiphilen

Substanz. Dabei ordnen sie sich so an, dass die hydratisierten polaren Kopfgruppen auf der Kugeloberfläche, die in unmittelbarem Kontakt mit der wässrigen Phase stehen, zu liegen kommen und die unpolaren Reste völlig ungeordnet im Inneren dieser Kugel sind. Die unpolaren Reste stehen dabei untereinander über Dispersionskräfte in Wechselwirkung.

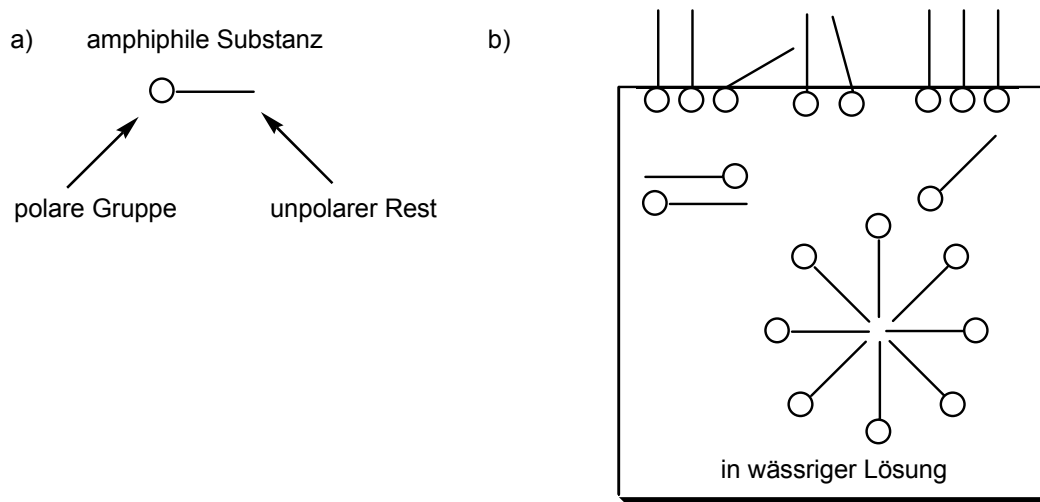


Abb. 5.8 a) Schematische Darstellung des Molekülaufbaus einer amphiphilen Substanz. b) Micellbildung von amphiphilen Substanzen, die bei einer bestimmten Konzentration in einer verdünnten wässrigen Lösung einsetzt (Abbildung nach Bauer *et al.*, 1999).

Die Micellbildung ist stark konzentrationsabhängig. Während in niedrigen Konzentrationen nur wenige Micellen vorhanden sind, nimmt die Zahl der Micellen mit zunehmender Konzentration überproportional zu. Dieses bedeutet, dass innerhalb eines relativ kleinen Konzentrationsbereiches die Micellbildung plötzlich nachweisbar wird. Die Konzentration, oberhalb der deutlich eine Micellbildung nachgewiesen werden kann, wird als kritische Micellbildungskonzentration (CMC) bezeichnet.

Aufgrund der Gleichgewichtseinstellung mit der Belegung der Oberfläche und der Tatsache, dass die Anreicherung der amphiphilen Substanzen in der Oberfläche thermodynamisch günstiger ist als die Micellbildung, hat im Bereich der CMC die Oberflächenbelegung bereits einen relativ hohen Sättigungsgrad erreicht. Die Oberflächenspannung fällt in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration zunächst relativ steil ab, um schließlich in den Verlauf einer langsamen Abnahme

überzugehen. In dem Übergangsbereich, oberhalb dessen nur noch eine geringfügige Abnahme der Oberflächenspannung zu beobachten ist, wird die CMC angenommen.

Üblicherweise wird die kritische Micellbildungskonzentration über die Änderung der Oberflächenspannung z. B. mit Hilfe eines Tensiometers gemessen. Es ist aber auch möglich, die CMC mit Hilfe der NMR-Spektroskopie über die Signalaufspaltung des ^1H -NMR-Spektrums zu ermitteln. Diese Art zur Bestimmung der Micellbildungskonzentration wurde für das folgende Trifluormethylketon mit der Bezeichnung B 10683207 verwendet (Abb. 5.9). Die Substanz zeigt aufgrund ihres großen unpolaren und ihres hydrophilen Teils strukturelle Ähnlichkeit zu einem Tensid.

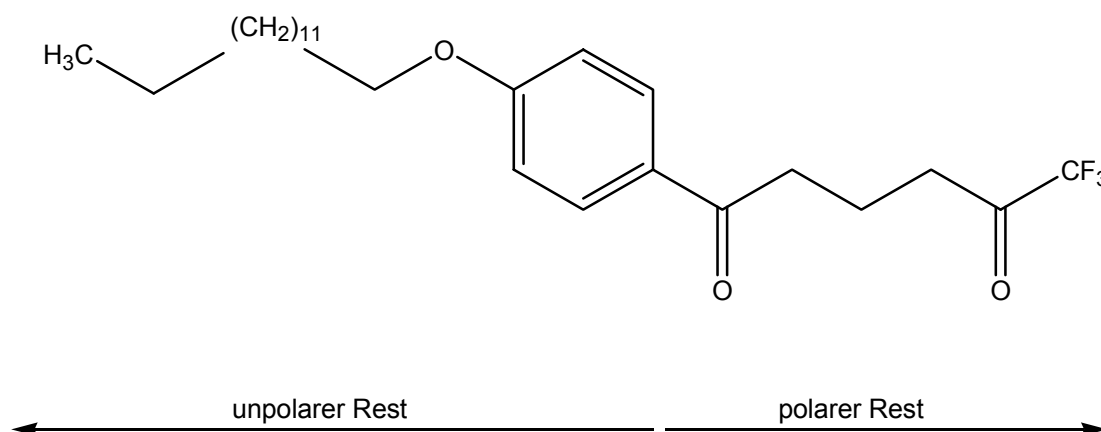


Abb. 5.9 Darstellung des Trifluormethylketons B 10683207 mit der Einteilung in den polaren und unpolaren Molekülanteil.

In einem D_2O - d_6 -DMSO-Lösungsmittelgemisch liegt die Vermutung nahe, dass sich die Micellen, wie oben beschrieben, so anordnen, dass der polare Rest zum polaren Lösungsmittel und der unpolare Molekülteil in das Micellinnere zeigen. Zu jeder Verdünnungsstufe erfolgte die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums bei einer Temperatur von $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Abb. 5.10). Als Auswertungskriterium wurde die Signalaufspaltung im Aromatenbereich ($7 - 8\text{ ppm}$) genutzt. Die Aromatensignale sollten verschwinden, wenn die CMC erreicht ist. Denn der Aromat und der Cyclohexyrling bilden den unpolaren Molekülteil aus, der bei der Micellbildung in das Micellinnere zeigt und damit kein Signal mehr im ^1H -NMR-Spektrum ergibt.

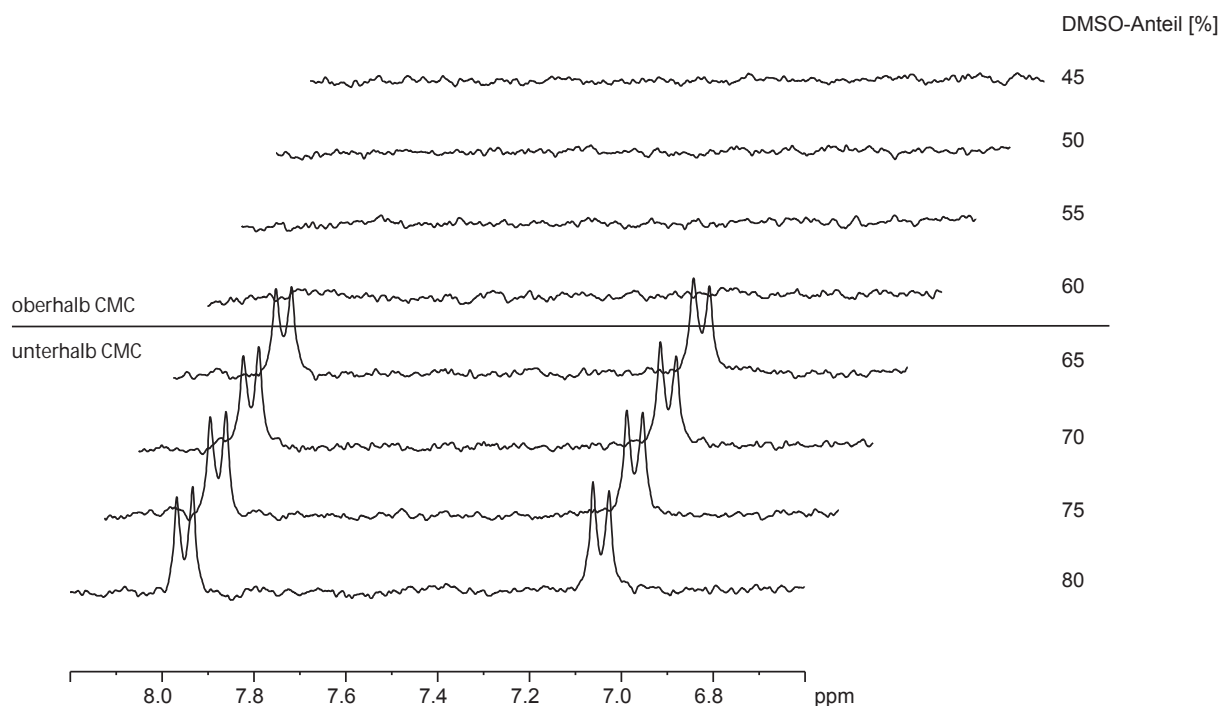


Abb. 5.10 Darstellung der Micellbildungskonzentration (CMC) für die Substanz B 10683207. Die Spektren wurden bei 37 °C mit 128 Scans an einem 250 MHz Spektrometer aufgenommen. Der d₆-DMSO-Anteil lag zwischen 45 % und 80 %. Dargestellt ist jeweils der Bereich der chemischen Verschiebungen, in dem die Signale der Wasserstoffe des Aromaten erscheinen.

Die Micellbildungskonzentration liegt zwischen 60 und 65 % d₆-DMSO-Anteil, da die Aromatensignale bei 7 – 8 ppm bei diesem Anteil schlagartig verschwanden. Um die genaue CMC besser bestimmen zu können, erfolgte eine Spektrenaufnahme mit 1%igen Verdünnungsschritten im Bereich der kritischen Micellbildungskonzentration (Abb. 5.11).

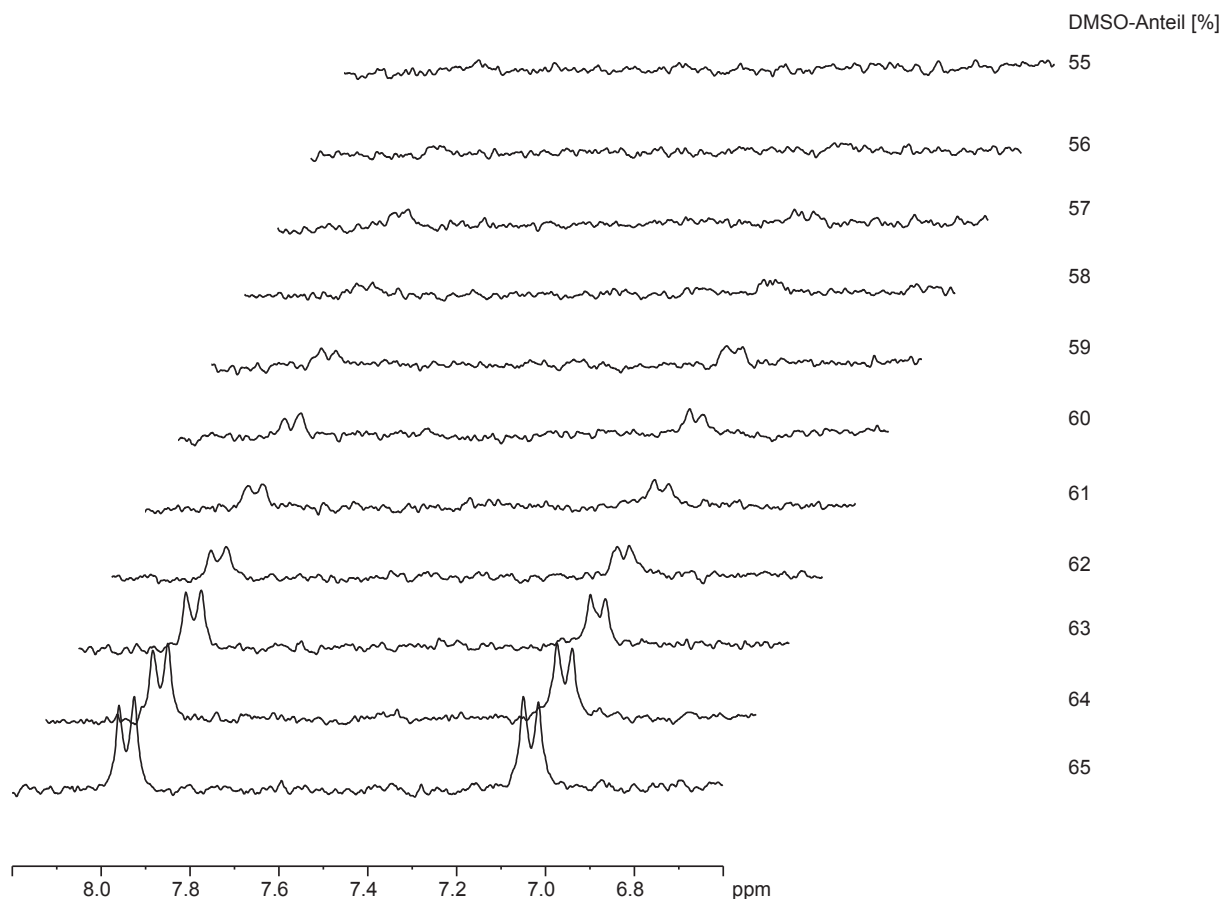


Abb. 5.11 Darstellung der genauen Micellbildungskonzentration. Zu erkennen ist, dass die Aromatensignale des Trifluormethylketons B 10683207 bei 1 %iger Änderung des D_2O - d_6 -DMSO-Verhältnisses immer weiter abnehmen, je geringer der d_6 -DMSO-Anteil wird. Unterhalb eines d_6 -DMSO-Anteils von 58 % sind die Aromatensignale nicht mehr vom Rauschen zu unterscheiden. Die Spektren wurden mit 128 Scans bei 37 °C an einem 250 MHz Spektrometer aufgenommen.

Wie aus den Spektren hervorgeht, werden die Aromatensignale zwischen 7 und 8 ppm mit zunehmendem D_2O -Anteil immer kleiner, bis sie schließlich gar nicht mehr zu sehen sind. Dieser Fall tritt dann ein, wenn das Trifluormethylketon nur noch in Micellen gebunden vorliegt. Dass es sich dabei um Micellbildung handelt, lässt sich an zwei Merkmalen erkennen. Ein Merkmal ist, dass die Aromatensignale bei den 5%igen Verdünnungen plötzlich verschwinden, da der Verdünnungsschritt sehr groß ist.

Ein weiteres Indiz für eine Micellbildung ist, dass die Substanz nach der Micellbildung nicht ausfällt, sondern dass sie als Kolloid in Lösung bleibt und den so genannten Tyndall-Effekt zeigt. Der Tyndall-Effekt ist eine typische Erscheinung für kolloidale Lösungen. Er wird als Opaleszenz sichtbar, die von der Teilchengröße und der

Konzentration abhängt. Die Opaleszenz zeigt sich bei rechtwinkliger Betrachtung zur Beleuchtung und ist durch eine Trübung der Lösung erkennbar.

Um den genauen Wert für die kritische Micellbildungskonzentration bestimmen zu können, wurden die Daten in ein Diagramm eingetragen, in dem die Abszisse die d_6 -DMSO-Konzentration und die Ordinate das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis darstellt (Abb. 5.12). Das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis wurde durch das Computerprogramm „xwinmr“ berechnet und stellt das Verhältnis der Aromatensignale im Verhältnis zum Rauschen dar. Diese Art der Auswertung konnte gewählt werden, da das Trifluormethylketon B 10683207 bei jedem Lösungsmittelverhältnis in derselben Konzentration vorliegt. Der Wendepunkt der sigmoiden Kurve stellt die CMC dar.

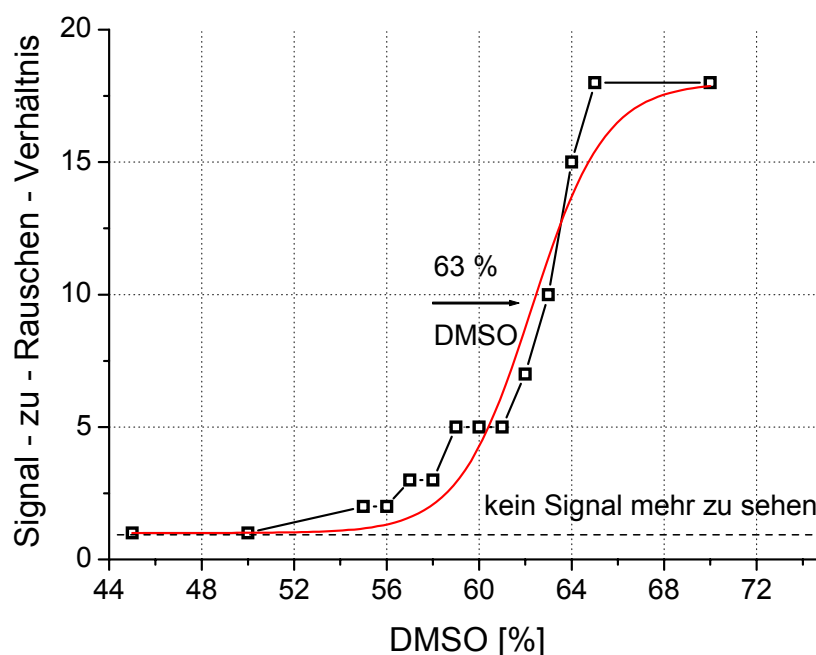


Abb. 5.12 Graphische Darstellung zur Bestimmung der kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) bei einem D_2O - d_6 -DMSO-Verhältnis von 37 : 63. Die CMC liegt im Wendepunkt der sigmoiden Kurve. Zur Auswertung wurde der Bereich zwischen 7 und 8 ppm gewählt, da in diesem nur die Aromatensignale vorkommen.

Anhand dieser Auswertung wurde für das Trifluormethylketon B 10683207 eine kritische Micellbildungskonzentration für ein Lösungsmittelverhältnis von 37 % D₂O und 63 % d₆-DMSO bestimmt.

Da für die Aktivität der porcinen Pankreaslipase nur maximal 50 % d₆-DMSO eingesetzt werden durften, konnte dieses Trifluormethylketon nicht für weitere NMR-Messungen, insbesondere nicht für die Bindungsmessungen mittels STD-NMR, eingesetzt werden.

5.3.1.2 Trifluormethylketone, die zur Aggregatbildung neigen bzw. nahezu löslich in einem D₂O-d₆-DMSO-Gemisch sind

Als Aggregat bzw. Aggregation werden lockere, energiearme Zusammenlagerungen und Anhäufungen von Atomen oder Molekülen bezeichnet. Sie können entstehen, wenn die Löslichkeit eines Stoffes in einem Lösungsmittel für eine bestimmte Temperatur überschritten wird.

Für die Ermittlung der Aggregatbildungskonzentrationen wurden zwei verschiedene Trifluormethylketone eingesetzt, wobei das eine Keton mit der Bezeichnung B 10682871 schon für die Ermittlung der kinetischen Daten verwendet wurde (Abb. 5.13).

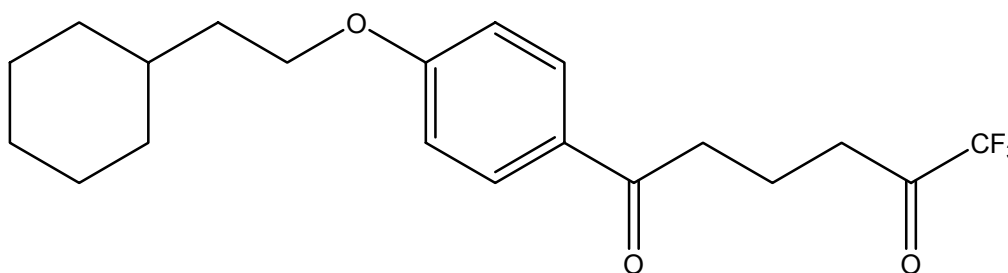


Abb. 5.13 Molekülstruktur zum Trifluormethylketon B 10682871.

Um die Löslichkeit der Substanz B 10682871 zu ermitteln, wurden Verdünnungsreihen mit D₂O und d₆-DMSO in 5 %-Schritten mit 1 mM Inhibitor erstellt und mittels ¹H-NMR gemessen. Es wurden die Messtemperaturen 12 °C und 37 °C gewählt. Als Löslichkeitsindikator dienten die Aromatensignale zwischen 6,9 ppm und 8,1 ppm, denn für den ungelösten Anteil an Substanz in Lösung zeigen sich Zusatzsignale, die aufgrund von Oligomer- bzw. Polymerbildung der Substanz entstehen.

Auffällig im Aromatenbereich ist, dass bei einem d_6 -DMSO-Anteil unterhalb von 45 % jeweils hochfeldverschoben neben den Aromatenpeaks ein weiterer „Signalberg“ ohne Feinaufspaltung erscheint (Abb. 5.14). Je geringer der d_6 -DMSO-Anteil der Verdünnungsreihe wird, desto kleiner werden die eigentlichen Aromatensignale und desto größer werden die zusätzlichen Signale.

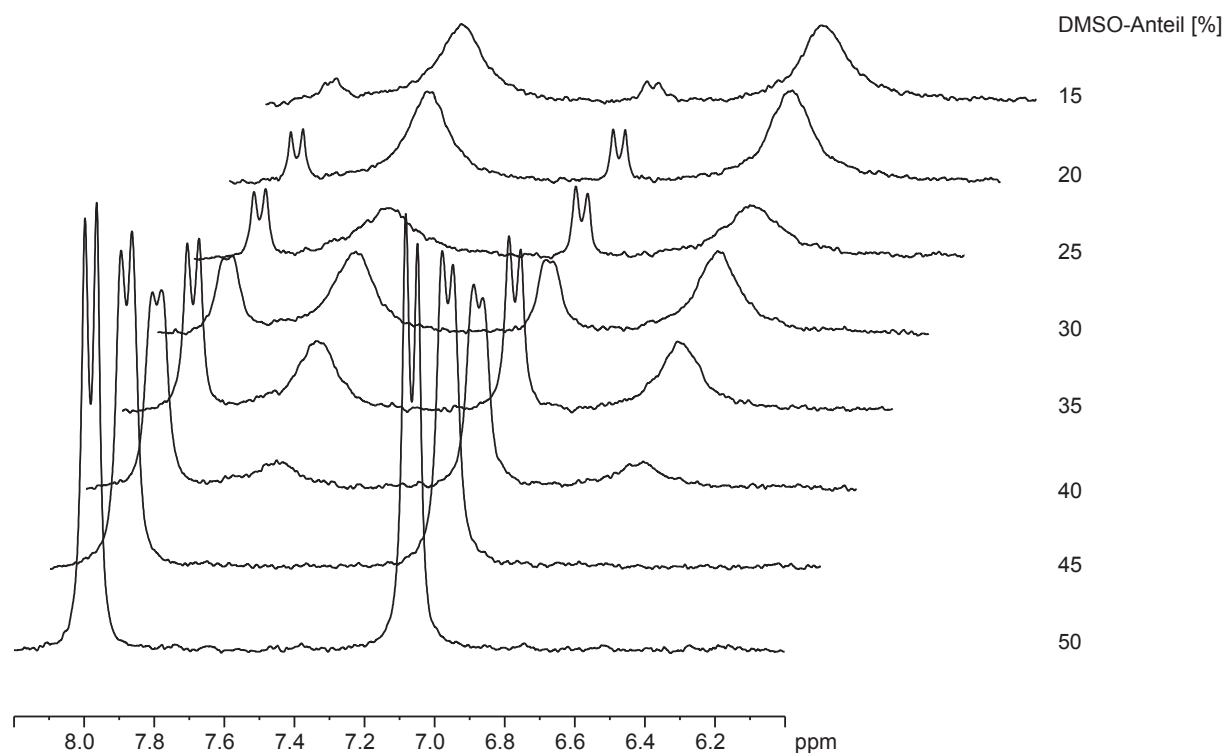


Abb. 5.14 Darstellung der Aromatensignale der Substanz B 10682871 für verschiedene D_2O - d_6 -DMSO-Verhältnisse bei einer Messtemperatur von 37 °C . Die Messungen erfolgten direkt nach der Herstellung der Lösungen bei 37 °C mit 128 scans an einem 250 MHz Spektrometer.

Diese zusätzlichen Peaks lassen vermuten, dass neben der gelösten Substanz auch noch Di-, Tri- oder auch Oligomere in Lösung vorliegen, die keine „saubere“ Signalaufspaltung mehr zulassen. Sie nehmen mit steigender D_2O -Konzentration zu. Es haben sich also Aggregate gebildet. Visuell war eine Trübung der Lösungen zu erkennen, die mit steigendem D_2O -Anteil und damit mit steigender Unlöslichkeit des Trifluormethylketons zunahm.

Wurden die Verdünnungen mindestens 8 Stunden stehen gelassen, sedimentierten die Aggregate, und die Lösung erschien wieder klar. Mit diesem Vorgang der Sedimentation verschwanden in den nach 8 Stunden erneut aufgenommenen NMR-Spektren die zusätzlichen hochfeldverschobenen Signale (Abb. 5.15).

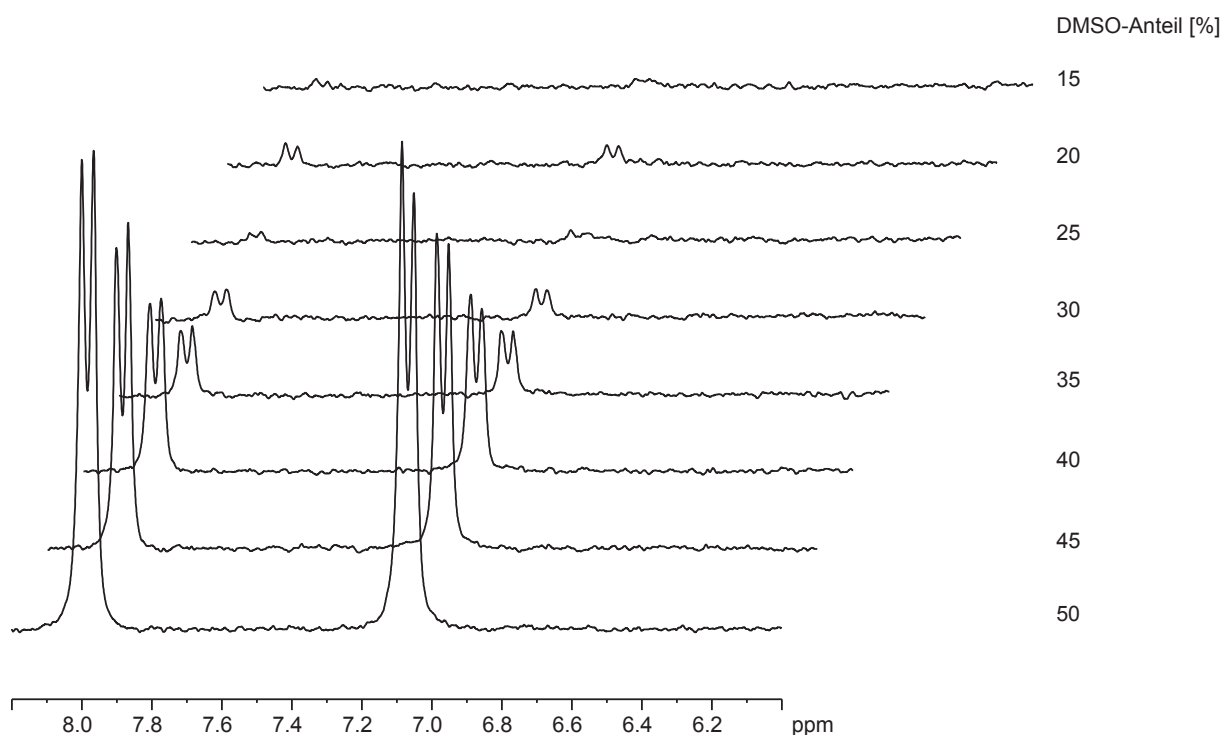


Abb. 5.15 Darstellung der Aromatensignale der Verbindung B 10682871, nachdem die Lösungen 8 Stunden gestanden haben. Die Spektren wurden mit 128 Scans bei 37 °C an einem 250 MHz Spektrometer aufgenommen. Je nach d₆-DMSO-D₂O-Verhältnis ist eine Verkleinerung der Signale zu erkennen.

Aus den Abbildungen 5.14 und 5.15 ist zu erkennen, dass die Aggregatbildung bei einem d₆-DMSO-Anteil von 40 % einsetzte, da sich bei dieser Konzentration Zusatzsignale bilden und die Intensität der Aromatensignale abnimmt. Werden die Signalintensitäten direkt nach dem Mischen mit denen nach 8 Stunden verglichen, ist eine Aussage über die Löslichkeit der Substanz zum jeweiligen Mischungsverhältnis möglich. Bleiben die Signalintensitäten identisch, ist das Trifluormethylketon löslich, das heißt, es ist nach 8 Stunden noch 1 mM Substanz gelöst. Werden die Signalflächen des Aromaten in der sedimentierten Probe nach 8 Stunden mit den Aromatensignalen einer Probe, in der die Substanz vollständig löslich ist, verglichen und miteinander ins Verhältnis gesetzt, kann die Aussage getroffen werden, wie viel

Substanz gelöst vorliegt. Bei einem D_2O - d_6 -DMSO-Verhältnis von 1 : 1 traten beim Trifluormethylketon B 10682871 keine zusätzlichen Aromatensignale auf, und nach 8 Stunden Standzeit verloren die Aromatensignale nicht an Größe. Dadurch wurde nachgewiesen, dass bei diesem Lösungsmittelverhältnis die gesamte Substanz in Lösung bleibt.

Auch für eine Temperatur von 12 °C, bei der die STD-Experimente durchgeführt wurden, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Nach 8 Stunden Standzeit und einem d_6 -DMSO-Anteil von 50 % lag die Substanz gelöst vor (Daten nicht gezeigt). Es waren nach 8 Stunden noch 100 % Substanz in Lösung. Dieses Ergebnis ist wichtig für die 1H -STD-NMR-Experimente.

Das Trifluormethylketon B 10646964 wurde als Referenzsubstanz für die Signalzuordnung, aber auch für STD-Messungen verwendet (Abb. 5.16). Daher musste auch für diese Substanz die Löslichkeit nach dem gleichen Schema wie für das Trifluormethylketon B 10682871 ermittelt werden. In diesem Fall wurden die Messungen allerdings nur bei 12 °C durchgeführt.

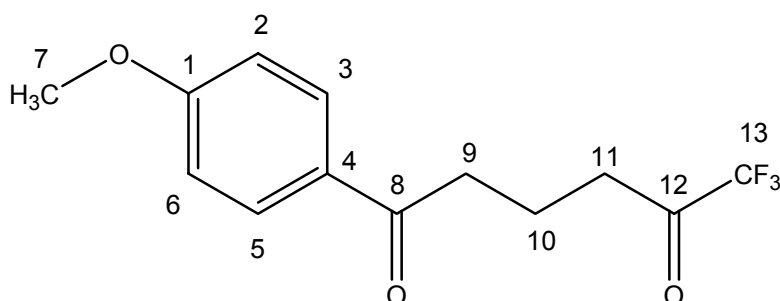


Abb. 5.16 Molekülstruktur zum Trifluormethylketon mit der Bezeichnung B 10646964.

Wie aus der Molekülstruktur zu erkennen ist, hat diese Verbindung im Vergleich zum Trifluormethylketon B 10682871 einen wesentlich kleineren lipophilen Molekülanteil, wodurch eine wesentlich bessere Löslichkeit in einem hohen D_2O -Anteil zu vermuten ist. Eine 1 mM Probe zeigte bis zu einem D_2O -Anteil von 85 % noch vollständige Löslichkeit. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde auf weitere Verdünnungen verzichtet (Daten nicht gezeigt), da für die STD-Messungen nur die Löslichkeit der Substanz bei 50 % D_2O -Anteil gefordert war.

Für die Verbindungen B 10682871 und B 10646964 scheint keine Micellbildung wie für die Substanz B 10683207 vorzuliegen. Dafür sprechen verschiedene Gründe. Zum einen zeigten die Substanzen keinen Tyndall-Effekt, wenn sie ausfallen. Die Lösung wurde nach dem Absinken der Aggregate wieder klar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Substanzen nicht als Kolloide in Lösung vorlagen. Zum anderen liegt bei dem Trifluormethylketon B 10646964 strukturell keine Verwandtschaft zu einem Tensid vor. Auch der Cyclohexyl-Rest der Verbindung B 10682871 scheint nicht ausreichend unpolar zu sein, um Tensideigenschaften hervorzurufen. Diese Vermutung belegen auch die NMR-Spektren für beide Substanzen.

5.3.2 Signalzuordnung für die Trifluormethylketone

Besonders für die Bindungsexperimente mittels STD-NMR ist eine exakte Signalzuordnung für die Grundstruktur und für die verschiedenen Substituenten der Trifluormethylketone essentiell. Für die Signalzuordnung wurden folgende Experimente eingesetzt: Als 1D Experimente kamen das ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR und das selektive INADEQUATE zum Einsatz, als 2D Experimente sind HSQC, HMBC und das 2D INADEQUATE zu nennen.

Zur Bestimmung der Signalzuordnung für die Grundstruktur der Trifluormethylketone wurde die Substanz B 10646964 genutzt, da es sich bei dieser um eine Verbindung handelt, die neben der Grundstruktur nur eine Methoxy-Gruppe als Substituenten enthält (Abb. 5.16).

Die Spektren zur Strukturaufklärung wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit d_6 -DMSO bei einer Temperatur von 37 °C aufgenommen.

5.3.2.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

Die fehlerfreie Signalzuordnung für die chemischen Verschiebungen der Wasserstoffatome im ^1H -NMR-Spektrum war besonders wichtig, da es als Referenzspektrum für die STD-NMR-Spektren eingesetzt wird. Problematisch war die Signalüberlagerung im Bereich der chemischen Verschiebungen zwischen 1,4 und 2,2 ppm (Abb. 5.17). Die Signale in diesem Bereich sind den CH_2 -Gruppen zwischen den beiden Carbonylgruppen zuzuordnen.

Durch die Überlagerung der Signale war eine eindeutige Zuordnung aus diesem Spektrum nicht möglich. Zur Trennung der Signale gab es verschiedene

Möglichkeiten. Zu diesen Möglichkeiten zählen die Änderung der Messtemperatur, die Änderung des Lösungsmittelverhältnisses und der Einsatz von Verschiebungsreagenzien, so genannten *chemical shift reagents*.

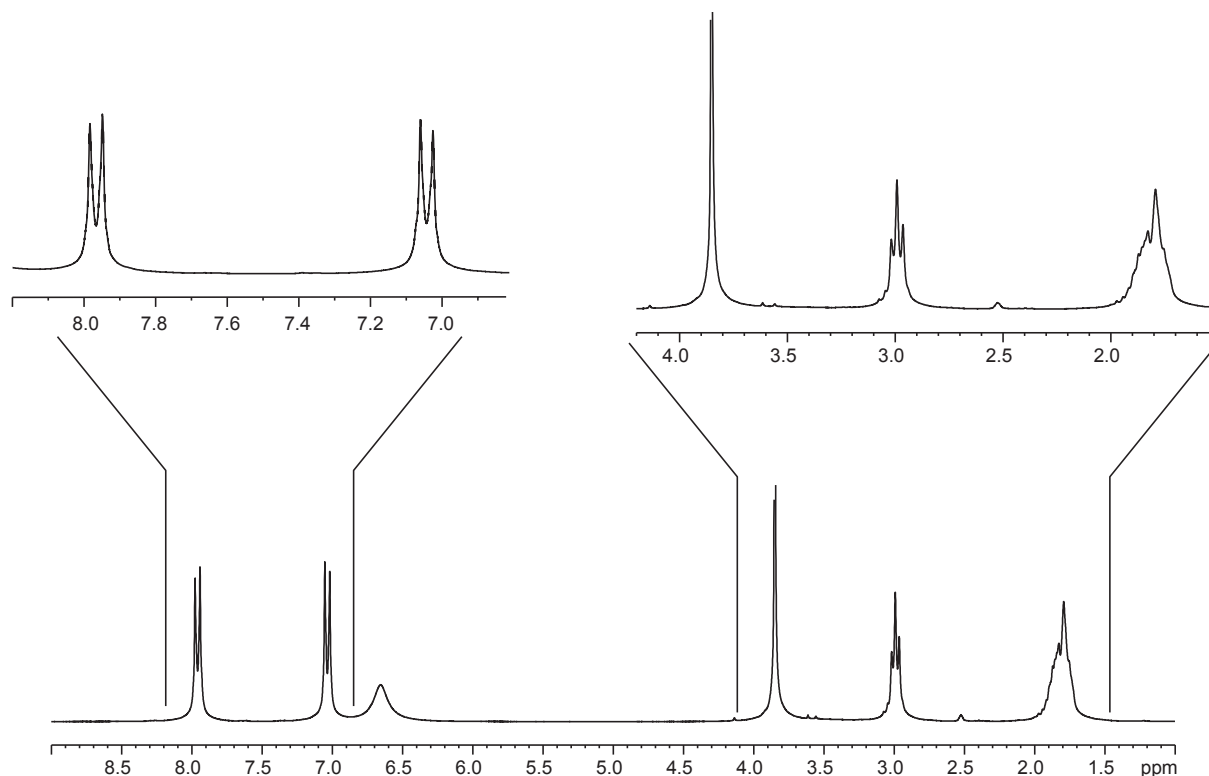


Abb. 5.17 ^1H -NMR-Spektrum der Substanz B 10646964 einer 1 M Probe bei 37 °C mit 16 Scans an einem 250 MHz Spektrometer.

Temperaturänderung zur Behebung der Signalüberlagerung

Bei Veränderung der Messtemperatur wandern unter Umständen einzelne Signale relativ zu anderen. Ein Grund dafür kann eine unterschiedliche Abschirmung der Protonen bei geänderter Temperatur sein. Als weiterer Grund für die Signalverschiebung kommt eine Rotation um eine bestimmte Bindung in Frage, die von der Temperatur und von den jeweiligen Substituenten an der „rotierenden“ Bindung abhängt.

Im Fall der Trifluormethylketone, speziell für die Substanz B 10646964, führte die schrittweise Temperaturerhöhung von 12 auf 57 °C nicht zu einer Signalverschiebung. Da die Grundstruktur bei allen Verbindungen identisch ist, konnte eine

Signalverschiebung auch für die anderen Verbindungen dieser Substanzklasse nicht erwartet werden.

Änderung des Lösungsmittelverhältnisses

Die Veränderung des D₂O-d₆-DMSO-Verhältnisses kann zu einer Veränderung der chemischen Verschiebungen führen, da Lösungsmittel und gelöste Moleküle häufig miteinander in Wechselwirkung treten.

Aber auch diese Überlegung führte nicht zu Signalverschiebungen im Bereich von 1,4 - 2,2 ppm. Neben einer reinen d₆-DMSO-Probe kamen D₂O-d₆-DMSO-Mischungen von 10 – 60 % D₂O-Anteil zum Einsatz.

Einsatz von Verschiebungsreagenzien

Der Verschiebungseffekt durch paramagnetische Ionen der Lanthanoide ohne Linienverbreiterung wurde 1969 von Hinckley (Hinckley, 1969) entdeckt. Daraus entwickelte sich eine vielversprechende NMR-Methode.

Dieser Effekt ist damit an die Gegenwart paramagnetischer Ionen gebunden und lässt vermuten, dass es sich um eine Wechselwirkung zwischen dem Spin des ungepaarten Elektrons der paramagnetischen Substanz und den Kernspins handelt. Diese Wechselwirkungen führen zu Signalverschiebungen. Es handelt sich um Wechselwirkungen 3-dimensionaler Art. Wichtig dabei ist, dass der Verschiebungseffekt durch den Abstand des paramagnetischen Zentrums und dem zu beobachteten Kern, in dieser Arbeit dem ¹H-Kern, mit der dritten Potenz des Abstandes abnimmt.

Die gemessenen Verschiebungen sind Funktionen der chemischen Verschiebungen von freier und im Komplex gebundener Substanz, denn es liegen immer freie und komplex gebundene Substanz gemeinsam vor. Außer von den Konzentrationsverhältnissen zwischen Substanz und Verschiebungsreagenz hängt der Betrag der chemischen Verschiebung auch von der Komplexbildungsstärke der Substrate ab.

Durch die Komplexbildung der Substanzen mit den paramagnetischen Ionen kommt es zur Änderung der Relaxationszeiten, insbesondere der longitudinalen Relaxationszeit T_1 und zur Änderung des Kern-Overhauser-Effektes (NOE). Durch die Komplexbildung wird die Substanz „vergrößert“, das heißt, die longitudinale Relaxationszeit verkürzt sich. Zu der longitudinalen Relaxation trägt maßgeblich die paramagnetische Relaxation bei. Diese spielt hier eine entscheidende Rolle, da das

Trifluormethylketon mit dem Metall-Ion Wechselwirkungen eingeht. Außerdem führt die Komplexbildung zu Abschirmungsveränderungen. Beide Tatsachen führen zur Verschiebung und Trennung der überlagerten Signale.

Silber-, europium- und ytterbiumhaltige Verbindungen wurden in Konzentrationsverhältnissen zwischen Trifluormethylketon und Verschiebungsreagenz von 2 : 1 eingesetzt. Die Anwendung der Verschiebungsreagenzien hat im Fall der Trifluormethylketone nicht zu einer Trennung der überlagerten Methylensignale geführt. Gründe dafür können das Verwenden eines falschen Verschiebungsreagenzes, ungünstige Konzentrationsverhältnis des Reagenzes oder der Mangel an Wechselwirkungen sein.

5.3.2.2 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Für die Signalzuordnung waren neben den Protonenverschiebungen auch die Kohlenstoffverschiebungen von Bedeutung. Durch die Protonenentkopplung wird das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis verbessert. Signale, die ein Aufspaltungsmuster (Duplett, Triplet, Quartett, Multiplett) zeigen, bilden Singulets mit einer stärkeren Signalintensität. Außerdem erfolgt eine Verstärkung der Kohlenstoff-Signale durch den Kern-Overhauser-Effekt um weitere 200 %.

Für das Trifluormethylketon B 10646964 sind 11 Signale gemessen worden (Abb. 5.18). Es wurde eine 3 M Probe eingesetzt, in der die Substanz in reinem d_6 -DMSO gelöst wurde, da so eine wesentlich größere Menge der Substanz in Lösung geht. Außerdem sind chemische Kohlenstoffverschiebungen kaum temperaturabhängig, so dass die Messungen bei 37 °C durchgeführt wurden. Eindeutig zu erkennen ist bei einer Verschiebung von 93,3 ppm ein Quartett als Signalaufspaltung. Durch das Quartett wird die chemische Verschiebung für die α -ständige Carbonylgruppe zu dem Trifluormethylrest nachgewiesen. Es handelt sich dabei um eine Fluor-Kopplung. Diese ist in einem ^{13}C -NMR-Spektrum mit Protonenentkopplung nachweisbar, da nur die Protonenkopplungen unterdrückt werden. Weiterhin konnte die dazugehörige geminale Kopplungskonstante $^2J_{\text{F,C}}$ mit einem Wert von 30 Hz ermittelt werden. Die chemische Verschiebung spricht dafür, dass die Carbonylgruppe hydratisiert vorliegt. Denn normalerweise erscheinen Kohlenstoffatome von Carbonylgruppen bei einer chemischen Verschiebung von ungefähr 200 ppm. Scheinbar ist die Wassermenge in dem d_6 -DMSO für die Hydratbildung ausreichend (Liang und Abeles, 1987). Auch die Zuordnung für den

Kohlenstoff der Trifluormethylgruppe bei einer chemischen Verschiebung von 124,9 ppm ist durch dieses Spektrum nachgewiesen. Das Signalmuster ergibt ein Quartett durch den direkt gebundenen Fluor. Als direkte Kopplungskonstante $^1J_{F,C}$ wurde einen Wert von 288 Hz erhalten. Zur Bestätigung der Kopplungskonstante wurde noch ein ^{19}F -Spektrum aufgenommen (Kap. 5.3.2.3).

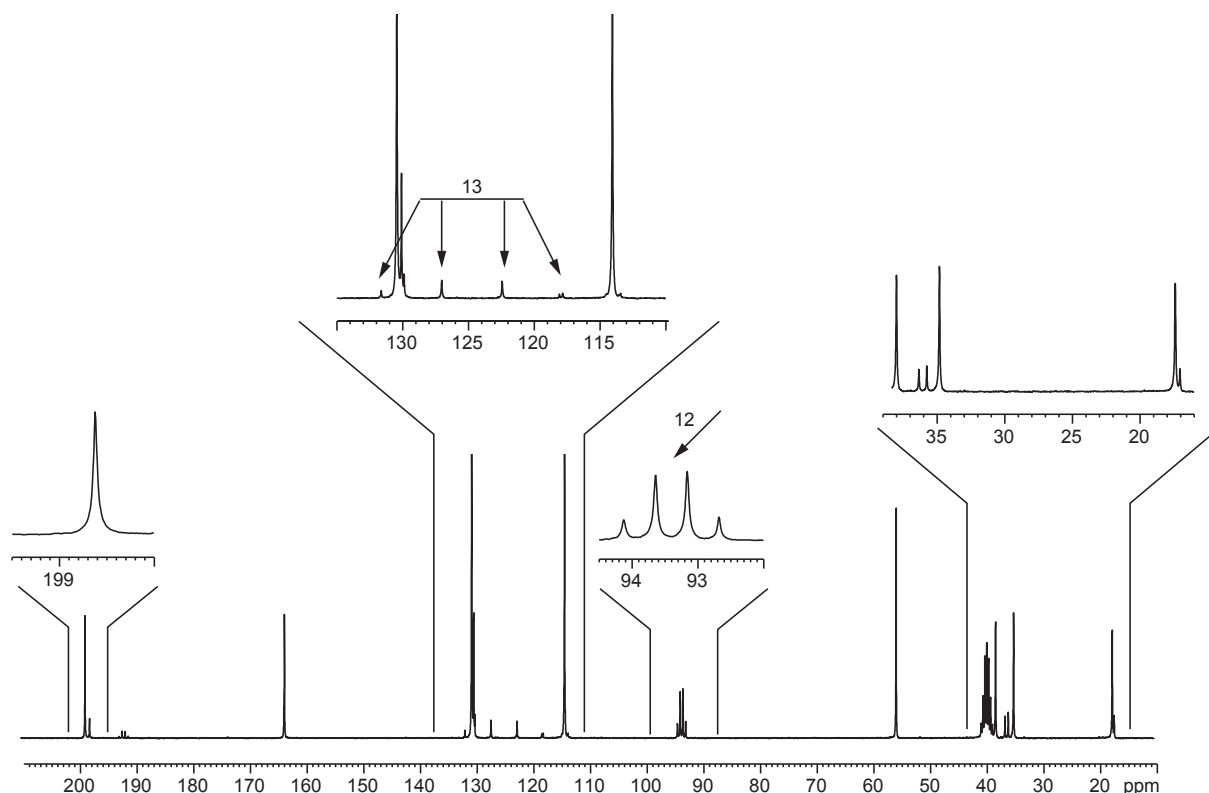


Abb. 5.18 ^{13}C -NMR-Spektrum mit 1H -Breitbandentkopplung mit 2048 Scans von dem Trifluormethylketon B 10646964 bei 37 °C an einem 250 MHz Spektrometer.

Wird dieses Spektrum mit einem ^{13}C -Spektrum ohne Protonenentkopplung verglichen, ist eine genauere Zuordnung der Signale möglich (Daten nicht gezeigt). Ohne Protonenentkopplung sind Signalaufspaltungen in Form von Dupletts, Tripletts, Quartetts oder Multipletts zu sehen, abhängig davon, wie viele Protonen direkt mit dem jeweiligen Kohlenstoff koppeln. Nur für quartär gebundene ^{13}C -Kerne und für die Carbonylgruppen bleiben Singulets bestehen. Kopplungsmuster, die durch Kopplungen von Kohlenstoffatomen mit Fluoratomen entstehen, zeigen keine veränderten Aufspaltungsmuster.

Als Resultat aus dem Spektrenvergleich lässt sich festhalten, dass es sich bei den chemischen Verschiebungen von 198,7 ppm, 163,5 ppm, 130,2 ppm, 124,9 ppm und 93,3 ppm um quartäre Kohlenstoffe, Carbonylgruppen oder ein Kohlenstoffatom mit einem anderen Kopplungspartner als Wasserstoff handelt, da sich das Signalaufspaltungsmuster bei ausgeschaltetem Protonenkoppler nicht ändert. Als sicher gilt die Zuordnung der Carbonylgruppe bei 93,3 ppm (Pos. 12). Genauso konnte die Kohlenstoff-Verschiebung bei 124,9 ppm als die Trifluormethylgruppe identifiziert werden. Die Kerne beider Positionen stellen die direkte bzw. die geminale Fluor-Kohlenstoff-Kopplung dar (Abb. 5.19).

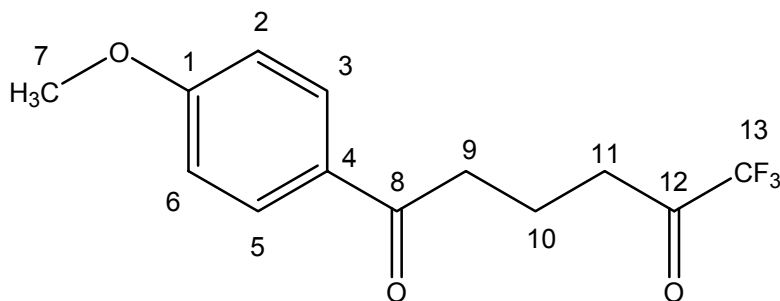


Abb. 5.19 Positionsverteilung zum Trifluormethylketon B 10646964.

Diese Zuordnungen haben sich im HSQC-Experiment (Kap. 5.3.2.4) bestätigt. Um die anderen chemischen Verschiebungen der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome richtig zuordnen zu können, wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt. Eine Zusammenfassung aller chemischen Verschiebungen befindet sich in dem Kapitel 5.3.2.6.

5.3.2.3 ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Durch die Aufnahme eines ^{19}F -Spektrums können sowohl die chemische Verschiebung als auch die Kopplungskonstanten ermittelt werden. Für die Trifluormethylgruppe zeigt das Spektrum ein Hauptsignal für das Fluor bei einer chemischen Verschiebung von -83,9 ppm. Rechts und links neben dem Fluorsignal sind zwei Signale mit einer Intensität von 0,5 % des Hauptsignals zu erkennen. Diese entsprechen dem direkt koppelnden ^{13}C -Kern. Als Kopplungskonstante $^1J_{\text{C,F}}$ ergab sich ein Wert von 288 Hz (Daten hier nicht gezeigt). Dieser Wert entspricht dem Wert im ^{13}C -NMR-Spektrum.

5.3.2.4 HSQC- und HMBC-Experimente

Ziel des HSQC- und HMBC-Experiments ist es, Korrelationen zwischen zwei Heterokernen zu messen. In dieser Arbeit bezieht sich diese Korrelation auf die Kerne ^1H und ^{13}C . Je nach Wahl der skalaren Kopplungskonstanten zwischen Wasserstoff und Kohlenstoff werden C,H-Kopplungen über verschiedene Bindungen erhalten. Im HSQC-Experiment werden beispielsweise selektiv 1J -Kopplungen mit ~ 145 Hz sichtbar gemacht. Im HMBC-Experiment werden durch längere Evolutionszeiten *long-range* Kopplungskonstanten detektiert, wobei 1J -Kopplungen meistens unterdrückt sind. Liegen die Kopplungskonstanten zwischen 4 und 12 Hz, werden die geminalen und vicinalen Kopplungen als *long-range* Kopplungen sichtbar gemacht.

Die folgenden HSQC- und HMBC-Experimente wurden bei 37°C mit einer 3 M Trifluormethylketonprobe der Substanz B 10646964 durchgeführt.

Das HSQC-Experiment

Durch das HSQC-Experiment konnten den chemischen Verschiebungen für die ^{13}C -Atome die chemischen Verschiebungen der direkt koppelnden Protonen zugeordnet werden. Als 1J -Kopplungskonstante wurde ein Wert von 145 Hz gewählt. So konnte nachgewiesen werden, dass das Signal bei 1,71 ppm zwei CH_2 -Gruppen enthält (Abb. 5.20). Bei diesen CH_2 -Gruppen handelt es sich um die Positionen 10 und 11 des Trifluormethylketons (Abb. 5.19). Die dazugehörigen Kohlenstoff-Verschiebungen liegen bei 17,5 und 34,9 ppm. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Unterscheidung zwischen Position 10 und Position 11 und damit eine genauere Zuordnung noch nicht möglich. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das Kohlenstoffatom mit der Verschiebung von 130,2 ppm kein direkt koppelndes Proton besitzt, während das Kohlenstoffatom mit der Verschiebung von 130,6 ppm direkt koppelnde Protonen mit einer chemischen Verschiebung von 7,93 ppm besitzt.

Aus dem HSQC-Spektrum wurde zu der ^{13}C -Verschiebung bei 114,3 ppm eine dazugehörige Protonenverschiebung von 7,00 ppm ermittelt. Die chemischen Verschiebungen von 7,00 und 7,93 ppm sind dem Aromaten zuzuordnen. Welche Position 2 und welche 3 ist, wird später durch das selektive INADEQUATE und das HMBC-Experiment verifiziert.

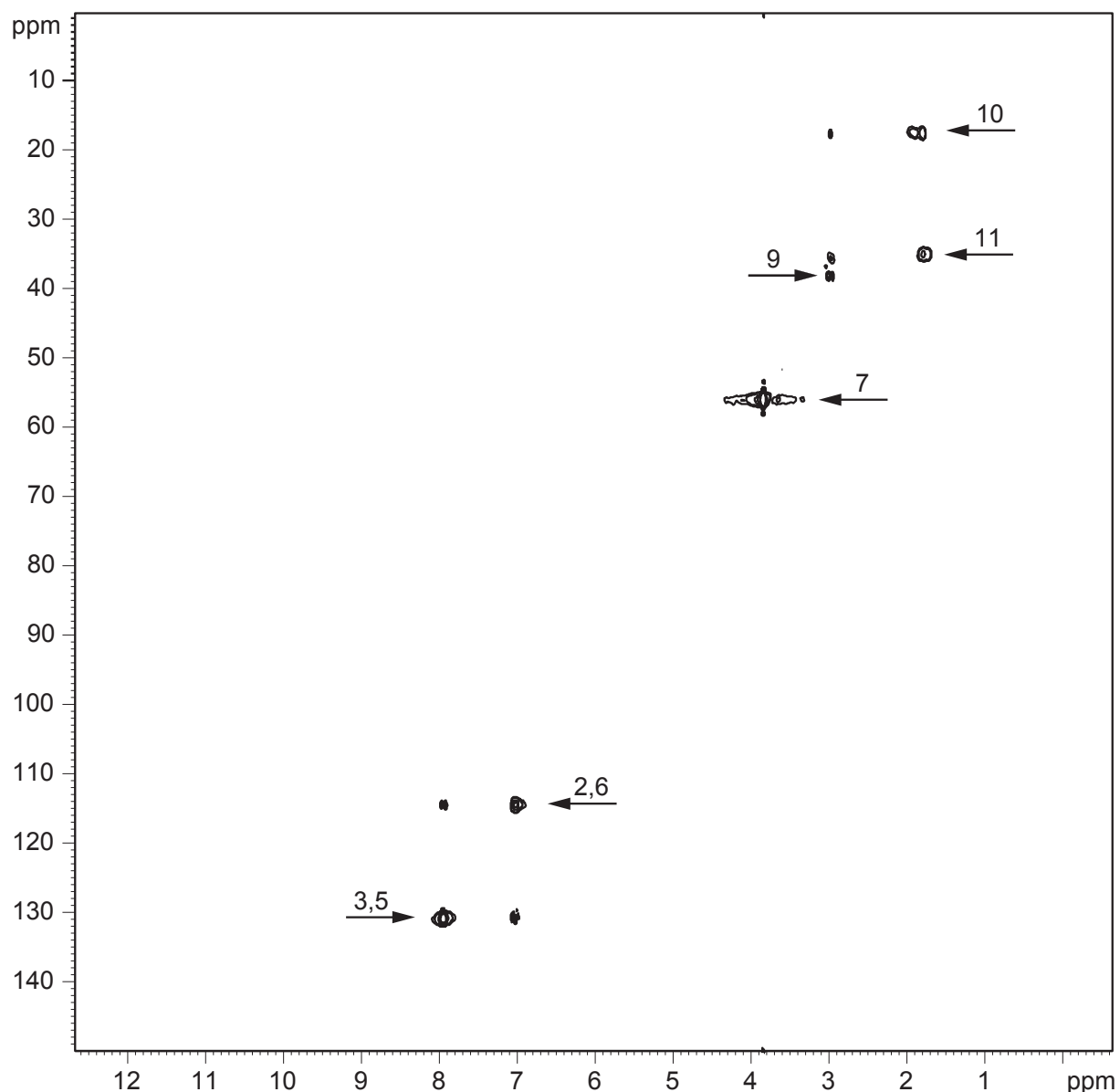


Abb. 5.20 HSQC-Spektrum mit Zuordnung der Signale für eine 1 M Probe des Trifluormethylketons B 10646964 bei einer Messtemperatur von 37 °C mit 4 Scans an einem 250 MHz Spektrometer. Bei den beschrifteten Signalen handelt es sich um die 1J -Kopplungen zwischen ^{13}C und ^1H . Die unbeschrifteten Signale stellen geminale Kopplungen dar.

Das HMBC-Experiment

Um die Positionen 10 und 11 genau zuordnen zu können, sollten entweder die *long-range* Kopplungskonstanten nJ (Kopplung über mehr als drei Bindungen) zwischen ^{19}F - und ^{13}C -Kernen oder die exakte nJ -Kopplungskonstante zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen bekannt sein. Problematisch im HMBC-Experiment ist, dass sich die Signalintensität nicht immer proportional zu den Kopplungskonstanten verhält. Die Signalintensität ist abhängig von der Evolutionszeit, die zur Entwicklung der

heteronuklearen-skalaren Kopplung im HMBC-Experiment verwendet wurde. Als Folge daraus können Signale, für die aufgrund einer hohen Kopplungskonstante ein starkes Signal erwartet wird, schwache Signale liefern. Umgekehrt ist es möglich, dass Signale, die für eine kleine Kopplungskonstante stehen, im Verhältnis zu starke Signale liefern. Daraus kann sich eine falsche Zuordnung der Signale ergeben. Die Evolutionszeit d berechnet sich über die *long-range* Kopplungskonstanten ${}^nJ_{H,C}$ ($d = 1/(2 \cdot {}^nJ_{H,C})$). Um die genaue Zuordnung aller Signale zu erhalten, wurden drei verschiedene Experimente, die sich in der Größe ihrer long-range Kopplungen ${}^nJ_{H,C}$ unterscheiden, durchgeführt. Als ${}^nJ_{H,C}$ wurden 4, 8 und 12 Hz gewählt.

Die ${}^2J_{H,C}$ -Kopplung hat normalerweise einen höheren Wert als die ${}^3J_{H,C}$ -Kopplung. Oftmals liegen in aromatischen Systemen diese Werte umgekehrt vor. Diese Tatsache kann zusätzlich zu einer fehlerhaften Signalzuordnung insbesondere in aromatischen Systemen führen.

Die Abbildung 5.21 zeigt die gesicherte Zuordnung der Substanz B 10646964. Die oben beschriebenen Probleme der Auswertung lassen sich anhand der Abbildung gut erklären. Theoretisch wird ein Spektrum erwartet, in dem das stärkste Kopplungssignal durch die 2J -Kopplung durch die Positionen zwischen C_8 und H_9 erscheint (Abb. 5.19). Die schwächeren Kopplungssignale werden durch die 3J -Kopplungen zwischen den Positionen C_8 und H_3 und zwischen C_8 und H_{10} bzw. durch die 4J -Kopplungen zwischen C_8 und H_{11} gebildet. Eine ${}^4J_{H,C}$ -Kopplung ist eher unwahrscheinlich.

Das Spektrum widerspricht allerdings den theoretischen Annahmen. Wie aus der Abbildung 5.21 hervorgeht, zeigt die 3J -Kopplung zwischen C_8 und H_3 das stärkste Signal, während die 2J -Kopplung zwischen C_8 und H_9 ein schwächeres Signal liefert. Ein sehr schwaches Signal ist bei der Kopplung zwischen C_8 und H_{10} bzw. H_{11} zu sehen. Handelt es sich bei diesem Signal tatsächlich um eine 4J -Kopplung, wäre die Größe damit erklärt. Da aber 4J -Kopplungen eher unwahrscheinlich sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine vicinale Kopplung handelt, auch wenn dieses Signal dafür recht klein ist.

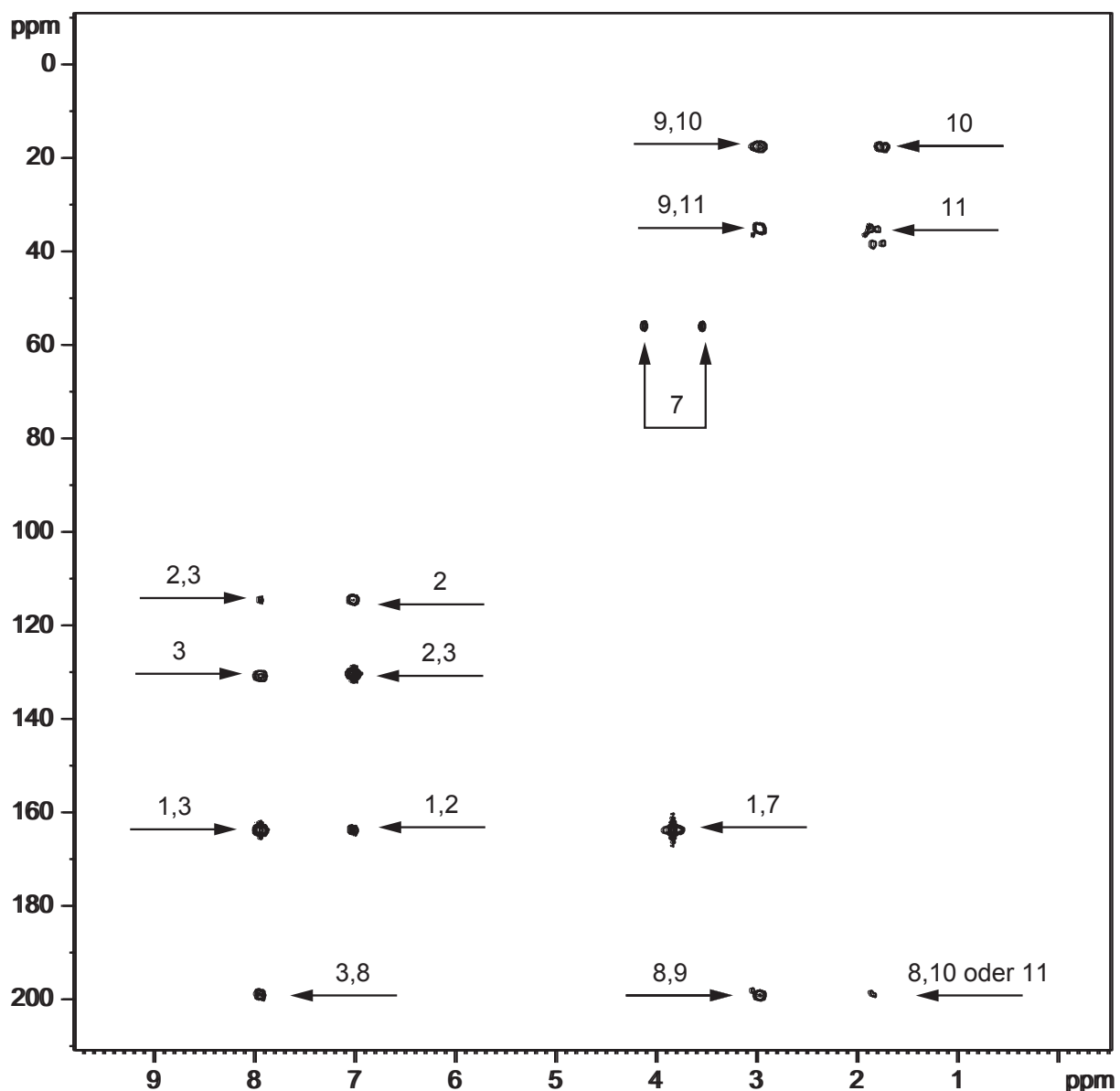


Abb. 5.21 HMBC-Spektrum der Substanz B 10646964 bei 37 °C mit einer 1 M Probe in d_6 -DMSO mit 4 Scans an einem 250 MHz Spektrometer. Die *long-range* Kopplungskonstante beträgt 8 Hz. Signale, die nur mit einer Positionsnummer beschriftet sind, entsprechen den HSQC-Signalen (Abb. 5.20). Die zweifach beschrifteten Pfeile zeigen die geminalen bzw. vicinalen Kopplungen zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen.

Werden die Signale für die Positionen 1, 2 und 3 betrachtet, wird für die geminale Kopplung zwischen C_1 und H_2 ein stärkeres Signal erwartet als für die vicinale Kopplung zwischen C_1 und H_3 . Aber auch diese theoretischen Erwartungen werden durch das Spektrum nicht bestätigt. Denn wie zu erkennen ist, zeigt die vicinale Kopplung zwischen C_1 und H_3 ein wesentlich intensiveres Signal als die geminale

Kopplung zwischen C₁ und H₂. Das belegt erneut die Problematik der Signalverteilung im aromatischen System.

Die Folge aus den unerwarteten Signalintensitäten kann schnell zu einer Fehlinterpretation der Signale führen. Um deshalb die Ergebnisse noch einmal zu bestätigen, wurden in dieser Arbeit auch das selektive 1D INADEQUATE- und das 2D INADEQUATE-Experiment durchgeführt.

5.3.2.5 INADEQUATE-Experimente

Das 1D INADEQUATE-Experiment dient zum Nachweis von $^1J_{C,C}$ -Kopplungskonstanten und damit zur Aufklärung der Struktur und Nachbarschaftsbeziehungen.

Die zu erwartenden Kopplungskonstanten für $^1J_{C,C}$ liegen zwischen 30 und 70 Hz.

Um die Verknüpfung des Kohlenstoffgerüsts festzustellen, wurde das 2D INADEQUATE-Experiment verwendet. Signale werden sichtbar, wenn ^{13}C -Atome über eine $^1J_{C,C}$ -Kopplung direkt miteinander verbunden sind. Vorteil des 2D INADEQUATE-Experimentes ist es, dass die ^{13}C -Signale und ihre Zuordnungen direkt gemessen werden können.

Durch die geringe natürliche Häufigkeit des ^{13}C -Isotops waren sehr hohe Stoffkonzentrationen und eine lange Messzeit nötig, um die C,C-Kopplungen messen zu können. Diese beiden Gründe sind ausschlaggebend dafür, dass diese Experimente selten als Routinemessungen eingesetzt werden.

Zur Bestätigung der Ergebnisse kamen das selektive 1D INADEQUATE- und das 2D INADEQUATE-Experiment zum Einsatz.

Selektives INADEQUATE-Experiment

Da zur Strukturaufklärung des Trifluormethylketons B 10646964 nur noch die Klärung einiger Signale notwendig war, war es effektiver, gezielt diese Signale zu bestimmen. Dafür wurde das **selektive** INADEQUATE-Experiment eingesetzt. Bei diesem Experiment werden die Kopplungen zweier direkt miteinander verbundener Kohlenstoffkerne und die dazugehörigen Kopplungskonstanten gemessen. Zu bestätigen waren die Positionen 1, 2, 3, 4, 10 und 11 (Abb. 5.19).

Durch die Anregung der Substanz bei 198,6 ppm (Pos. 8) wurden zwei Signale für die dazugehörigen Kohlenstoff-Kopplungspartner erwartet. Ein Signal sollte für die Position bei 130,2 ppm (Pos. 4) und ein zweites Signal bei 38,1 ppm (Pos. 9) erscheinen. Leider war eine Kopplung zu Position 4 nicht zu sehen. Ein Grund dafür

kann sein, dass die Messzeit mit circa 7 Stunden nicht ausreichend war. Der Kopplungspartner zur anderen Seite zeigte sich mit einer chemischen Verschiebung des Kohlenstoffs bei 38,1 ppm (Abb. 5.22). Damit konnte gezeigt werden, dass der Kohlenstoff der Position 8 mit dem der Position 9 koppelt.

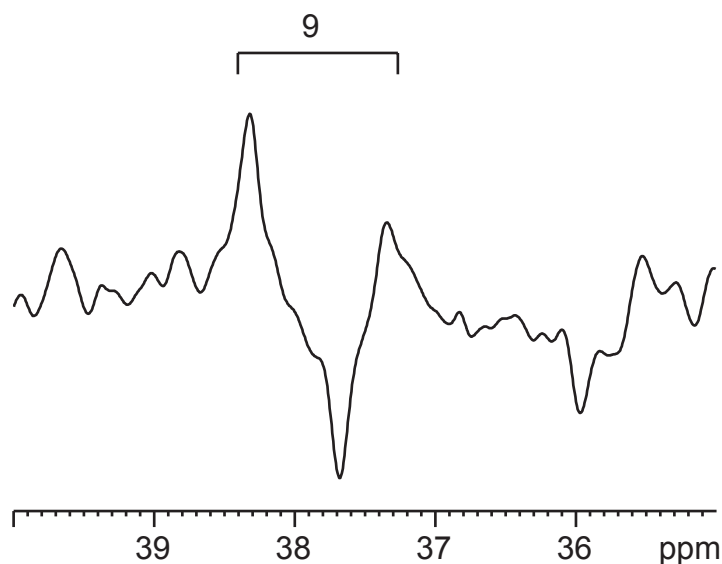


Abb. 5.22 Ausschnitt eines selektiven INADEQUATE-Spektrums einer 3 M Probe der Verbindung B 10646964 mit einer Anregungsfrequenz bei 198,7 ppm an einem 250 MHz Spektrometer. Diese Frequenz entspricht der chemischen Kohlenstoffverschiebung der Position 8. Als direktes Kopplungssignal zeigt dieses Spektrum die Position 9 mit der chemischen Kohlenstoffverschiebung von 38,1 ppm.

Um die Positionen 2 und 3 im aromatischen Ring eindeutig bestimmen zu können, wurde der Kohlenstoff an Position 1 bei einer chemischen Verschiebung von 163,5 ppm angeregt. Der Kopplungspartner, die Position 2, zeigte dann ein Signal (Abb. 5.23). Mit diesem Spektrum konnte geklärt werden, dass der ^{13}C -Kern bei 163,5 ppm direkt mit dem ^{13}C -Kern bei 114,3 ppm (Pos. 2 bzw. 6) koppelt. Für die Kopplungskonstante wurde ein Wert von 55 Hz gemessen.

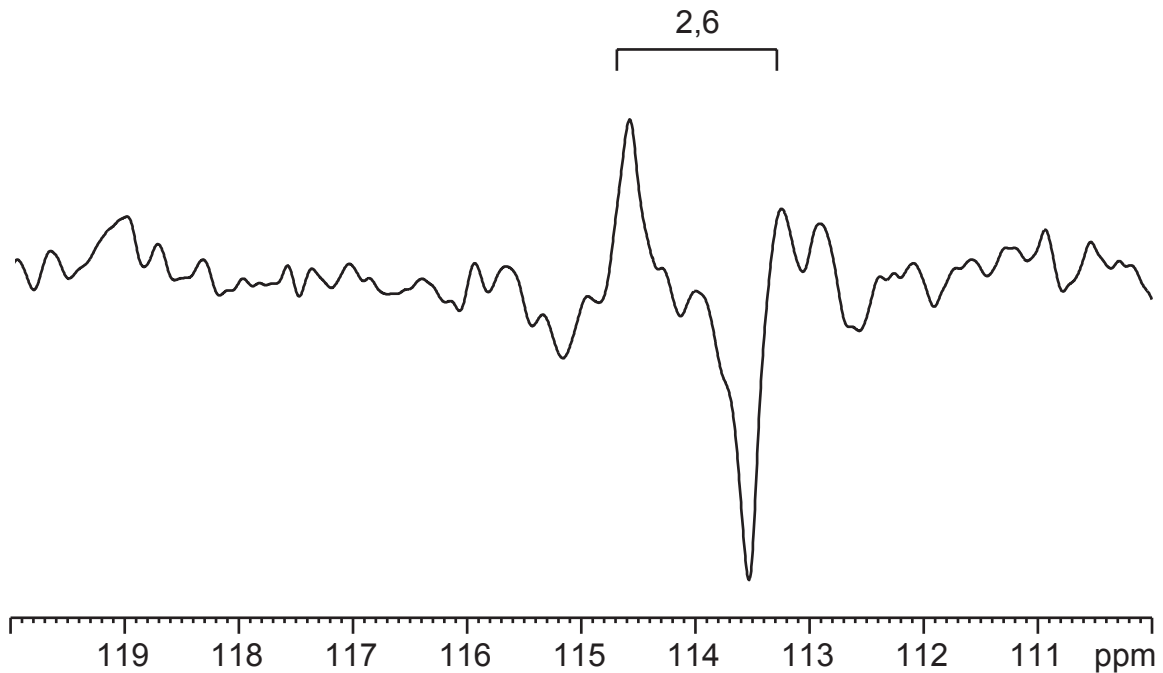


Abb. 5.23 Ausschnitt eines selektiven INADEQUATE-Spektrums einer 3 M Probe der Substanz B 10646964, in dem selektiv das Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von 163,5 ppm angeregt wurde. Verwendet wurde ein 250 MHz Spektrometer.

Wurde eine Anregungsfrequenz von 130,2 ppm gewählt, dieses entspricht der Position 4, wurden zwei Signale erwartet. Ein Signal zeigt die direkte Kopplung zum Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung bei 130,6 ppm für die Position 3 bzw. 5 (in Abbildung 5.24 nicht dargestellt). Das andere Signal beinhaltet die $^1J_{C,C}$ -Kopplung zur Position 8 mit der chemischen Verschiebung von 198,6 ppm (Abb. 5.24).

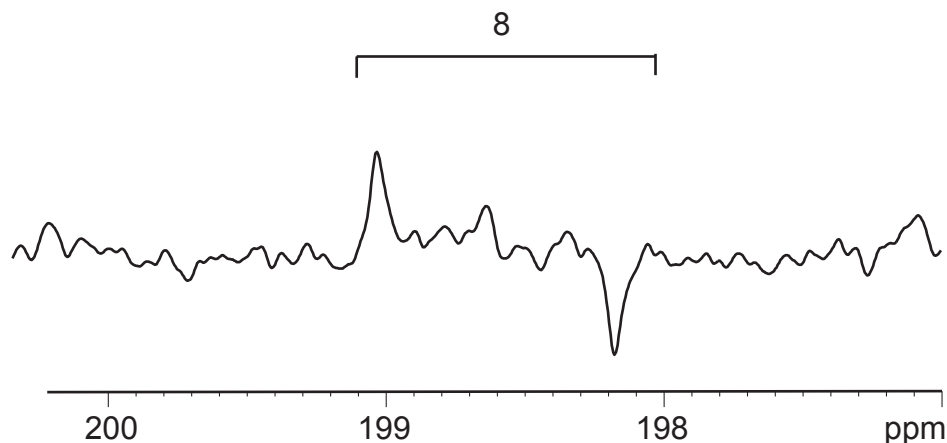


Abb. 5.24 Ausschnitt eines selektiven INADEQUATE-Spektrums einer 3 M Probe der Verbindung B 10646964 mit einer Anregungsfrequenz von 130,2 ppm für das Kohlenstoffatom der Position 4. Verwendet wurde ein 250 MHz Spektrometer. Als direktes Kopplungssignal zeigt dieses Spektrum die Position 8 mit der chemischen Kohlenstoffverschiebung von 198,6 ppm.

Durch dieses Experiment wurde die Position 4 eindeutig festgelegt. So ist auch nachgewiesen, dass der Kohlenstoffkern der Position 1 eine chemische Verschiebung von 163,5 ppm zeigt. Da das Kohlenstoffatom an Position 1 direkt mit dem Kohlenstoffatom der Position zwei koppelt, ist die chemische Verschiebung der Kohlenstoffe im aromatischen Ring eindeutig geklärt.

2D INADEQUATE-Experiment

Durch das 2D INADEQUATE-Experiment sollte abschließend die genaue Signalverteilung für die Positionen 10 und 11 geklärt werden. Aus diesem Experiment können die direkt über 1J -Kopplungen bindenden Kohlenstoffatome ermittelt werden. Nachteil dieses Verfahrens ist der sehr hohe Zeitaufwand von circa 24 Stunden Messzeit und der sehr hohe Substanzverbrauch für eine hoch konzentrierte Lösung. Eingesetzt wurde eine 3 M Probe, gelöst in d_6 -DMSO.

Die Signalverteilung für die Positionen 9 und 10 - 12 ist durch Pfeile im Spektrum gekennzeichnet (Abb. 5.25). Anzumerken ist, dass die ^{13}C -Verschiebung für die Position 8 in diesem Spektrum kein, vom Rauschen einwandfrei zu unterscheidendes Signal bei 198,7 ppm ergeben hat. Anhand dieses Spektrums konnte nachgewiesen werden, dass die Position 10 eine Kohlenstoffverschiebung von 17,5 ppm und die

Position 11 eine Kohlenstoffverschiebung von 34,9 ppm zeigt. In dem Spektrum wird dieses dadurch sichtbar, dass der Kohlenstoff mit der Verschiebung von 38,1 ppm eine Kopplung zu dem Kohlenstoff mit der Verschiebung von 17,5 ppm, der Position 10 zeigt. Der Kohlenstoff der Position 10 koppelt mit dem der Position 11. Dieser wiederum koppelt mit dem Kohlenstoff der Position 12 mit einer Verschiebung von 93,3 ppm.

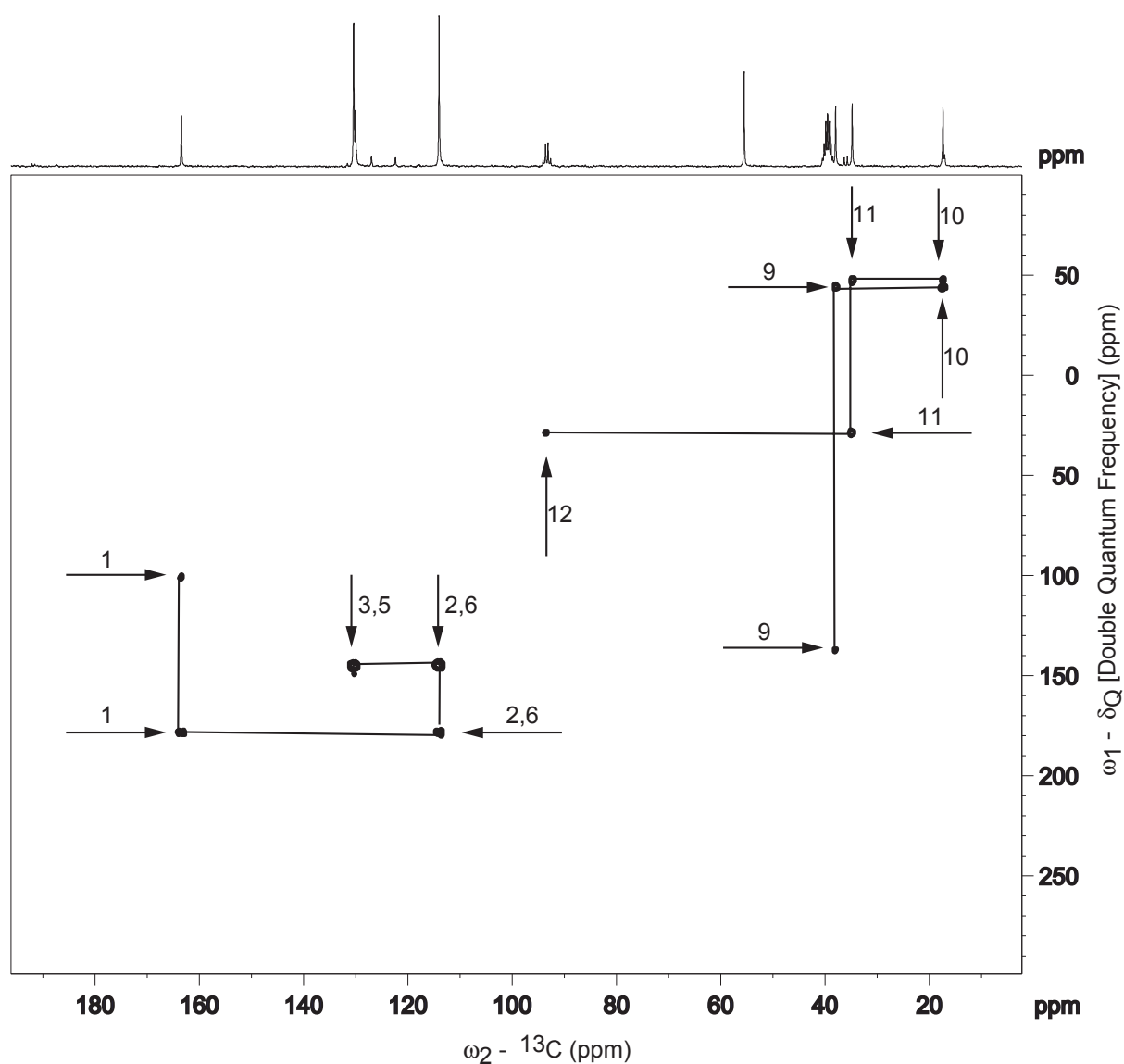


Abb. 5.25 2D INADEQUATE-Spektrum des Trifluormethylketons B 10646964 einer 3 M Probe bei einer Temperatur von 37 °C an einem 250 MHz Spektrometer. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die ${}^{13}\text{C}$ -Verschiebungen für die Positionen 1 – 3, 5 - 6 und 9 - 12.

5.3.2.6 Ergebniszusammenfassung

Um einen besseren Überblick über die Ergebnisse aus den verschiedenen Experimenten zu erlangen, werden diese noch einmal tabellarisch zusammengefasst (Tab. 5.4). Um die Signalzuordnungen eindeutig zu klären, wurden neben einem ^1H -Spektrum auch noch ^{13}C -Spektren, HSQC- und HMBC-Experimente durchgeführt. Weiterhin erfolgte die Aufnahme von einem ^{19}F -Spektrum und verschiedenen INADEQUATE-Spektren. Alle oben erhaltenen Ergebnisse wurden bei 37 °C gemessen. Die STD-Messungen wurden aber bei 12 °C durchgeführt. Daher war die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums bei 12 °C nötig. Durch den Vergleich der ^1H -Spektren bei den unterschiedlichen Temperaturen konnte auch für 12 °C eine eindeutige Signalzuordnung durchgeführt werden (Daten hier nicht gezeigt).

Tab. 5.4 Chemische Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Kerne und Kopplungskonstanten des Trifluormethylketons B 10646964, gemessen an einem 250 MHz Spektrometer (Abb. 5.19).

Position/ Gruppe	^1H (ppm) bei 12 °C, 50 % D_2O , 50 % d_6 -DMSO	^1H (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO	^{13}C (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO	J (Hz) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO
1	-	-	163,5	$^1J_{\text{C}1,\text{C}2/6}=55$
2,6	6,95	7,00	114,3	-
3,5	7,86	7,93	130,6	-
4	-	-	130,2	-
7	3,72	3,81	55,8	-
8	-	-	198,6	-
9	2,91	2,96	38,1	-
10	1,64	1,71	17,5	$^1J_{\text{C}10,\text{C}9}=41$ $^1J_{\text{C}10,\text{C}11}=24$
11	1,64	1,71	34,9	-
12	-	-	93,3	$^2J_{\text{F},\text{C}}=30$
13	-	-	(hydratisiert) 124,9	$^1J_{\text{F},\text{C}}=288$

5.3.2.7 Signalzuordnungen für weitere Trifluormethylketone

Das Trifluormethylketon B 10646964 diente als Referenzsubstanz für die Signalzuordnungen der Grundstruktur dieser Verbindungsklasse. Für alle weiteren Substanzen wurden neben ^1H -NMR-Spektren nur noch HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen, um die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Substituenten bzw. der strukturellen Abweichungen von der Grundstruktur zu ermitteln. An dieser Stelle wird auf die Spektren verzichtet. Sie sind im Anhang (Kap. 8) aufgeführt.

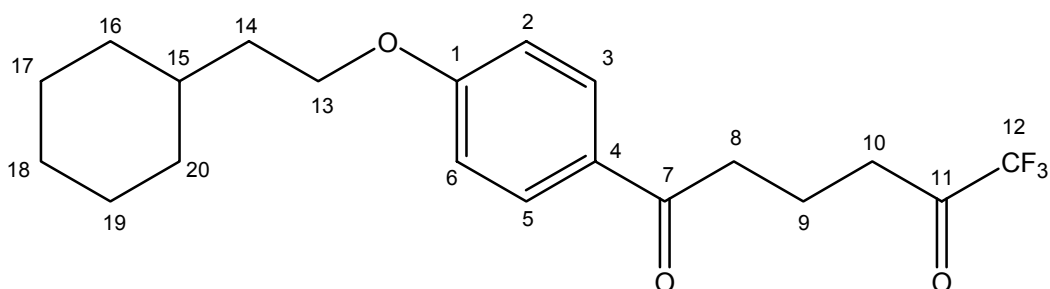


Abb. 5.26 Struktur des Trifluormethylketons B 10682871 mit den Positionsnummern für die einzelnen Gruppen.

Eine Variation des *para*-ständigen Substituenten zeigt die Verbindung B 10682871 (Abb. 5.26). Die Signalzuordnung für diese Substanz ergibt die in Tabelle 5.5 zusammengefassten chemischen Verschiebungen für die ^1H - und ^{13}C -Kerne. Für diese Substanz war es nicht möglich, die chemischen Protonenverschiebungen für die Positionen 9, 10 und 14 - 20 bei einer Messtemperatur von 12 °C mit einem 50 %igen D_2O -Anteil zu ermitteln, da unter diesen Bedingungen keine ausreichend hohe Substanzmenge in Lösung zu bekommen war. Aus dem ^1H -Spektrum für diese Substanz ist ersichtlich, dass die Signale der Positionen 9, 10 und 14 - 20 sich alle in einem Bereich zwischen 0,74 und 1,64 ppm überlagern (Abb. 5.30).

Tab. 5.5 Übersicht der chemischen Verschiebungen des Trifluormethylketons B 10682871 für die ^1H - und ^{13}C -Kerne bei 12 °C und 37 °C. Die Messungen wurden an einem 250 MHz Spektrometer durchgeführt.

Position/ Gruppe	^1H (ppm) bei 12 °C, 50 % D_2O , 50 % d_6 -DMSO	^1H (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO	^{13}C (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO
1	-	-	163,0
2,6	6,92	7,03	114,0
3,5	7,84	7,94	130,7
4	-	-	130,0
7	-	-	198,8
8	2,96	2,99	38,1
9	1,64 - 0,74	1,78	17,5
10		1,73	34,9
11	-	-	93,0 (hydratisiert)
12	-	-	124,9
13	3,99	4,10	66,4
14	2,01	1,67	36,3
15	1,64	1,46	34,5
16,20		0,96	33,1
17,19	-	1,67	26,2
18	0,74	1,20	26,2

Für die STD-NMR-Messungen wurden auch Trifluormethylketone mit einer abgewandelten Grundstruktur eingesetzt, um den Stellenwert der aromatenständigen Carbonylgruppe und des aromatischen Rings für die Bindung zur Pankreaslipase zu ermitteln. Daher mussten auch für diese Substanzen die Signale zugeordnet werden. Zum Einsatz kamen drei verschiedene Trifluormethylketone mit geänderter Grundstruktur, das B 10551089, das B 10539242 und das B 10694628.

Bei der Substanz B 10551089 fehlt gegenüber dem Trifluormethylketon B 10646964 die α -ständige Carbonylgruppe am Phenylring (Abb. 5.27).

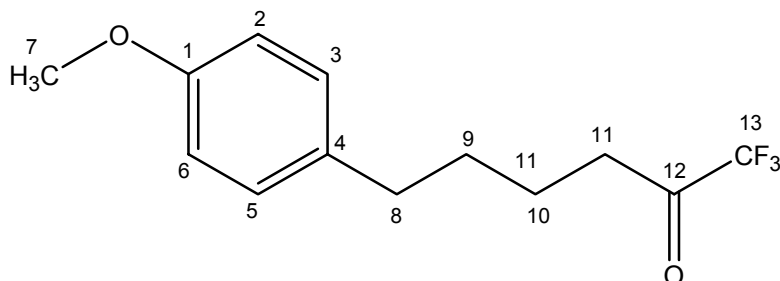


Abb. 5.27 Struktur und Positionsverteilung für die Gruppen der Substanz B 10551089.

Die chemischen Verschiebungen wurden mittels eines HMBC-Spektrums bestimmt, das im Anhang abgebildet ist (Abb. 8.1). Tabelle 5.6 zeigt eine zusammenfassende Übersicht der ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen der Substanz B 10551089.

Tab. 5.6 Chemische Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Kernen bei 12 °C und 37 °C für das Trifluormethylketon B 10551089, gemessen an einem 250 MHz Spektrometer.

Position/ Gruppe	^1H (ppm) bei 12 °C, 50 % D_2O , 50 % d_6 -DMSO	^1H (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO	^{13}C (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO
1	-	-	157,6
2,6	6,95	6,79	114,1
3,5	7,22	7,07	130,6
4	-	-	134,7
7	3,80	3,65	55,4
8	2,61	2,48	34,4
9	1,62	1,48	31,6
10	1,47	1,38	21,4
11	1,76	1,54	34,9
12	-	-	92,9 (hydratisiert)
13	-	-	124,9

Als weitere Strukturvariation wurde die Substanz B 10539242 eingesetzt, bei der statt der α -ständigen Carbonylgruppe am Phenylrest eine Etherbrücke eingebaut wurde (Abb. 5.28).

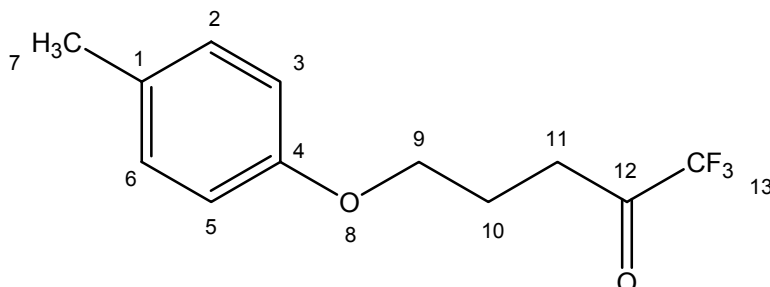


Abb. 5.28 Darstellung der Struktur und der Positionsnummern für die einzelnen Gruppen des Trifluormethylketons B 10539242.

Mit Hilfe eines HMBC-Spektrums sind die chemischen Verschiebungen für die ^1H - und ^{13}C -Kerne bestimmt worden (im Anhang Abb. 8.2). Diese chemischen Verschiebungen sind in der Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tab. 5.7 Chemische Verschiebungen der Wasserstoff- und Kohlenstoffkerne des Trifluormethylketons B 10539242 bei 12 °C und 37 °C, gemessen an einem 250 MHz Spektrometer.

Position/ Gruppe	^1H (ppm) bei 12 °C, 50 % D_2O , 50 % d_6 -DMSO	^1H (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO	^{13}C (ppm) bei 37 °C, 100 % d_6 -DMSO
1	-	-	130,1
2,6	6,84	6,75	130,3
3,5	7,13	7,03	114,9
4	-	-	156,5
7	2,27	2,13	20,3
8	-	-	-
9	3,99	3,89	67,9
10	1,86	1,81	21,9
11	1,86	1,77	31,6
12	-	-	93,0
13	-	-	(hydratisiert) 124,9

Weiterhin wurde das Trifluormethylketon B 10696428 untersucht (Abb. 5.29), um den Einfluss des Phenylrings auf die Bindung an das aktive Zentrum zu ermitteln.

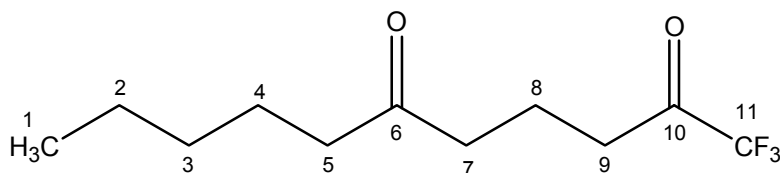


Abb. 5.29 Struktur und Positionsangaben zu der Verbindung B 10694628.

Aus einem HMBC-Spektrum zu dieser Substanz (im Anhang Abb. 8.3) lassen sich folgende chemische Verschiebungen für die ¹H- und ¹³C-Kerne ermitteln (Tab. 5.8).

Tab. 5.8 Chemische Verschiebungen der ¹H- und ¹³C-Kerne des Trifluormethylketons B 10694628 bei 12 °C und 37 °C, gemessen an einem 250 MHz Spektrometer.

Position/ Gruppe	¹ H (ppm) bei 12 °C, 50 % D ₂ O, 50 % d ₆ -DMSO	¹ H (ppm) bei 37 °C, 100 % d ₆ -DMSO	¹³ C (ppm) bei 37 °C, 100 % d ₆ -DMSO
1	0,84	0,77	13,7
2	1,22	1,14	21,9
3	1,22	1,14	30,8
4	1,48	1,39	23,2
5	2,46	2,37	42,6
6	-	-	215,0
7	2,53	2,43	42,0
8	1,66	1,59	16,3
9	1,66	1,58	34,0
10	-	-	93,0
11	-	-	(hydratisiert) 124,8

5.3.3 *Group epitope mapping* von porciner Pankreaslipase gebunden an Trifluormethylketone

Wechselwirkungen von Arzneistoffen mit Proteinen spielen bei vielen Arzneimittelwirkungen eine wichtige Rolle. Dazu zählen die erwünschten Wirkungen am Zielenzym, aber auch die unerwünschten Wirkungen an Enzymen, die strukturell mit dem Zielenzym verwandt sind.

So zeigen zum Beispiel Peptidyl-fluoromethylketone inhibitorische Wirkung auf Serinproteasen, zu denen u. a. das α -Chymotrypsin und die Acetylcholinesterase gehören (Liang und Abeles, 1987; Gelb *et al.*, 1985).

Um unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Enzymen zu vermeiden, beispielsweise mit Enzymen des systemischen Blutkreislaufs, werden Trifluormethylketone als Lipaseinhibitoren gesucht, welche die Pankreaslipase ohne Resorption der Hemmstoffe in die Blutbahn inhibieren. Für den Lipaseinhibitor Orlistat wurde nachgewiesen, dass dieser nur lokal im Dünndarm wirkt und mit dem Stuhl ausgeschieden wird. Die systemische Wirkung ist nach Einnahme von 2 Jahren minimal und zu vernachlässigen (Zhi *et al.*, 1999).

Mit STD-NMR (Mayer und Meyer, 1999 und 2001) wird in dieser Arbeit das Bindungsepitop verschiedener Trifluormethylketone gebunden an porcine Pankreaslipase bestimmt. Um diese NMR-Experimente durchführen zu können, muss die Lipase unter den Messbedingungen über einen längeren Zeitraum eine ausreichende Aktivität zeigen. Bereits in Kapitel 5.2 konnte gezeigt werden, dass das Enzym eine ausreichende Aktivität und damit Stabilität in einem 1 : 1 Wasser-DMSO-Gemisch besitzt.

Die Stabilität und Aktivität der porcinen Pankreaslipase in einem Lösungsmittelgemisch aus 1 Teil Wasser und 1 Teil DMSO bei 240 minütiger Präinkubation bei einer Temperatur von 4 °C wurde um 20 – 25 % herabgesetzt (Kap. 5.2.3, Tab. 5.2). Durch die Trifluormethylketone wurde scheinbar der Gefrierpunkt der Lösung heraufgesetzt, so dass die Lösung bei 4 °C gefror. Dadurch waren keine Flüssig-NMR-Messungen mehr möglich. Daher wurde für die Messungen eine Messtemperatur von 12 °C gewählt, da die Lösung bei dieser Temperatur gerade nicht mehr gefriert.

Die Stabilitätsüberprüfung der Lipase für diese Temperatur erfolgte durch die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren über 6 Stunden nach der Messung der STD-Spektren. Dass heißt, dass zu der Lösung aus Inhibitor und Pankreaslipase nach Beendigung der STD-Messungen Lipase-Substrat in Form von Tributyrin zugegeben

wurde. Über einen Zeitraum von 6 Stunden wurden ^1H -Spektren aufgenommen. Tributyrin ist der Triester aus Glycerol und Buttersäure. Durch die Pankreaslipase wird das Tributyrin zu Buttersäure und 2-Monobutyrylglycerol hydrolysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Lipase nach den STD-Messungen noch aktiv war. Durch Signalwachstum für die Entstehung von Produkt und Signalverminderung durch Umsetzung des Tributyrins ist die Aktivität der Pankreaslipase nach 4 Stunden STD-Messzeit und für weitere 6 Stunden nachgewiesen worden (Daten hier nicht gezeigt), so dass die Pankreaslipase unter diesen Mess- und Temperaturbedingungen Stabilität und Aktivität über wenigstens 10 Stunden zeigte.

Weiterhin kann nur dann ein Bindungsepitop zwischen Enzym und Hemmstoff erstellt werden, wenn es sich bei dem Hemmstoff um eine reversibel bindende Substanz handelt. Der Ligand muss einen schnellen Austausch zeigen, um einen Sättigungstransfer von dem Protein auf den Liganden zu ermöglichen (Meyer und Peters, 2003). Für irreversibel bindende Inhibitoren ist die STD-Messung nicht möglich, da sie an das Enzym binden und dort haften bleiben. Daher ist ein Sättigungstransfer nicht messbar.

5.3.3.1 STD-NMR-Experimente zu den Trifluormethylketonen mit porciner Pankreaslipase

Zum Ermitteln des Bindungsepitops wurde das ^1H -STD-NMR eingesetzt. Als Lösungsmittelgemisch wurde eine Mischung aus 1 Teil d_6 -DMSO und aus 1 Teil D_2O eingesetzt.

^1H -STD-NMR zu dem Trifluormethylketon B 10682871

Mittels der kinetischen Messungen zur Bestimmung des inhibitorischen Potentials des Trifluormethylketons B 10682871 wurde für diese Substanz ein IC_{50} -Wert von $\sim 31 \mu\text{M}$ ermittelt (Kap. 5.2.6.2). Deshalb ist zu erwarten, dass das STD-NMR-Spektrum für diese Substanz Bindungssignale zeigt.

Um zu bestimmen, ob und wie das Trifluormethylketon B 10682871 an die Lipase bindet, wurde ein ^1H -STD-NMR-Spektrum aufgenommen (Abb. 5.30). Der Inhibitor wurde in diesem Experiment in 100-fachem Überschuss bezogen auf die Lipasekonzentration eingesetzt.

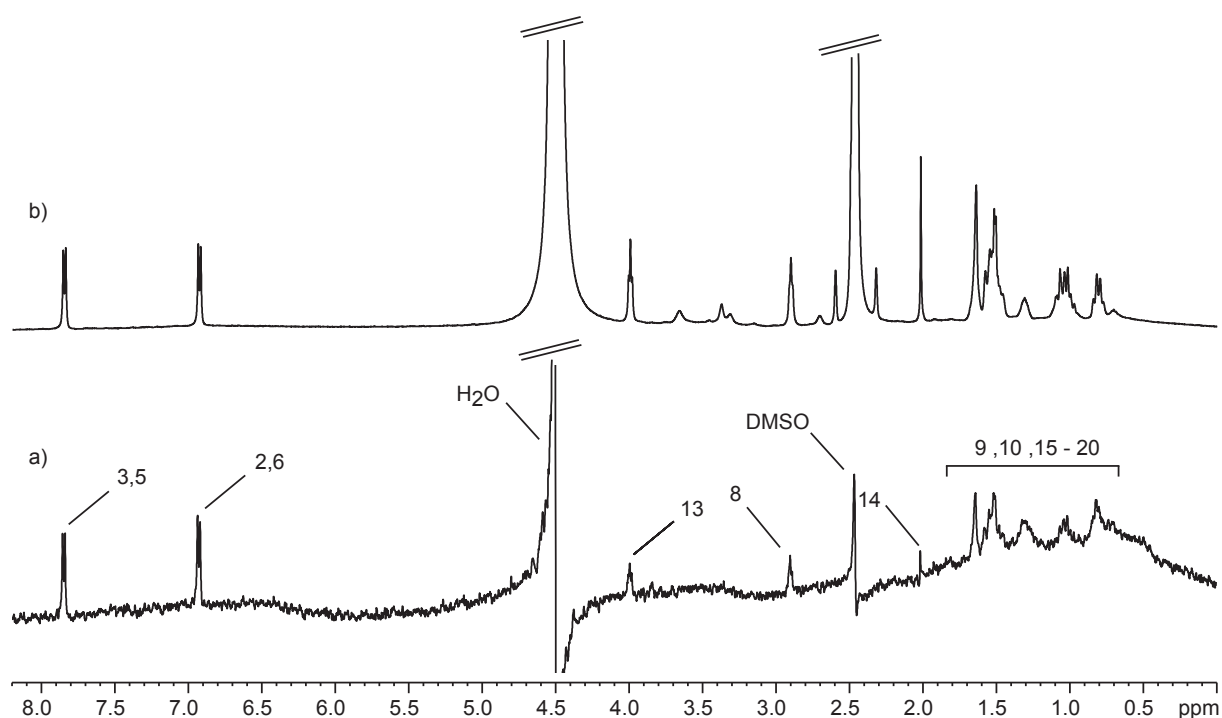


Abb. 5.30 Vergleich eines STD-NMR-Spektrums (a) von porciner Pankreaslipase mit dem Lipaseinhibitor B 10682871 mit einem ^1H -NMR-Spektrum (b) in 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O bei 12 °C und 500 MHz. Das Protein wurde für 2 sec bei -2 ppm für das *on-resonance* und bei -20 ppm für das *off-resonance* Spektrum gesättigt.

Aus dem ^1H -STD-NMR-Spektrum wird ersichtlich, dass das Aromatensignal bei 6,92 ppm (Pos. 2, Abb. 5.26) den stärksten Sättigungstransfer durch die porcine Pankreaslipase erfährt. Dieses Signal dient als Referenzsignal zur Beurteilung der anderen Signalintensitäten und wird auf 100 % gesetzt (Abb. 5.31). Die Protonen des Aromaten stehen also mit dem Protein im engsten Kontakt. Weiterhin in Kontakt mit dem Protein stehen die Protonen der Positionen 8 und 13 bei 2,96 bzw. 3,99 ppm, wobei der Sättigungstransfer mit je ungefähr 40 % wesentlich schwächer ausfällt. Kaum Sättigung (9 %) erfährt die CH_2 -Gruppe der Position 14 bei einer Protonenverschiebung von 2,01 ppm.

Problematisch ist der Sättigungstransfer für die anderen Positionen (mit * gekennzeichnet), da es in dem Bereich der chemischen Verschiebung zwischen 0,74 und 1,64 ppm für die Protonen zu Signalüberlagerungen kommt und somit eine genaue Zuordnung der STD-Signale nicht möglich ist. In dem Bereich zwischen 0,74 und 1,64 ppm befinden sich die Signale des Cyclohexylrestes (Pos. 15 - 20) und die α - und β -ständigen CH_2 -Gruppen zum Trifluormethylketon (Pos. 9 und 10).

Zusammen erfahren diese Protonen einen Sättigungstransfer, der einem prozentualen STD-Faktor von 47 % entspricht.

Abbildung 5.31 zeigt das Bindungsepitop der Substanz B 10682871 an die porcine Pankreaslipase mit den prozentualen STD-Werten.

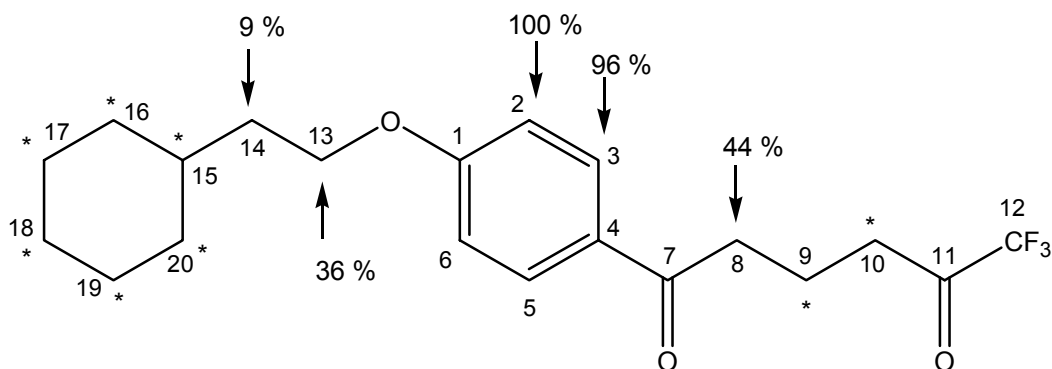


Abb. 5.31 Darstellung des Bindungsepitops des Trifluormethylketons B 10682871 mit porciner Pankreaslipase. Zu den mit * gekennzeichneten Positionen ist aufgrund von Signalüberlagerungen der STD-Signale keine getrennte Zuordnung möglich. Zusammen erfahren diese Protonen einen Sättigungstransfer von 47 %. Den stärksten Sättigungstransfer erfahren die Aromatenprotonen. Daraus kann geschlossen werden, dass diese mit dem Protein im engsten Kontakt stehen.

Wie aus dem *group epitope mapping* eindeutig hervorgeht, binden die Protonen des aromatischen Rings am stärksten. Da es sich bei der Pankreaslipase um ein Enzym handelt, welches lipophil ist, überrascht dieses Ergebnis nicht, denn der Aromat ist ein stark lipophiler Molekülteil. Ob die Bindung vom Serin 152 des aktiven Zentrums ausgeht, ist anhand der NMR-Spektroskopie nicht zu ermitteln. Einen detaillierten Einblick in die Art der Bindung geben Messungen mit dem Inhibitor Orlistat, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

Durch den Vergleich des Bindungsepitops von der Substanz B 10682871 mit dem nachfolgenden Bindungsepitop des Trifluormethylketons B 10646964 konnte gezeigt werden, dass die α - und β -ständigen CH_2 -Gruppen des Trifluormethylketons (Pos. 9 und 10) auch einen Sättigungstransfer durch die Pankreaslipase erfahren. Dieser Vergleich lässt vermuten, dass ein Teil des STD-Signals zwischen 0,74 ppm und 1,64 ppm und damit ein Teil des Sättigungstransfers auf diesen Molekülteil entfällt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Trifluormethylketon B 10682871 an die porcine Pankreaslipase bindet. Die stärkste Bindung zeigt der aromatische Ring. Zu klären bleibt die Frage, ob der Inhibitor dieselbe Bindungsstelle wie das

Orlistat besetzt, von dem bekannt ist, das es kovalent irreversibel an das Serin 152 des aktiven Zentrums bindet.

Charakterisierung der Bindung zwischen der porcinen Pankreaslipase und dem Trifluormethylketon B 10682871 mittels ^1H -STD-NMR in Anwesenheit von Orlistat

Anhand der kinetischen Daten aus Kapitel 5.2 konnte bislang nicht nachgewiesen werden, ob sich die Trifluormethylketone im aktiven Zentrum der porcinen Pankreaslipase oder an einer anderen Bindungsstelle am Enzym anlagern. Da die Bindungsstelle des Orlistats im aktiven Zentrum bekannt ist, wurde eine kompetitive Titration mit Orlistat durchgeführt.

Dafür wurden ein STD-Spektrum und ein Referenzspektrum mit dem Trifluormethylketon B 10682871 aufgenommen (Abb. 5.30). Bindet das Trifluormethylketon an derselben Bindungsstelle wie das Orlistat, also im aktiven Zentrum, sollte dieselbe Probe nach Zugabe von Orlistat in einem STD-Spektrum verminderte STD-Signale zeigen; denn für das Orlistat wurde im Kapitel 5.2 ein IC_{50} -Wert von ~ 20 nM ermittelt. Für das Trifluormethylketon B 10682871 wurde dagegen nur einen IC_{50} -Wert von ~ 31 μM gemessen. Somit zeigt das Trifluormethylketon ein schlechteres inhibitorisches Potential, wodurch begründet werden kann, dass das Orlistat das Trifluormethylketon nahezu vollständig von der Bindungsstelle verdrängen kann und dadurch die STD-Signale verkleinert werden. Dass das Orlistat so stark bindet und dadurch die Bindungssignale ganz auslöscht, ist eher unwahrscheinlich; denn die Entwicklung des irreversiblen Lipase-Orlistat-Komplexes und die Verdrängung des Trifluormethylketons aus dem aktiven Zentrum durch das Orlistat benötigt Zeit. In dieser Zeit kann das noch nicht verdrängte Trifluormethylketon schon durch die angeregte Lipase einen Sättigungstransfer erfahren. Besetzen das Orlistat und das Trifluormethylketon dieselbe Bindungsstelle, wird dieser Bindungsmechanismus als kompetitive Bindung bzw. kompetitive Inhibition bezeichnet.

Liegt ein nicht-kompetitiver Bindungsmechanismus zwischen den beiden Inhibitoren vor, besetzen sie unterschiedliche Bindungsstellen an der Lipase. Das heißt, dass das Trifluormethylketon eine Bindungsstelle außerhalb des aktiven Zentrums zeigen würde. Im STD-Spektrum würde dieser Mechanismus dadurch sichtbar, dass sich die Intensität der Bindungssignale des Trifluormethylketons bei Zugabe von Orlistat nicht

ändert. Das Bindungsepitop wäre identisch zu dem ohne Orlistat. Genauer erklärt werden die verschiedenen Inhibitionstypen in Kapitel 3.2.2.

Abbildung 5.32 zeigt die Sättigungsdifferenz Δ des Trifluormethylketons B 10682871 zwischen den Bindungsepitopen für die Anwesenheit und Abwesenheit von Orlistat. Für die mit * gekennzeichneten Protonen ist der Sättigungstransfer problematisch, da es in dem Bereich der chemischen Verschiebungen zu einer Signalüberlagerung kommt (0,74 – 1,64 ppm). Somit ist eine genaue Zuordnung der STD-Signale nicht möglich.

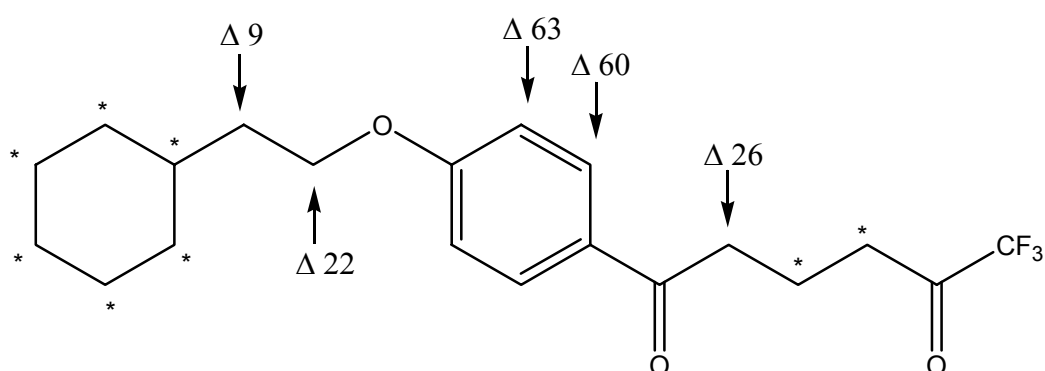


Abb. 5.32 Darstellung der Sättigungsdifferenz Δ des Trifluormethylketons B 10682871 in Gegenwart der porcinen Pankreaslipase sowie in An- und Abwesenheit des Inhibitors Orlistat. Die Differenz wurde zwischen den STD-Faktoren des Bindungsepitops in Abwesenheit von Orlistat (Abb. 5.31) und den STD-Faktoren des Bindungsepitops in Anwesenheit von Orlistat gebildet. Für die mit * beschrifteten Molekülteile ist aufgrund der Signalüberlagerung kein eindeutiges Epitop bestimmbar.

Die relative Abnahme des Sättigungstrfers beträgt für alle Positionen ungefähr 60 %. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass das Trifluormethylketon B 10682871 scheinbar durch das Orlistat aus dem aktiven Zentrum verdrängt wird. Aufgrund der in Kapitel 5.2 ermittelten IC_{50} -Werte für Orlistat (~ 20 nM) und für das Trifluormethylketon (~ 31 μ M) kann davon ausgegangen werden, dass gar keine Bindungssignale mehr für das Trifluormethylketon nach Zugabe von Orlistat zu messen sind. Das Orlistat könnte das Keton aufgrund des wesentlich besseren IC_{50} -wertes nahezu vollständig aus der Bindungstasche verdrängen. Das Bindungsepitop und damit der eventuelle Sättigungstrfer von der Lipase auf das Trifluormethylketon können dadurch entstehen, dass die Verdrängung des Inhibitors durch Orlistat aus dem aktiven Zentrum Zeit benötigt oder dass das Orlistat das

Trifluormethylketon nicht vollständig aus dem aktiven Zentrum verdrängt, sondern die Bindungsstelle für das Trifluormethylketon „verschoben“ wird.

Eine dritte Erklärung ist, dass der Sättigungstransfer nicht mehr durch die Pankreaslipase erfolgt, sondern durch das Orlistat. Dadurch, dass das Orlistat kovalent irreversibel an das Serin 152 des aktiven Zentrums bindet, bildet es eine Moleküleinheit mit der Lipase. Wird die Lipase im STD-Spektrum durch die Anregung bei -2 ppm vollständig gesättigt, so erfolgt damit auch gleichzeitig die Sättigung des irreversibel gebundenen Orlistats. So ist es möglich, dass der Sättigungstransfer über das Orlistat auf das Trifluormethylketon erfolgt. Das geschieht, wenn das Trifluormethylketon an das Orlistat und nicht mehr an das Serin 152 bindet.

¹H-STD-NMR-Experimente mit dem Trifluormethylketon B 10682871 und inaktivierter porciner Pankreaslipase

Um sicher zu sein, dass die Bindung des Trifluormethylketons B 10682871 an die porcine Pankreaslipase nicht von d_6 -DMSO denaturierten Proteinmolekülen der Lipase ausgeht, wurde ein Bindungsepitop mit denaturierter Lipase erstellt. Die Denaturierung der porcinen Pankreaslipase erfolgte durch 60-minütiges Erhitzen einer Lipaselösung aus 1 Teil D_2O und 1 Teil d_6 -DMSO auf 90 °C. Diese Lösung wurde nach dem Abkühlen für die ¹H-STD-Messungen eingesetzt (im Anhang Abb. 8.4).

Wenn die Bindung von der denaturierten Lipase ausgehen würde, sollte das erhaltene Bindungsepitop ein anderes gegenüber dem Bindungsepitop von nicht denaturierter Lipase sein.

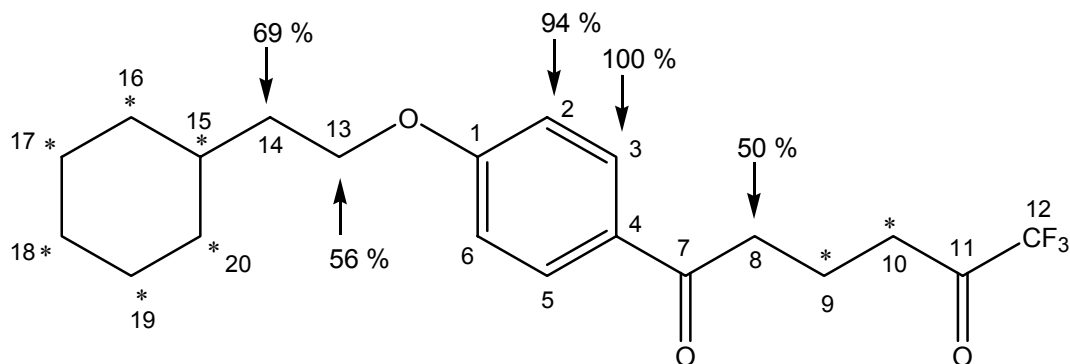


Abb. 5.33 Darstellung des Bindungsepitops des Trifluormethylketons B 10682871 an denaturierte porcine Pankreaslipase. Es ist eindeutig zu erkennen, dass sich das Epitop gegenüber der nicht denaturierten Lipase (Abb. 5.31) geändert hat, und zwar zeigt die denaturierte Lipase eine um 60 % stärkere Bindung zur Position 14 als die nicht denaturierte Lipase. Die mit * gekennzeichneten Positionen sind durch Signalüberlagerungen nicht eindeutig zu unterscheiden. Daher werden sie ins Bindungsepitop nicht mit eingeschlossen. Zusammen ergeben sie einen prozentualen STD-Faktor von 56 %.

Aus der Abbildung 5.33 geht eindeutig hervor, dass sich das Bindungsepitop des Trifluormethylketons B 10682871 mit denaturierter Lipase von dem Bindungsepitop mit nicht denaturierter Lipase (Abb. 5.31) unterscheidet. Die deutlichste Veränderung zeigt die Position 14. Für die nicht denaturierte Lipase zeigt das Trifluormethylketon lediglich einen STD-Faktor von 9 %, während dieser Inhibitor für die denaturierte Lipase einen Faktor von 69 % zeigt. So wurde nachgewiesen, dass das Bindungsepitop von der porcinen Pankreaslipase mit dem Inhibitor nicht ausschließlich auf dem durch d_6 -DMSO denaturierten Lipaseanteil beruht, sondern auch durch die nicht denaturierte Lipase entsteht. Es kann also angenommen werden, dass das Bindungsepitop von beiden Lipasen zusammen entsteht. Ansonsten wären die Ergebnisse zu der denaturierten und nicht denaturierten Lipase identisch. Als Grund dafür, dass der Inhibitor auch an die denaturierte Lipase bindet, kann angeführt werden, dass die Lipase nicht mehr im aktiven Zentrum der denaturierten Lipase bindet, sondern eine andere Lipasebindungstelle zeigt. Auch dafür ist ein Sättigungstransfer messbar. Es ist auch denkbar, dass das aktive Zentrum nicht vollständig durch die Denaturierung zerstört wurde.

1H-STD-NMR-Experimente zum Trifluormethylketon B 10646964

Zum Trifluormethylketon B 10646964 wurden in Kapitel 5.2 keine kinetischen Daten ermittelt. Aber es kann davon ausgegangen werden, dass auch dieses Keton eine reversible Bindung an das aktive Zentrum der porcinen Pankreaslipase zeigt, da dieses Keton und das Trifluormethylketon B 10682871 dieselbe Grundstruktur zeigen und damit ein nahezu identisches Bindungsverhalten zu erwarten ist.

Mittels verschiedener NMR-Experimente konnten die NMR-Signale der Struktur des Inhibitors eindeutig zugeordnet werden (Kap. 5.3.2). Die Messbedingungen für das STD-Spektrum und das Referenzspektrum waren identisch zum Trifluormethylketon B 10682871.

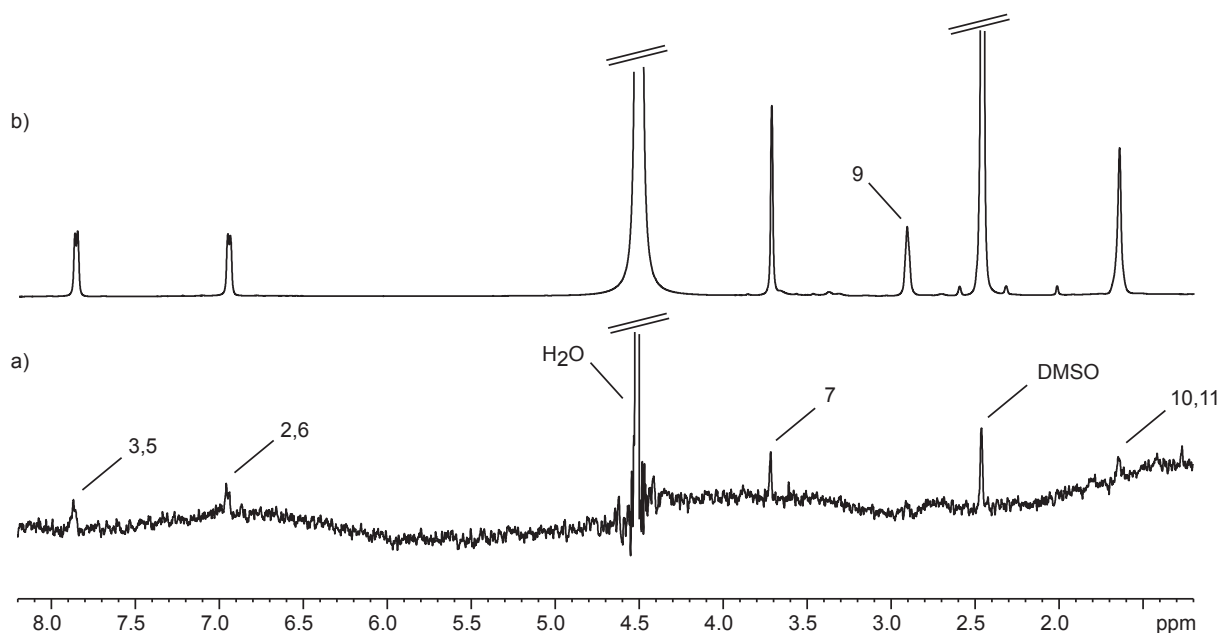


Abb. 5.34 Vergleich eines STD-NMR-Spektrums (a) von porciner Pankreaslipase mit dem Lipaseinhibitor B 10646964 mit einem ^1H -NMR-Spektrum (b) in 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O bei 12 °C und 500 MHz. Das Protein wurde für 2 sec bei -2 ppm für das *on-resonance* und bei -20 ppm für das *off-resonance* Spektrum gesättigt.

Da es sich um eine simplere Molekülstruktur im Bereich des *para*-ständigen Substituenten handelt, kommt es nicht zu einer ausgeprägten Signalüberlagerung wie für den Hemmstoff B 10682871 (Abb. 5.34). Die einzige erkennbare Überlagerung liegt bei 1,64 ppm und umfasst die Protonen der Positionen 10 und 11. Aus dem STD-Spektrum geht eindeutig hervor, dass der Sättigungstransfer durch die Pankreaslipase auf alle Protonen des Inhibitors übergeht. Es gibt nur eine

Ausnahme, nämlich die Position 9. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass auch diese Protonen durch die Lipase gesättigt werden. Denn im Vergleich zum Trifluormethylketon B 10682871, welches an dieser Position einen Sättigungstransfer erhält, kann für diese Position ein Sättigungstransfer vermutet werden. Das Aromatensignal bei 6,95 ppm (Pos. 2) erfährt wiederum den stärksten Sättigungstransfer durch die porcine Pankreaslipase. Dieses Signal dient als Referenzsignal zur Beurteilung der anderen Signale und wird auf 100 % gesetzt. Die Protonen des Aromaten stehen mit dem Protein im engsten Kontakt. In engerem Kontakt mit dem Protein stehen auch die Protonen der Positionen 7 (3,72 ppm), 10 und 11 (beide 1,64 ppm), wobei der Sättigungstransfer auf diese Protonen wesentlich schwächer ausfällt (Abb. 5.35). Die Position 7 erfährt einen Sättigungstransfer von 56 %, die Positionen 10 und 11 erhalten einen Transfer von 39 %. Daraus kann gefolgert werden, dass die Substanz B 10646964 an die Lipase bindet.

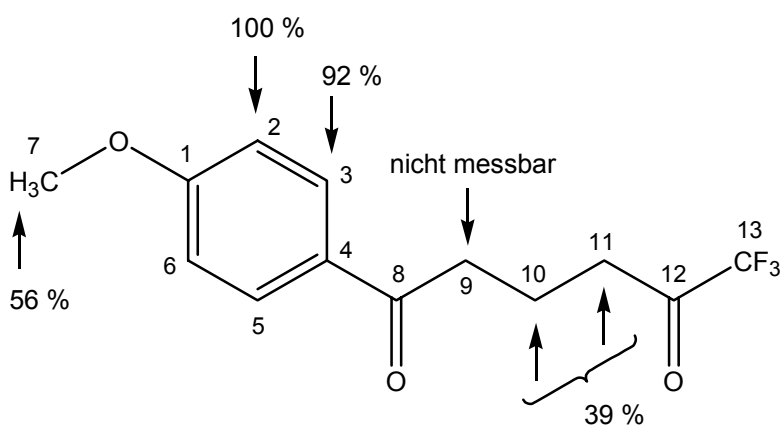


Abb. 5.35 Darstellung des Bindungsepitops des Trifluormethylketons B 10646964 in Gegenwart von porciner Pankreaslipase. Es ist eindeutig zu erkennen, dass wiederum die Aromatenprotonen den stärksten Sättigungstransfer durch die Lipase erhalten. Für die anderen Protonen ist ein wesentlich schwächerer Transfer messbar. Die Protonen der Position 9 erfahren keinen messbaren Transfer.

Dieses Bindungsepitop und das Epitop zum Trifluormethylketon B 10682871 sind nahezu identisch. Den stärksten Sättigungstransfer zeigen in beiden Fällen die Protonen des aromatischen Rings. Die Protonen der anderen Positionen werden wesentlich schwächer durch die Lipase angeregt. Dadurch ist nachgewiesen, dass die Protonen des aromatischen Rings den engsten Kontakt zum aktiven Zentrum besitzen. Es konnte aber nicht gezeigt werden, wie sich die Bindung ausbildet. Auch

ist unklar, weshalb die Methylengruppe der Position 9 im Trifluormethylketon B 10646964 keinen Sättigungstransfer erfährt, während bei dem Trifluormethylketon B 10682871 ein deutlicher Sättigungstransfer an dieser Stelle messbar ist.

¹H-STD-NMR-Experimente zu den Trifluormethylketonen mit veränderter Grundstruktur

In diesem Abschnitt werden die STD-NMR-Spektren und die daraus resultierenden Bindungsepitope zu den drei Trifluormethylketonen, bei denen die Grundstruktur verändert wurde, diskutiert. Ein besonderes Augenmerk gilt dabei der Rolle des aromatischen Ringes und der aromatenständigen Carbonylgruppe bei der Bindung der Trifluormethylketone an die porcine Pankreaslipase. Die chemischen Verschiebungen dieser Strukturen wurden bereits in Kapitel 5.3.2.7 aufgezeigt.

Als erstes Molekül mit abgewandelter Grundstruktur wird auf die Verbindung B 10551089 eingegangen, bei der die α -ständige Carbonylgruppe des Aromaten durch eine CH_2 -Gruppe ersetzt wurde. Dieses Trifluormethylketon ergibt folgendes Bindungsepitop für die Bindung an die porcine Pankreaslipase (Abb. 5.36). Als Referenzsignal diente wiederum das Signal der Position 2, welches zur Beurteilung der anderen Signale auf 100 % gesetzt wurde (im Anhang Abb. 8.5).

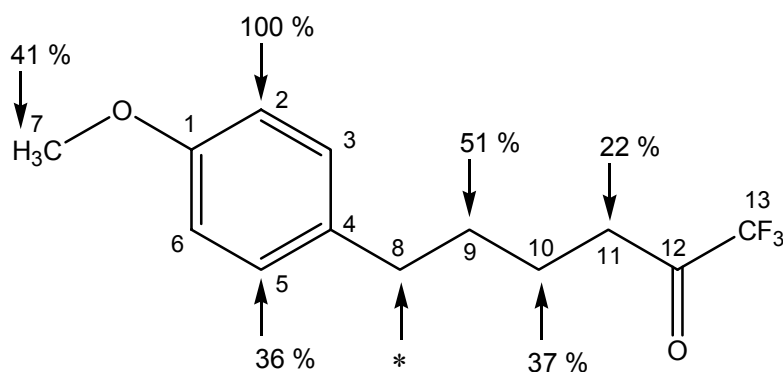


Abb. 5.36 Bindungsepitop des Trifluormethylketons B 10551089 mit abgewandelter Grundstruktur. Die α -ständige Carbonylgruppe wurde durch eine CH_2 -Gruppe ersetzt. Für die Position 2 konnte wiederum der stärkste Sättigungstransfer ermittelt werden. Ein prozentualer STD-Faktor für die mit * gekennzeichneten Position war nicht zu bestimmen, da das STD-Signal zum Teil unter dem d_6 -DMSO-Signal lag.

Das Bindungsepitop zeigt, dass die α -ständige Carbonylgruppe zum Aromaten nicht zwingend für die Bindung des Hemmstoffs an das aktive Zentrum der porcinen Pankreaslipase nötig ist, die Bindung des Aromaten aber deutlich verbessert wird.

Auffällig für dieses Bindungsepitop ist, dass nicht mehr die Protonen beider Aromatenpositionen einen starken Sättigungstransfer durch die Lipase erfahren, sondern dass der Transfer auf die zur fehlenden Carbonylgruppe vicinal stehenden Protonen sehr stark abgenommen hat (Pos. 3). Sie zeigen nur noch einen STD-Faktor von 36 %. Die Protonen des vergleichbaren Epitops zur Substanz B 10646964 hingegen zeigen an dieser Position einen Faktor von 92 %. Aufgrund des Bindungsmodells (Kap. 5.4) zur Verbindung B 10646964 ist bekannt, dass die Hydroxylgruppe des Serins 152 im aktiven Zentrum durch eine Wasserstoffbrückenbindung an die Carbonylgruppe bindet. Ebenso bildet das Histidin 263 eine Wasserstoffbrückenbindung zu dieser Carbonylgruppe aus.

Als weiteres Trifluormethylketon mit abgewandelter Grundstruktur kam die Substanz B 10539242 zum Einsatz. Bei dieser Substanz wurde die α -ständige Carbonylgruppe zum Aromaten durch eine Etherfunktion ersetzt. Weiterhin wurde die Methoxygruppe an Position 1 des Aromaten durch eine Methylgruppe ausgetauscht.

Aus dem ^1H -STD-NMR-Spektrum (im Anhang Abb. 8.6) wird ersichtlich, dass das Aromatensignal bei 7,13 ppm (Pos. 3) den stärksten Sättigungstransfer durch die porcine Pankreaslipase erfährt. Die Protonen des Aromaten zeigen den stärksten Kontakt zum Enzym. Das Signal bei 7,13 ppm wird als Referenzsignal zur Beurteilung der anderen Signale verwendet und wird auf 100 % gesetzt. Die anderen Protonen erfahren durch die Lipase einen schwächeren Sättigungstransfer (Abb. 5.37). Die Methylgruppe der Position 7 zeigt einen Transfer von 67 %, die CH_2 -Gruppe der Position 9 erhält einen Transfer von 44 % und die CH_2 -Gruppen der Positionen 9 - 11 erfahren zusammen einen Transfer von ungefähr 40 %. Die Positionen 9 - 11 zeigen eine Signalüberlagerung.

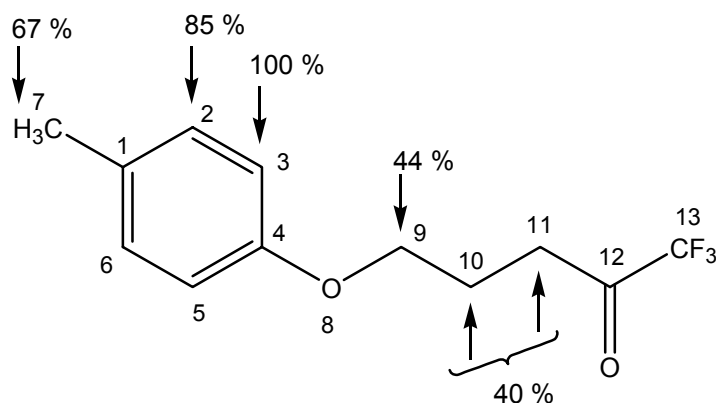


Abb. 5.37 *Group epitope mapping* des Trifluormethylketons B 10539242 an die porcine Pankreaslipase. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Substanz trotz abgewandelter Grundstruktur an die Lipase bindet. Der aromatische Ring erfährt wiederum den stärksten Sättigungstransfer.

Aus dem Bindungsepitop geht hervor, dass die Substanz, obwohl die Grundstruktur verändert wurde, an das Enzym bindet. Im Vergleich zu der vorherigen Substanz B 10551089 zeigen bei der Verbindung B 10539242 die Protonen beider aromatischen Positionen wieder einen starken Sättigungstransfer durch die Lipase. Auffällig ist, dass die Stärke des Transfers gegenüber der Substanz mit unveränderter Grundstruktur (B 10646964) vertauscht ist. Das heißt, dass die Position 3 einen stärkeren Sättigungstransfer erhält als die Position 2. Ein Grund dafür kann sein, dass die Lage der Etherfunktion für die Bindung eine Rolle spielt. In diesem Fall sitzt die Etherfunktion geminal zur Position 4 und nicht mehr wie bei dem Trifluormethylketon B 10646964 geminal zur Position 1 des Aromaten.

Die letzte Substanz mit veränderter Grundstruktur ist das Trifluormethylketon B 10694628. Bei dieser Substanz fehlt der aromatische Ring. Aus dem STD-Spektrum ist zu erkennen, dass die endständige Methylgruppe den stärksten Sättigungstransfer durch die porcine Pankreaslipase erfährt (im Anhang Abb. 8.7). Dieses Signal wird als Referenzsignal verwendet und auf 100 % gesetzt. Das Bindungsepitop zeigt, dass die CH_2 -Gruppen zwischen den beiden Carbonylfunktionen durch die Lipase eine Sättigung von 40 % bis 50 % erhalten (Abb. 5.38).

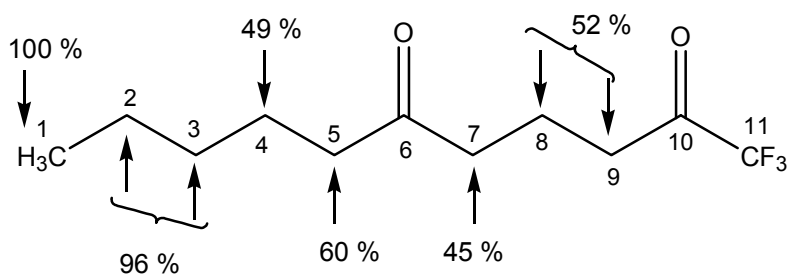


Abb. 5.38 Bindungsepitop der Substanz B 10694628 an die porcine Pankreaslipase. Zu erkennen ist, dass die CH₂-Kette zwischen den Carbonylgruppen wiederum einen Sättigungstransfer von 40 – 50 %, erfährt, wie bei den anderen Verbindungen auch.

Allerdings liegt an beiden Carbonylgruppen eine negative Partialladung für den Sauerstoff vor. Durch die negative Partialladung kann die Bindung an die Lipase durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung durch die OH-Gruppe des Serins 152 erklärt werden. Welche Carbonylgruppe diese Bindung ausbildet, kann anhand des STD-Spektrums nicht festgestellt werden. Eine Aussage über den Bindungsmechanismus ist somit nicht möglich. Es ist nur zu erkennen, dass die Substanz auch ohne aromatische Moleküleinheit an die porcine Pankreaslipase bindet.

5.3.3.2 Ergebniszusammenfassung des *group epitope mapping* von porciner Pankreaslipase an Trifluormethylketone

Mit Hilfe des ¹H-STD-NMR-Verfahrens konnte nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Trifluormethylketone an die porcine Pankreaslipase binden. Festzuhalten ist, dass keine Aussage möglich ist, welches Trifluormethylketon am besten bindet. Die prozentualen Werte der Bindungsepitope beziehen sich nur auf die Positionen der jeweiligen Substanzen; es kann mittels dieser Werte kein Vergleich zwischen den einzelnen Verbindungen gezogen werden. Für einen Bindungsvergleich zwischen den verschiedenen Trifluormethylketonen ist eine kompetitive Titration mit den jeweiligen Substanzen notwendig. Über Signalgrößenvergleich ist dann eine Aussage der Bindungsstärke möglich. Eine Titration mit den Trifluormethylketonen scheitert daran, dass in Anwesenheit von zwei Verbindungen in einer Lösung die Substanzen offenbar Komplexe bilden und daher unmittelbar im STD-Spektrum angeregt werden. Damit bestand keine Möglichkeit zur Messung von Bindungssignalen.

Es wurde dargestellt, dass die Trifluormethylketone mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bindungsstelle im aktiven Zentrum wie der Lipaseinhibitor Orlistat besitzen. Beinhaltet die Trifluormethylketonstruktur eine Carbonylgruppe, kann die Bindung an die OH-Gruppe des Serin 152 im aktiven Zentrum durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Trifluormethylketone an die aktive porcine Pankreaslipase und an den durch DMSO denaturierten Anteil der Lipase erfolgt und nicht ausschließlich an den durch DMSO denaturierten Anteil.

5.4 *Molecular Modeling*

Ziel dieser Versuche war es, die durch *group epitope mapping* erhaltenen Bindungsverhältnisse zu überprüfen. Als Proteinstruktur für die Lipase wurde eine Kristallstruktur mit Colipase gewählt, so dass die Lipase mit geöffnetem Lid vorliegt. In den nachfolgenden Abbildungen ist jeweils die Lipasebindungstasche mit einer Größe von 12 Å um das aktive Zentrum zu sehen.

5.4.1 Trifluormethylketon B 10646964

Mit Hilfe des Bindungsepitops für diese Substanz wurde gezeigt, dass die Protonen des Phenylrings am stärksten von der Pankreaslipase gesättigt werden und damit den stärksten Sättigungstransfer erfahren. Im Bindungsmodell in der Abbildung 5.39 ist zu sehen, dass der Ring in engem Kontakt zum Phenylalanin 77 und Phenylalanin 215 steht. Es konnte eine Distanz zwischen dem Phenylring des Inhibitors und den Aromaten der Phenylalanine von 5 - 6 Å gemessen werden. Die Bindung kann als π -stacking Wechselwirkung angesehen werden. Die Nähe der Aromaten bestätigt das Ergebnis des Bindungsepitops.

Des Weiteren geht aus Abbildung 5.39 hervor, dass die ringständige Carbonylgruppe mit der Hydroxylgruppe des Serins 152 des aktiven Zentrums eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet. Zudem scheint sich eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen der ringständigen Carbonylgruppe und dem Proton des Imidazolrings des Histidins 263 auszubilden, welche die Bindung stabilisiert. Das Histidin 263 bildet zusammen mit dem Serin 152 und dem Aspartat 176 die katalytische Triade. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass der Trifluormethylketonmolekülteil aus der Bindungstasche hinausragt und somit kaum Kontakt zur Lipase besitzt. Die Lage der Trifluormethyldiketonkette lässt sich anhand

des Bindungsepitops (Abb. 5.35) nachvollziehen, denn das Epitop zeigt für die Kette nur einen Sättigungstransfer von 39 %. Für die Protonen der Methoxygruppe zeigt das Bindungsepitop eine Sättigung von 56 %. Die Bindungsstudien zeigen, dass diese Gruppe in einem hydrophoben Teil der Bindungstasche liegt, wodurch die Bindung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen entsteht.

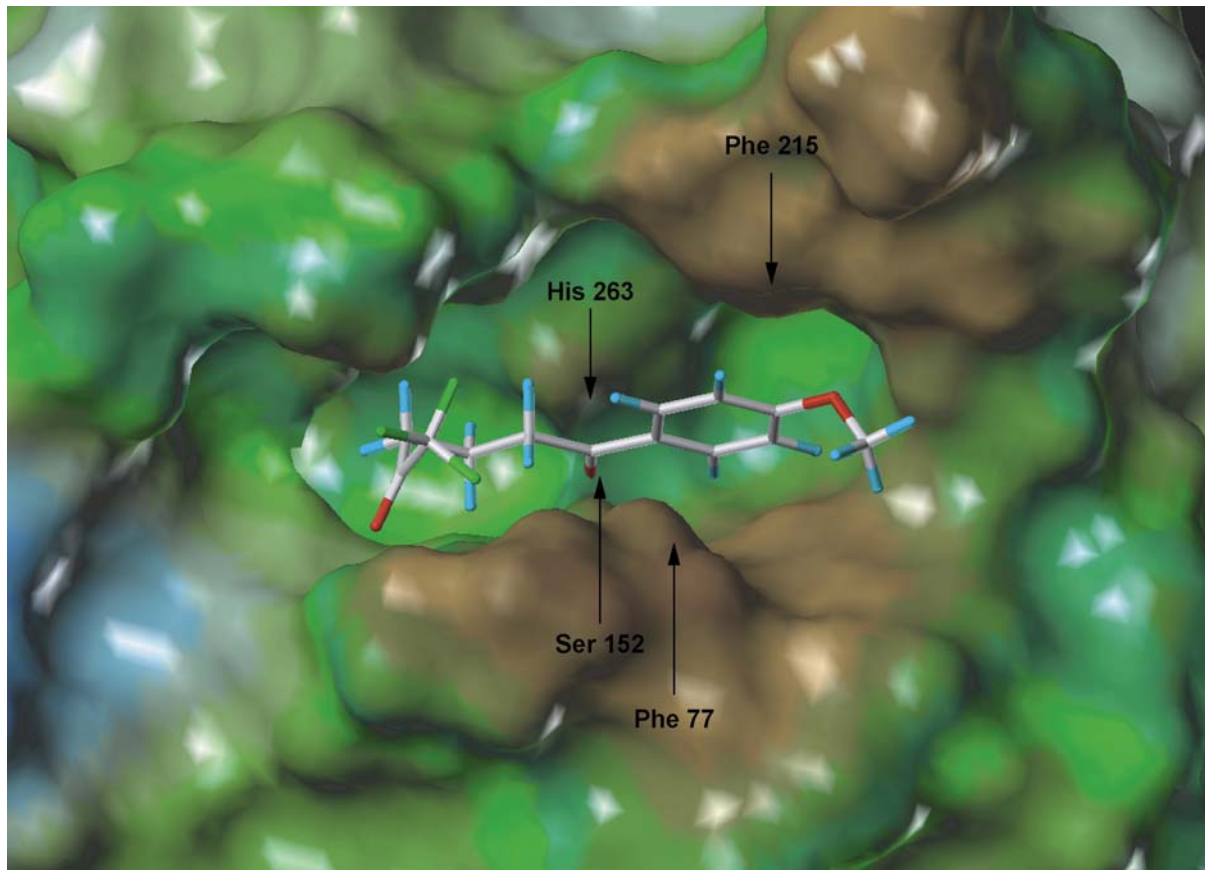


Abb. 5.39 Modelldarstellung der Lipasebindungsstasche mit dem Trifluormethylketon B 10646964. Hydrophobe Bereiche sind braun, hydrophile Bereiche der Pankreaslipase sind grün dargestellt. Markiert sind die beiden Aminosäuren Serin (Ser) 152 und Histidin (His) 263 der katalytischen Triade, die mit der ringständigen Carbonylgruppe Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Außerdem sind das Phenylalanin (Phe) 77 und das Phenylalanin 215 gekennzeichnet. (Abbildung nach persönlicher Mitteilung von M. Gramer, Solvay Pharmaceuticals).

Anhand dieses Ergebnisses lässt sich das Bindungsepitop nachvollziehen (Abb. 5.35). Im Vergleich zu den Serinproteasen, zu denen u. a. das α -Chymotrypsin und die Acetylcholinesterase gehören, bildet die porcine Pankreaslipase eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der α -ständig zum

Aromaten stehenden Carbonylgruppe und der Hydroxylgruppe des Serins 152 im aktiven Zentrum aus. Die Serinproteasen hingegen, die durch Peptidylfluormethylketone inhibiert werden, bilden zwischen der Hydroxylgruppe des Serins 195 und der Carbonylgruppe neben dem Di- bzw. Trifluormethylketon ein Hemiketal aus (Liang und Abeles, 1987; Gelb *et al.*, 1985). Diese Carbonylgruppe scheint für die Bindung der Trifluormethylketone als Lipaseinhibitoren keine große Bedeutung zu haben.

5.4.2 Trifluormethylketon B 10682871

Auch für diesen Lipaseinhibitor soll das Ergebnis des *group epitope mapping* (Abb. 5.31) mit dem Resultat des *Molecular Modeling* verglichen werden. Ebenso wie der Hemmstoff B 10646964 zeigt der Aromat dieses Inhibitors den stärksten Sättigungstransfer im STD-NMR-Spektrum. Die Abbildung 5.40 belegt dieses Ergebnis, da der Hemmstoff in nahezu identischer Weise in der Lipasebindungstasche wie die Substanz B 10646964 liegt. Auffällig bei diesem Liganden ist, dass der Cyclohexylring nur einen geringen Kontakt zu einem hydrophoben Teil der Lipase zeigt. Er ragt aus der Bindungstasche heraus. Trotzdem scheint der hydrophobe Molekülteil die Hydrophobizität des Aromaten zu verstärken, da die inhibitorische Wirkung für diesen Hemmstoff mit einem IC_{50} -Wert von $\sim 31 \mu\text{M}$ für diese Substanzklasse am höchsten ist. Die Daten für die anderen Inhibitoren befinden sich in einer Datenbank der Firma Solvay Pharmaceuticals, Hannover und können hier nicht gezeigt.

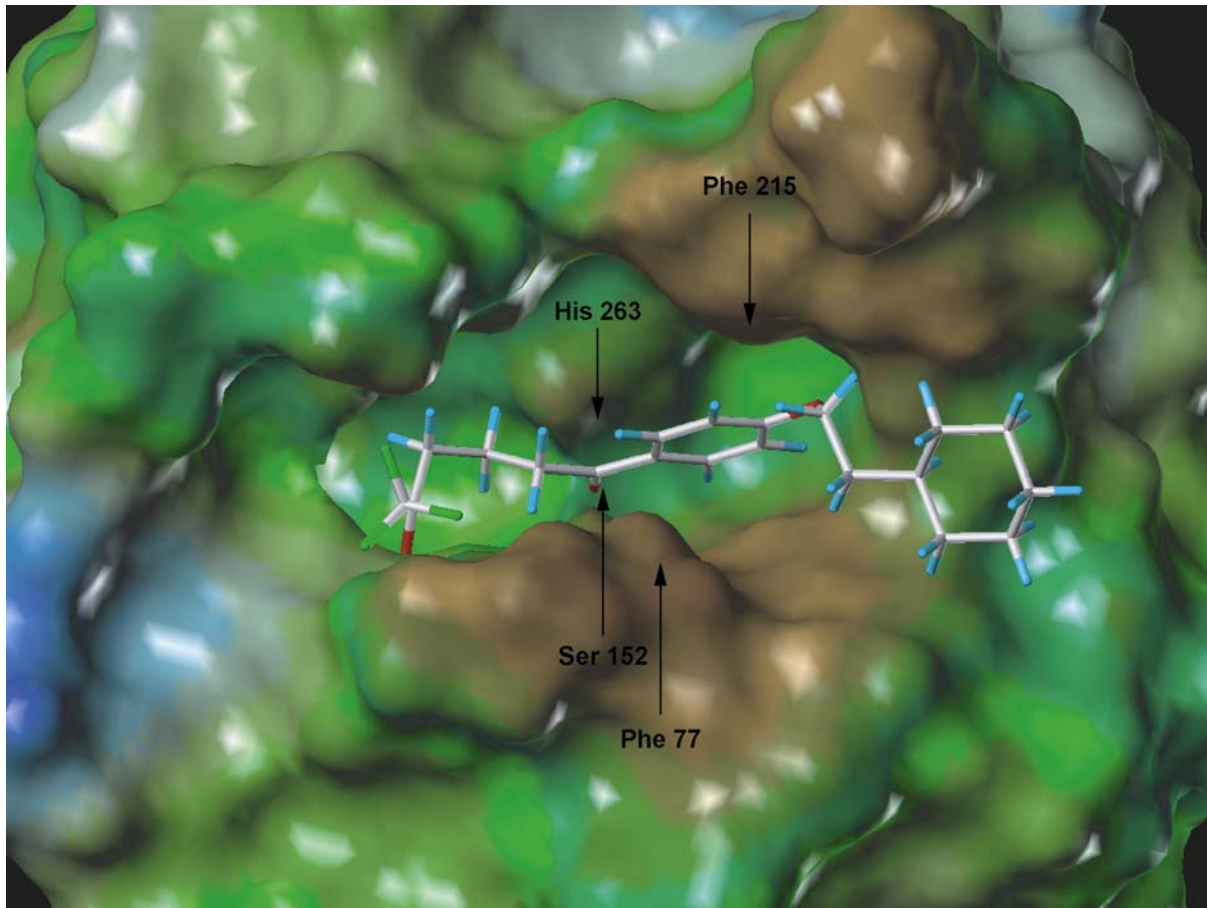


Abb. 5.40 Bindungsmodell des Trifluormethylketons B 10682871 an das aktive Zentrum der porcinen Pankreaslipase. Dargestellt sind zwei Aminosäuren der katalytischen Triade, und zwar das Serin (Ser) 152 und das Histidin (His) 263, die jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zu der aromatenständigen Carbonylgruppe ausbauen. Weiterhin sind das Phenylalanin (Phe) 77 und das Phenylalanin 215 gekennzeichnet (Abbildung nach persönlicher Mitteilung von M. Gramer, Solvay Pharmaceuticals).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Bindungsmodelle der porcinen Pankreaslipase für beide Inhibitoren die Ergebnisse der Bindungsepitope belegen.

5.5 Ergebnisdiskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung von Trifluormethylketonen an humane und porcine Pankreaslipase zu charakterisieren, um diese Verbindungsklasse hinsichtlich ihrer Eignung als potentielle Pankreaslipaseinhibitoren zu bewerten. Ausgangspunkt der Überlegungen war die Inhibition von Serinproteasen durch Peptidyl-fluoromethylketone. Das α -Chymotrypsin und die Acetylcholinesterase, Vertreter der Serinproteasen, bilden mit der Hydroxylgruppe des Serins 195 im aktiven Zentrum und dem Inhibitor ein Hemiketal aus. Bei dieser Bindung wirkt die α -ständige Carbonylgruppe zum Di- bzw. Trifluormethylketon als elektrophile Gruppe (Gelb *et al.*, 1985; Liang und Abeles, 1987). In der Literatur werden auch noch weitere Beispiele für Serinproteasen genannt, die alle durch Ausbildung eines Hemiketals durch Peptidyl-fluoromethylketone inhibiert werden. Dazu zählen die Inhibition der humanen Leukozytenelastase (Brown *et al.*, 1994; Damewood *et al.*, 1994) und die Inhibition der Protease des humanen Cytomegalie-Virus (Ogilvie *et al.*, 1997). Bei allen Beispielen handelt es sich um reversibel bindende Inhibitoren.

Die Pankreaslipase als Vertreter der Serinesterasen hat ein vergleichbares aktives Zentrum wie die Serinproteasen. Sowohl die Serinesterasen als auch die Serinproteasen bilden eine katalytische Triade aus, die aus einem Serin, Histidin und Aspartat besteht. Außerdem zeigen beide Enzymklassen eine Oxyanion-Höhle, die aus einem Glycin und dem Serin der katalytischen Triade besteht. Aufgrund der Strukturverwandtschaft kann angenommen werden, dass die Pankreaslipase in derselben Weise durch Trifluormethylketone inhibiert werden wie die Serinproteasen.

In dieser Arbeit sollte weiterhin geklärt werden, ob die STD-NMR-Spektroskopie und das *Molecular Modeling* als Methoden zur Entwicklung eines geeigneten Hemmstoffes zur Lipaseinhibition angewendet werden können und ob mit Hilfe dieser Methoden Bindungen zwischen den Trifluormethylketonen und der porcinen Pankreaslipase charakterisiert werden können.

Zunächst wurden die ^1H -NMR Spektren der Liganden mit Hilfe verschiedenen NMR-spektroskopischer Experimente zugeordnet, da dies die Voraussetzung für die Interpretation der STD-NMR-Experimente darstellt.

Im ^1H -NMR-Spektrum der Substanz B 10646964 waren die CH_2 -Signale zwischen 1,5 und 2,0 ppm überlagert, so dass zusätzliche NMR-Experimente zur Zuordnung herangezogen werden mussten. Zunächst wurde die Signaltrennung durch Temperaturänderung versucht, da durch die Änderung der Messtemperatur unter Umständen einzelne Signale relativ zu anderen verschoben werden können. Als Temperaturintervall wurden Temperaturen zwischen 12 und 57 °C gewählt. Allerdings führte die Änderung nicht zu einer Verschiebung der Signale, so dass als weitere Methode die Verwendung von Verschiebungsreagenzien zum Einsatz kam. Doch auch diese Methode führte nicht zu einer Trennung der CH_2 -Signale im Bereich der chemischen Verschiebungen zwischen 1,5 und 2,0 ppm. Gründe hierfür können entweder ungünstige Verschiebungsreagenzien, Konzentrationsverhältnisse oder mangelhafte Wechselwirkungen sein.

Als dritte Möglichkeit zur Trennung der überlagerten Signale wurde in dieser Arbeit ein geändertes Lösungsmittelverhältnis gewählt. Neben einer Hemmstoffprobe in reinem d_6 -DMSO kamen auch D_2O - d_6 -DMSO-Mischungen von 10 – 60 % D_2O -Anteil zum Einsatz. Aber mit Hilfe dieser Methode konnten die Signale ebenfalls nicht getrennt werden.

Durch die Aufnahme eines ^{13}C -NMR-Spektrums konnte gezeigt werden, dass keine Signalüberlagerung der ^{13}C -Kerne vorlag. So konnte davon ausgegangen werden, dass sich die CH_2 -Protonen in einem HSQC-Experiment auch nicht überlagern. Durch den Vergleich von ^{13}C -NMR-Spektrum mit Protonenentkopplung und ohne Protonenentkopplung konnten 5 Kohlenstoffpositionen zugeordnet werden (Abb. 4.16).

Für die Aufklärung der chemischen Verschiebungen der anderen Kohlenstoffkerne und der Protonen wurden HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen. Wie schon oben erwähnt, war es möglich, die CH_2 -Protonen auf diesem Wege zu trennen, da die dazugehörigen ^{13}C -Kerne unterschiedliche chemische Verschiebungen zeigten. Da aufgrund der HSQC- und HMBC-Spektren noch immer keine vollständige Zuordnung möglich war, wurden deshalb selektive 1D INADEQUATE-Experimente und ein 2D INADEQUATE-Experiment durchgeführt.

Durch die INADEQUATE-Experimente war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, die eindeutige Zuordnung der Signale im ^1H -NMR Spektrum zu ermitteln und damit eine

Voraussetzung für die Durchführung der STD-NMR-Experimente zu schaffen. Durch selektives Anregen einzelner ^{13}C -Kerne im selektiven INADEQUATE-Experiment konnte der jeweilige direkte Kohlenstoffkopplungspartner ermittelt werden. Unterstützt wurde die Zuordnung der Kohlenstoffkerne durch das 2D INADEQUATE-Experiment, in dem direkt die Verknüpfung des Kohlenstoffgerüsts festgestellt wurde.

INADEQUATE-Experimente zeigen zwei große Nachteile. Zum einen benötigen sie eine hohe Substanzmenge im molaren Bereich, zum anderen ist der Zeitaufwand hoch, da eine Messung mindestens 16 Stunden in Anspruch nimmt. Diese Gründe sind ursächlich dafür, dass diese Messungen nicht zu den Routineverfahren in der NMR-Spektroskopie gezählt werden. Gerade für das Substanzscreening aus industrieller Sicht ist diese Methode ungeeignet, da in der Regel nicht ausreichend Substanz für eine Probe mit einer Konzentration im molaren Bereich vorliegt. Auch die lange Messzeit ist für die Industrie häufig unrentabel.

Die Ergebnisse der verschiedenen NMR-Verfahren zeigen auf, welchen Problemen die Signalzuordnung der Trifluormethylketone unterworfen war. Es wurde dargelegt, welche Schwierigkeiten, aber auch welche Vor- und Nachteile die einzelnen Messverfahren mit sich bringen. Der hohe Zeitaufwand und der hohe Substanzverbrauch für die INADEQUATE-Experimente zählen zu den Nachteilen dieser Experimente. Andererseits sollte die Signalzuordnung grundsätzlich eindeutig geklärt sein, um nachfolgende Experimente richtig beurteilen zu können.

Eine bessere, schnellere und damit kostengünstigere Alternative wäre die Aufnahme von ^{19}F - ^{13}C HSQC- und ^{19}F - ^{13}C HMBC-Spektren, die allerdings nur dann möglich ist, wenn das Spektrometer u. a. mit einem dafür geeigneten Probenkopf, der gleichzeitig ^{19}F - und ^{13}C -Kerne messen kann, ausgestattet ist. Das Spektrometer für die Messungen der Experimente dieser Arbeit verfügte nicht über einen solchen Probenkopf.

Problematisch für die STD-Messungen war die Unlöslichkeit der Trifluormethylketone in D_2O . Allerdings benötigt die porcine Pankreaslipase Wasser für ihre Aktivität. Daher musste ein Lösungsmittelgemisch gefunden werden, in dem die Trifluormethylketone löslich waren und die porcine Pankreaslipase zugleich aktiv war. Als ideales Lösungsmittelgemisch stellte sich eine Mischung aus 50 % DMSO und 50 % Wasser heraus. Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie wurde eine Mischungsreihe mit

verschiedenen d_6 -DMSO- D_2O -Verhältnissen der Inhibitoren B 10646964 und B 10682871 gemessen. Als Resultat ergaben die Spektren, dass beide Substanzen bei dem Mischungsverhältnis von 1 : 1 löslich waren.

Mit Hilfe des *p*-Nitrophenylpalmitatassays wurde ermittelt, wie stark die porcine Pankreaslipase durch einen 50%igen Anteil an DMSO in Abhängigkeit von der Präinkubationstemperatur (4 oder 37 °C) und der Präinkubationszeit (10 oder 240 min) an Aktivität verliert. Der Verlust liegt zwischen 20 und 25 %. Ausnahme war die Messtemperatur von 37 °C über eine Präinkubationsdauer von 240 Minuten. Unter diesen Bedingungen verlor die Lipase 70 % ihrer Aktivität, wodurch gezeigt wurde, dass neben dem DMSO auch die Temperatur und die Präinkubationszeit eine Rolle spielten.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Denaturierung der porcinen Pankreaslipase durch das DMSO sofort einsetzt und mit Ausnahme der Präinkubation von 240 Minuten bei 37 °C über wenigstens 240 Minuten konstant bleibt. Ein anderer Mechanismus zur Erklärung des Aktivitätsverlusts als die Denaturierung ist eher unwahrscheinlich, da die Denaturierung von Enzymen vorrangig durch einige Lösungsmittel und durch erhöhte Temperatur erfolgt. Je niedriger die Temperatur ist, desto höher ist in der Regel die Stabilität der Enzyme.

Als Messtemperatur für die STD-NMR-Messungen wurde aufgrund dieser Ergebnisse eine Messtemperatur von 12 °C ausgewählt. Eine niedrigere Messtemperatur war nicht möglich, da die Trifluormethylketone scheinbar zu einer Gefrierpunkterhöhung führten. Anders als bei anderen, vor allem bei mikrobiellen Lipasen, wird die Aktivität der Pankreaslipase nicht durch die Anwesenheit von DMSO erhöht (Tsuzuki *et al.*, 2001). Mittels 1H -NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Pankreaslipase bei 12 °C nach 4 Stunden Messzeit, die für die STD-NMR-Spektren benötigt wurde, noch aktiv war. Nachdem die STD-Messungen beendet waren, wurde die Lipaseaktivität durch Zugabe des Lipasesubstrats Tributyrin in die Enzym-Inhibitorlösung nachgewiesen. Über 6 Stunden wurden 1H -NMR-Spektren aufgenommen. Nach dieser Zeit war noch immer Substratumsatz erkennbar, so dass die Lipaseaktivität sogar über 10 Stunden belegt werden konnte.

Eine weitere Voraussetzung für die Durchführung der STD-NMR-Experimente ist die reversible Inhibition der Pankreaslipase durch die Trifluormethylketone, da ansonsten die Verweilzeit des Liganden an das Enzym zu lang wäre und keine STD-Effekte

messbar wären. Mit Hilfe des *p*-Nitrophenylpalmitatassays konnte ermittelt werden, dass es sich bei den Trifluormethylketonen um reversibel bindende Inhibitoren an die porcine Pankreaslipase handelt. Allerdings konnte durch diesen Versuch nicht ermittelt werden, ob die Trifluormethylketone im aktiven Zentrum der Lipase binden. Anhand eines STD-NMR-Spektrums in Gegenwart von Orlistat, einem irreversibel bindenden Lipaseinhibitor, konnte festgestellt werden, dass die Trifluormethylketone im aktiven Zentrum der Lipase binden, da nur noch wesentlich geringere STD-Effekte zu messen waren als ohne Orlistat. Von dem Inhibitor Orlistat ist bekannt, dass er durch Ausbildung einer irreversiblen kovalenten Bindung an das Serin 152 des aktiven Zentrums bindet und so einen langlebigen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet (Hadvàry *et al.*, 1991; Lüthi-Peng *et al.*, 1992). Daher konnte nachgewiesen werden, dass die Trifluormethylketone im aktiven Zentrum der Pankreaslipase binden.

Mit Hilfe des *p*-Nitrophenylpalmitatassays wurde im Rahmen dieser Arbeit das inhibitorische Potential des Trifluormethylketons B 10682871 und des Orlistats gemessen. Für das Trifluormethylketon konnte ein IC_{50} -Wert von $\sim 31 \mu\text{M}$ und für das Orlistat von $\sim 14 \text{nM}$ bestimmt werden. Anhand dieser Werte wird deutlich, dass das Orlistat ein wesentlich höheres inhibitorisches Potential als das Trifluormethylketon B 10682871 besitzt. Durch diese Werte konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass das Trifluormethylketon durch das Orlistat aus dem aktiven Zentrum verdrängt wird bzw. dass das Trifluormethylketon nicht binden kann, wenn das Orlistat bereits das aktive Zentrum besetzt hat. Außerdem ist es für das Trifluormethylketon offenbar unmöglich, dass Orlistat aus dem aktiven Zentrum zu verdrängen. Da es sich bei dem Orlistat um einen irreversibel bindenden Inhibitor handelt, ist dies auch zu erwarten. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Trifluormethylketone reversibel an die Pankreaslipase binden, liegt in der Durchführung der STD-NMR-Experimente an sich. Würde es sich um irreversibel bindende Hemmstoffe handeln, wären keine STD-Effekte messbar.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Präinkubationszeit, das heißt, dass die Kontaktzeit zwischen porciner Pankreaslipase und dem Inhibitor B 10682871 bzw. dem Inhibitor Orlistat in Abwesenheit von Substrat unterschiedliche Einflüsse zeigt. Für den Hemmstoff B 10682871 als Vertreter der Trifluormethylketone wurde nachgewiesen, dass es sich um einen reversibel bindenden Inhibitor im aktiven Zentrum der porcinen Pankreaslipase handelt. Der reversible

Hemmstoff bewirkt eine augenblickliche Verminderung der Enzymaktivität auf einen bestimmten konstanten Wert. Daher ist es für reversibel bindende Hemmstoffe typisch, dass die inhibitorische Wirkung durch eine Präinkubation mit dem Hemmstoff nicht verbessert werden kann. Wird das präinkubierte Gemisch im Assay eingesetzt, wird der Inhibitor durch das im Überschuss vorliegende Substrat teilweise verdrängt. Die Hemmwirkung ist dieselbe, wenn Substrat, Trifluormethylketon und Lipase von Beginn an aufeinander einwirken können. Das heißt, es findet eine Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum statt. Die Folge ist, dass das im Überschuss vorliegende Substrat einen Teil des Inhibitors von der gemeinsamen Bindungsstelle verdrängt. Eine Präinkubationstemperatur von 4 °C bzw. 37 °C hat dabei keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung. Die Lipase zeigt in beiden Fällen 50 % Restaktivität, wenn ~ 31 µM Trifluormethylketon B 10682871 vorliegen.

Bei der irreversiblen Inhibierung kommt es dagegen zu einer zeitlichen Änderung der Enzymaktivität, die durch einen exponentiellen Abfall der Hemmkurve über die Zeit gekennzeichnet ist. Der Grund dafür ist, dass der irreversibel bindende Hemmstoff zunächst einen reversiblen Assoziationskomplex EI bildet, der in einem irreversiblen Prozess in die inaktive EI_i-Form übergeht. Der irreversible Zustand muss sich also erst über einen Übergangskomplex einstellen. Dieser Vorgang der irreversiblen „Komplex“-Bildung ist eine mögliche Erklärung, warum das Orlistat schon nach einer Präinkubation von 10 Minuten mit der Pankreaslipase eine bessere Inhibition als ohne Präinkubation zeigt. Eine deutliche Änderung im IC₅₀-Wert ist zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass bei einer noch längeren Präinkubationszeit die Änderung des IC₅₀-wertes minimaler ist, da sich das Gleichgewicht bei einer Präinkubationszeit von 10 Minuten schon zugunsten des irreversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes verschoben hat. Als Resultat wird für Orlistat ohne Präinkubation ein IC₅₀-Wert von ~ 14 nM und mit Präinkubation von 10 Minuten ein IC₅₀-Wert von ~ 6 nM erhalten. Es ist also eindeutig zu erkennen, dass das Orlistat auch ohne Präinkubation schon eine inhibitorische Wirkung durch Bildung des reversiblen Assoziationskomplexes zeigt, die Hemmwirkung aber mit verstärkter Bildung des irreversiblen Inhibitionskomplexes deutlich zunimmt.

Die Voraussetzungen für die Durchführung der STD-NMR-Experimente waren somit nachweislich gegeben. Zum einen handelt es sich bei den Trifluormethylketonen um reversibel bindende Inhibitoren, zum anderen ist die Aktivität und damit auch die Stabilität der porcinen Pankreaslipase in einem Wasser-DMSO-Gemisch (Verhältnis 1 : 1) gegeben. Außerdem sind die Trifluormethylketone in diesem Lösungsmittelverhältnis löslich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels STD-NMR-Spektroskopie (Mayer und Meyer, 1999 und 2001) das Bindungsepitop verschiedener Trifluormethylketone, gebunden an die porcine Pankreaslipase, bestimmt werden. Als Ergebnis des *group epitope mapping* für die Trifluormethylketone B 10646964 und B 10682871 konnte ermittelt werden, dass jeweils der Phenylring den stärksten Sättigungstransfer durch die Pankreaslipase erfährt. Die CH₂-Gruppen der Trifluormethyldiketonkette und die Protonen des *para*-ständigen Substituenten werden wesentlich schwächer durch die Lipase angeregt. Diese Ergebnisse lassen sich mit Hilfe des Bindungsmodells aus dem *Molecular Modeling* bestätigen. In dem Modell ist eindeutig zu erkennen, dass der Phenylring des Trifluormethylketons in engem Kontakt (5 - 6 Å) zu den Phenylringen des Phenylalanins 77 und des Phenylalanins 215 steht. Für diese Bindung sind π -*stacking* Wechselwirkungen denkbar.

Aus dem Bindungsmodell geht weiterhin hervor, dass die aromatenständige Carbonylgruppe der Trifluormethylketone für die Bindung an die Hydroxylgruppe des Serins 152 im aktiven Zentrum durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung verantwortlich ist. Eine weitere Wasserstoffbrücke bildet sich zwischen derselben Carbonylgruppe und dem Wasserstoff des Imidazolrings des Histidins 263 aus. Mit Hilfe des Bindungsmodells konnte das durch STD-NMR-Experimente ermittelte *group epitope mapping* belegt werden, nämlich dass die Trifluormethylketone im aktiven Zentrum der Pankreaslipase binden. In Anwesenheit von Orlistat durchgeführte Titrations stellen die Vermutung auf, dass die Trifluormethylketone auch an das aktive Zentrum der porcinen Pankreaslipase binden.

Da aufgrund des DMSOs neben aktiver Lipase auch denaturierte Pankreaslipase anwesend war, musste geklärt werden, ob die Bindung der Trifluormethylketone an aktives oder denaturiertes Enzym erfolgte. Für diesen Versuch wurde die Lipase

gezielt durch Erhitzen denaturiert. Das durch STD-NMR ermittelte Bindungsepitop des Trifluormethylketons B 10682871 an die denaturierte Pankreaslipase unterschied sich eindeutig von dem Bindungsepitop mit aktiver Pankreaslipase. So konnte gezeigt werden, dass der Sättigungstransfer über den aktiven Lipaseanteil in der d_6 -DMSO -haltigen Probe erfolgte.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit geklärt werden, welchen Stellenwert der Aromat und die ringständige Carbonylgruppe für die Bindung der Trifluormethylketone an das aktive Zentrum einnehmen. Es wurden daher strukturähnliche Trifluormethylketone, welche eine Abwandlung in der Grundstruktur erfahren haben, im ^1H -STD-NMR-Experiment eingesetzt.

Aus dem *group epitope mapping* für die Verbindung B 10551089, bei der die ringständige Carbonylgruppe fehlt, geht hervor, dass die Aromatenprotonen, die vicinal zu der fehlenden Gruppe stehen, einen wesentlich schwächeren Sättigungstransfer durch die Lipase erfahren, während die anderen Aromatenprotonen weiterhin den stärksten Sättigungstransfer erhalten. Durch das Fehlen der Carbonylgruppe ist keine Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carbonylgruppe und dem Serin 152 und dem Histidin 263 des aktiven Zentrums mehr möglich.

Das Bindungsepitop für das Trifluormethylketon B 10539242, in dem statt der ringständigen Carbonylgruppe eine Etherfunktion eingebaut wurde, zeigt für die Protonen des Aromaten wieder den stärksten Sättigungstransfer durch die Lipase. Wie bei dieser Verbindung die Bindung an das aktive Zentrum stattfindet, kann anhand des Bindungsepitops nicht geklärt werden.

Bei dem Trifluormethylketon B 10694628 fehlt der aromatische Ring, die Carbonylgruppe ist aber vorhanden. Mit Hilfe des Bindungsepitops kann die Aussage getroffen werden, dass die Substanz an die porcine Pankreaslipase bindet. Der Sättigungstransfer im Bereich der Diketonkette ist vergleichbar mit den anderen Trifluormethylketonen.

Durch die STD-NMR-Methode konnte keine Aussage getroffen werden, welches der Trifluormethylketone bzw. der Trifluormethylketonderivate die stärkste Bindung an die porcine Pankreaslipase zeigt. Wenn die Trifluormethylketone zusammen in Lösung vorlagen, bildeten sie Komplexe, die im STD-Experiment direkt angeregt wurden.

Dadurch konnte kein Sättigungstransfer durch die Lipase auf die Hemmstoffe gemessen werden. Aus einer Datenbank der Firma Solvay Pharmaceuticals in Hannover liegen allerdings Daten mit der FIP-Lipase, einem Gemisch aus porciner Pankreaslipase und Esterasen, vor, in denen das Trifluormethylketon B 10682871 das stärkste inhibitorische Potential zeigt.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die STD-NMR-Spektroskopie und das *Molecular Modeling* in der Arzneistoffentwicklung angewendet werden können. Die STD-NMR-Methode kann bei reversibel bindenden Arzneistoffen zur Anwendung kommen. Es besteht die Möglichkeit, Bindungen zwischen Enzymen und Liganden zu charakterisieren und die Ergebnisse des Bindungsepitops für das *Modeling* zu nutzen bzw. die Ergebnisse des Bindungsepitops mit denen des *Modeling* abzugleichen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Trifluormethylketone als Inhibitoren der porcinen Pankreaslipase mit Hilfe diverser NMR-spektroskopischer Experimente, anhand von *Molecular Modeling* und mit einem Aktivitätsassay untersucht. Ziel war die Charakterisierung der Bindungsepitope der unterschiedlichen Trifluormethylketoninhibitoren. Eine Interpretation dieser ist mit Hilfe von *Molecular Modeling* und der Ergebnisse des Aktivitätsassays möglich.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit enzymkinetischen Untersuchungen, deren Ergebnisse Auskunft geben sollen, ob weitere Charakterisierungen mittels STD-NMR-Spektroskopie möglich sind. Mit Hilfe eines Aktivitätsassays konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Trifluormethylketonen um reversibel bindende Pankreaslipaseinhibitoren handelt. Außerdem konnte ein Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 50 % DMSO und 50 % Wasser, gefunden werden, in dem sowohl die porcine Pankreaslipase eine ausreichende Aktivität und Stabilität aufweist als auch die Trifluormethylketone löslich sind.

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen wurden mittels STD-NMR-Spektroskopie Bindungsepitope verschiedener Trifluormethylketone als Pankreaslipaseinhibitoren bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass jeweils der Aromat den stärksten Sättigungstransfer durch die porcine Pankreaslipase erfährt. Diese Ergebnisse wurden mittels *Molecular Modeling* bestätigt, durch das nachgewiesen werden konnte, dass die α -ständig zum Aromaten stehende Carbonylgruppe für die Bindung am aktiven Zentrum der Lipase verantwortlich ist. Weiterhin konnte durch kompetitive Titration mit dem irreversibel bindenden Lipaseinhibitor Orlistat gezeigt werden, dass die Trifluormethylketone am aktiven Zentrum der porcinen Pankreaslipase binden. Strukturelle Derivate der Trifluormethylketone zeigen, dass auch ohne Carbonylgruppe oder ohne Aromat eine Bindung an die Lipase stattfindet. Aufgrund von Komplexbildung zwischen den Liganden war es jedoch nicht möglich nachzuweisen, wie hoch die Bindungsaffinität der Trifluormethylketone bzw. der Derivate zur porcinen Pankreaslipase ist.

7 Literaturverzeichnis

BAUER, K. H., FRÖMMING, K.-H., FÜHRER, C. (1999) Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*, Stuttgart, 6. Auflage, 79

BAX, A., FREEMAN, R., KEMPESELL, S. P. (1980) Natural abundance ^{13}C - ^{13}C coupling observed via double-quantum coherence. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4849 - 4851

BAX, A., FREEMAN, R., FRENKIEL, T. A. (1981) An NMR technique for tracing out the carbon skeleton of an organic molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2102 - 2104

BEER, H. D., WOHLFAHRT, G., MCCARTHY, J. E. G., SCHOMBURG, D., SCHMIDT, R. D. (1996) Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Engineering* **9**, 507 - 517

BIET, T. (2003) Neue Erkenntnisse über den Mechanismus von Galaktosyltransferasen mit der STD-NMR-Spektroskopie. Dissertation, Universität zu Lübeck

BISSWANGER, H. (2000) Enzymkinetik. *WILEY-VCH*, Weinheim, 3. Auflage, 53 - 113

BLOW, D. (1991) Lipases reach the surface. *Nature* **351**, 444 - 445

BRADY, K., ABELES, R. H. (1990) Inhibition of chymotrypsin by peptidyl trifluormethyl ketones: determinants of slow-binding kinetics. *Biochemistry* **29**, 7608 - 7617

BROWN, F. J., ANDSIK, D. W., BERNSTEIN, P. R., BRYANT, C. B., CECCARELLI, C. *et al.* (1994) Design of orally active, non-peptidic inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.* **37**, 1259 - 1261

CLAPHAM, J. C., ARCH, J. R. S., TADAYYON, M. (2001) Anti-obesity drugs: a critical review of current therapies and future opportunities. *Pharmacology & Therapeutics* **89**, 81 - 121

CARRIÈRE, F., BARROWMAN, J. A., VERGER, R., LAUGIER, R. (1993) Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* **105**, 876 - 888

CHENG, Y., PRUSOFF, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099 - 3108

DAMEWOOD, JR. J. R., EDWARDS, P. D., FEENEY, S., GOMES, B. C., STEELMAN, G. B. *et al.* (1994) Nonpeptidic inhibitors of human leukocyte elastase. 2. Design, synthesis, and *in vitro* activity of a series of 3-amino-6-arylopyridin-2-one trifluoromethyl ketones. *J. Med. Chem.* **37**, 3303 - 3312

HADVÁRY, P., LENGSELD, H., WOLFER, H. (1988) Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.* **256**, 357 - 361

EGLOFF, M.-P., SARDA, L., VERGER, R., CABBILLAU, C., VAN TILBEURGH, H. (1995) Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Sci.* **4**, 44 - 57

GELB, M. H., SVAREN, J. P., ABELES, R. H. (1985) Fluoro ketone inhibitors of hydrolytic enzymes. *Biochemistry* **24**, 1813 - 1817

HADVÁRY, P., SIDLER, W., MEISTER, W., VETTER, W., WOLFER, H. (1991) The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *J. Biol. Chem.* **266**, 2021 - 2027

HEDSTROM, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501 - 4523

HILDEBRAND, P., PETRIG, C., BURCKHARDT, B., KETTERER, S., LENGSELD H. *et al* (1998) Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulates cholecystokinin release. *Gastroenterology* **114**, 123 - 129

HINCKLEY, C. C. (1969) Paramagnetic shifts in solutions of cholesterol and the dipyridine adduct of trisdipivalomethanatoeuropium. 3. A shift reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 5160 - 5162

HÖLTJE, H.-D., SIPPL, W., ROGNAN, D., FOLKERS, G. (2003) Molecular Modeling. *WILEY-VCH*, Weinheim, 2. Auflage, 21 - 25

JAYALAKSHMI, V., BIET, T., PETERS, T., RAMA KRISHNA, N. (2004) Refinement of the conformation of UDP-Galactose bound to Galactosyltransferase using the STD NMR intensity-restrained CORCEMA optimization. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8610 - 8611

JENNENS, M. L., LOWE, M. E. (1995) C-terminal domain of human pancreatic lipase is required for stability and maximal activity but not colipase reactivation. *J. Lipid Res.* **36**, 1029 - 1036

IMPERIALI, B., ABELES, R. H. (1986) Inhibition of serine proteases by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochemistry* **25**, 3760 - 3767

KRAUCH, H. (2003) Molecular Modelling. http://www.usf.uni-kassel.de/usf/archiv/dokumente/krauch/molecular_modelling.htm, Datum: 19.11.2004

LAPEY, A., KATTWINKEL, J., DI SANT'AGNESE, P. A., LASTER, L. (1974) Steatorrhea and azotorrhea and their relation to growth and nutrition in adolescents and young adults with cystic fibrosis. *J. Pediatr.* **84**, 328 - 334

LIANG, T.-C., ABELES, R. H. (1987) Complex of α -chymotrypsin and N-acetyl-L-leucyl-L-phenylalanyl trifluoromethyl ketone: structural studies with NMR-Spectroscopy. *Biochemistry* **26**, 7603 - 7608

LOWE, M. E. (2002) The triglyceride lipase of the pancreas. *J. Lipid Res.* **43**, 2007 - 2016

LÜTHI-PENG, Q., MAERKI, H. P., HADVÁRY, P. (1992) Identification of the active-site serine in human pancreatic lipase by chemical modification with tetrahydrolipstatin. *FEBS Lett.* **299**, 111 - 115

MAYER, M., MEYER, B., (1999) Charakterisierung von Ligandenbindungen durch Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Spektroskopie. *Angew. Chem.* **110**, 1902 - 1906

MAYER, M., MEYER, B., (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6108 - 6117

MEYER, B., PETERS, T. (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligands binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 864 - 890

MILED, N., DE CARO, A., DE CARO, J., VERGER, R. (2000) A conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by monoclonal antibody. *Biochim. Biophys. Acta* **1476**, 165 - 172

MOMSEN, W. E., BROCKMAN, H. L. (1976) Effects of colipase and taurodeoxycholate on the catalytic and physical properties of pancreatic lipase B at an oil-water interface. *J. Biol. Chem.* **251**, 378 - 383

MOREAU, H., LAUGIER, R., GARGOURI, Y., FERRATO, F., VERGER, R. (1988a) Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* **95**, 1221 - 1226

MOREAU, H., SAUNIERE, J. F., GARGOURI, Y., PIERONI, G., VERGER, R. *et al.* (1988b) Human gastric lipase: variations induced by gastrointestinal hormones and by pathology. *Scand. J. Gastroenterol.* **23**, 1044 - 1048

OGILVIE, W., BAILEY, M., POUPART, M.-A., ABRAHAM, A., BHAVSAR, A. *et al.* (1997) Peptidomimetic inhibitors of the human cytomegalovirus protease. *J. Med. Chem.* **40**, 4113 - 4135

PETERSEN, J. (2005) Molekülmodellierung durch Kraftfelder. http://amor.rz.hu-berlin.de/~genslerm/files/inflIII_molekuelmod.pdf, Datum: 16.02.2005

RADEMACHER, C. (2004) Peptidligandmodellierung am Objekt 3C Protease des Hepatitis A Virus. Bachelor Arbeit, Universität zu Lübeck

ROUSSEL, A., CANAAN, S. EGLOFF, M.-P., RIVIERE, M., DUPUIS, L. *et al.* (1999) Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J. Biol. Chem.* **274**, 16995 - 17002

ROUSSEL, A., MILED, N., BERTI-DEPUIS, L., RIVIERE, M., SPINELLI, S. *et al.* (2002) Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. *J. Biol. Chem.* **277**, 2266 - 2274

SCHEIB, H. (1999) Untersuchung zur Regio- und Stereoselektivität von Lipasen durch computergestütztes *Molecular Modeling* und molekularbiologische Methoden. Dissertation, Universität Stuttgart

THEWS, G., MUTSCHLER, E., VAUPEL, P. (1999) Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*, Stuttgart, 5. Auflage, 371 - 381

TSUZUKI, W., UE, A., KITAMURA, Y. (2001) Effect of dimethylsulfoxide on hydrolysis of lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2078 - 2082

VEALE, C. A., BERNSTEIN, P. R., BOHNERT, C. M., BROWN, F. J., BRYANT, C. *et al.* (1997) Orally active trifluoromethyl ketone inhibitors of human leukocyte elastase. *J. Med. Chem.* **40**, 3173 - 3181

VAN TILBEURGH, H., SARDA, L., VERGER, R., CABBILLAU, C. (1992) Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* **359**, 159 - 162

VAN TILBEURGH, H., EGLOFF, M. P., MARTINEZ, C., RUGANI, N., VERGER, R. *et al.* (1993) Interfacial activation of the lipase-colipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* **362**, 814 - 820

VOGTHERR, M., PETERS, T. (2000) Application of NMR based binding assay to identify key hydroxyl groups for intermolecular recognition. *J. Chem. Am. Soc.* **122**, 6093 - 6099

WINKLER, F. K., D'ARCY, A., HUNZIKER, W. (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**, 771 - 774

YANG, Y., LOWE, M. E. (2000) The open lid mediates pancreatic lipase function. *J. Lipid Res.* **41**, 48 - 57

YARIM, M., POSPISIL, P., GASSER, M., KUONI, T., LIMACHER, A. *et al.* (2001) Molecular Modelling Konformation und Struktur. http://www.pharma.ethz.ch/pc/SCRIPT_modeling_theory2003.pdf, Datum: 19.11.2004

ZAKS, A., KLIBANOV, A. M. (1985) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 3192 - 3196

ZAKS, A., KLIBANOV, A. M. (1988) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J. Biol. Chem.* **263**, 3194 - 3201

ZHI, J., MULLIGAN, T. E., HAUPTMAN, J. B. (1999) Long-term systemic exposure of orlistat, a lipase inhibitor, and its metabolites in obese patients. *J. Clin. Pharmacol.* **39**, 41 - 46

ZIEVE, L., MULFORD, B., MCHALE, A. (1966a) Secretion of pancreatic enzymes. II. Comparative response following test meal or injection of secretin and pancrozymin. *Am. J. Dig. Dis.* **11**, 685 - 694

ZIEVE, L., SILVIS S. E., MULFORD, B., BLACKWOOD, W. D. (1966b) Secretion of pancreatic enzymes. I. Response to secretin and pancreozymin. *Am. J. Dig. Dis.* **11**, 671 - 684

Eigene Veröffentlichungen

PETERS, H., KUSOV, Y. Y., MEYER, S., BENIE A. J., BAUML, E. *et al.* (2005) Hepatitis A virus proteinase 3C binding to viral RNA – correlation with substrate binding and enzyme dimerization. *Biochem J.* **385**, 363 – 370

8 Anhang

8.1 Spektren

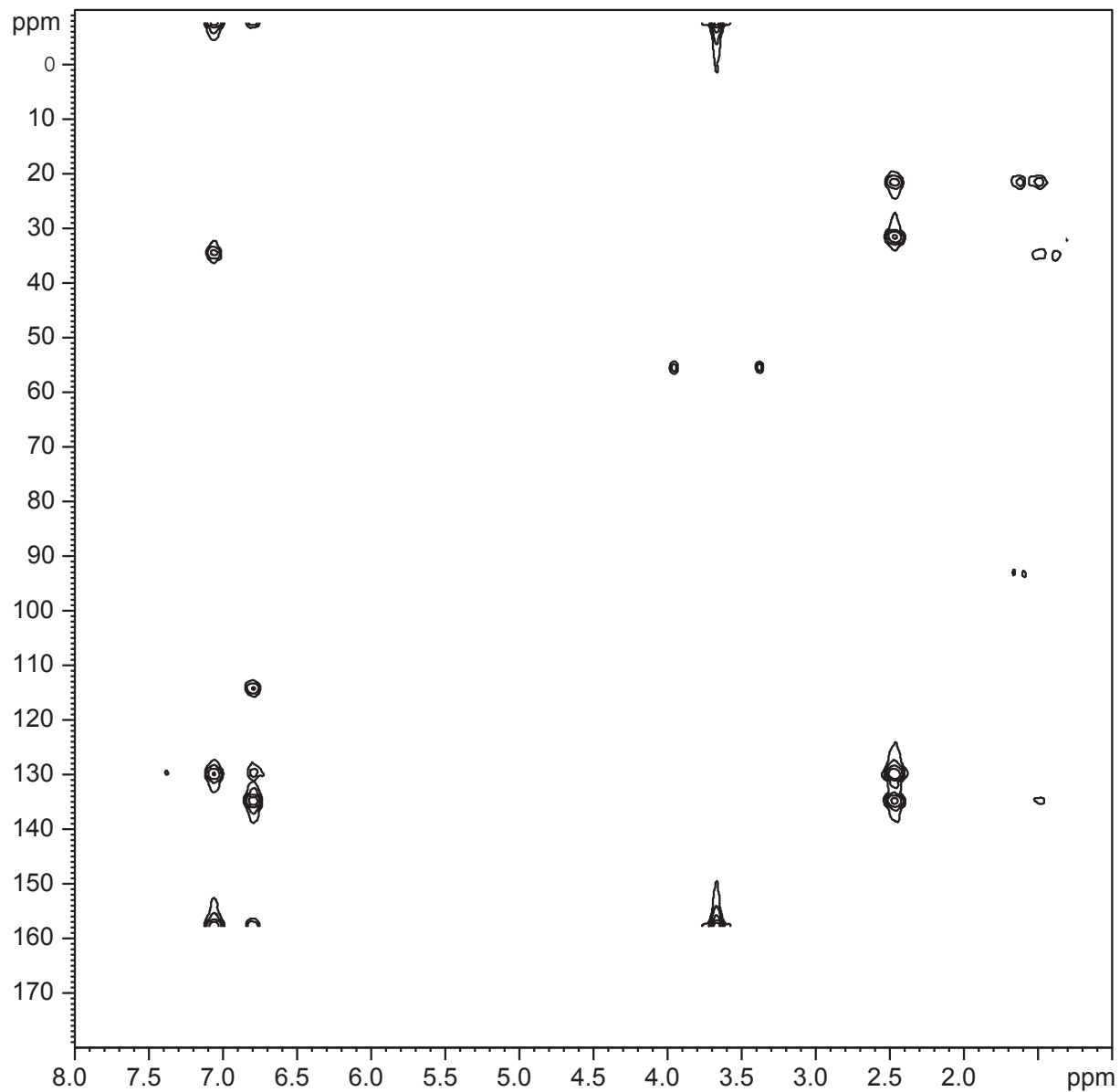


Abb. 8.1 HMBC-Spektrum (250 MHz) vom Trifluormethylketon B 10551089 mit einer 50 mM Probe in d_6 -DMSO bei 37 °C mit 64 Scans.

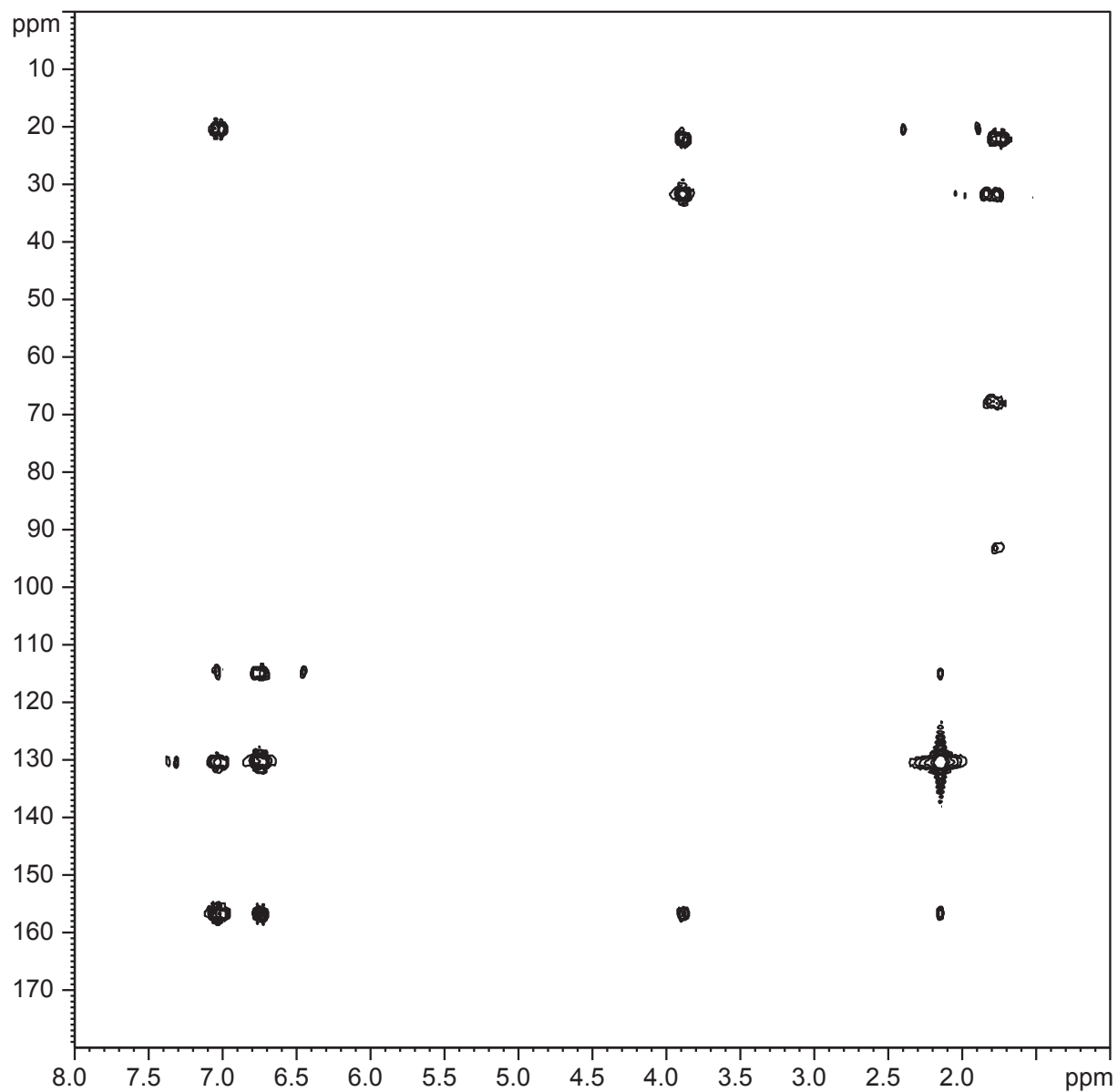


Abb. 8.2 HMBC-Spektrum (250 MHz) vom Trifluormethylketon B 10539242 mit einer 50 mM Probe in d_6 -DMSO bei 37 °C mit 64 Scans.

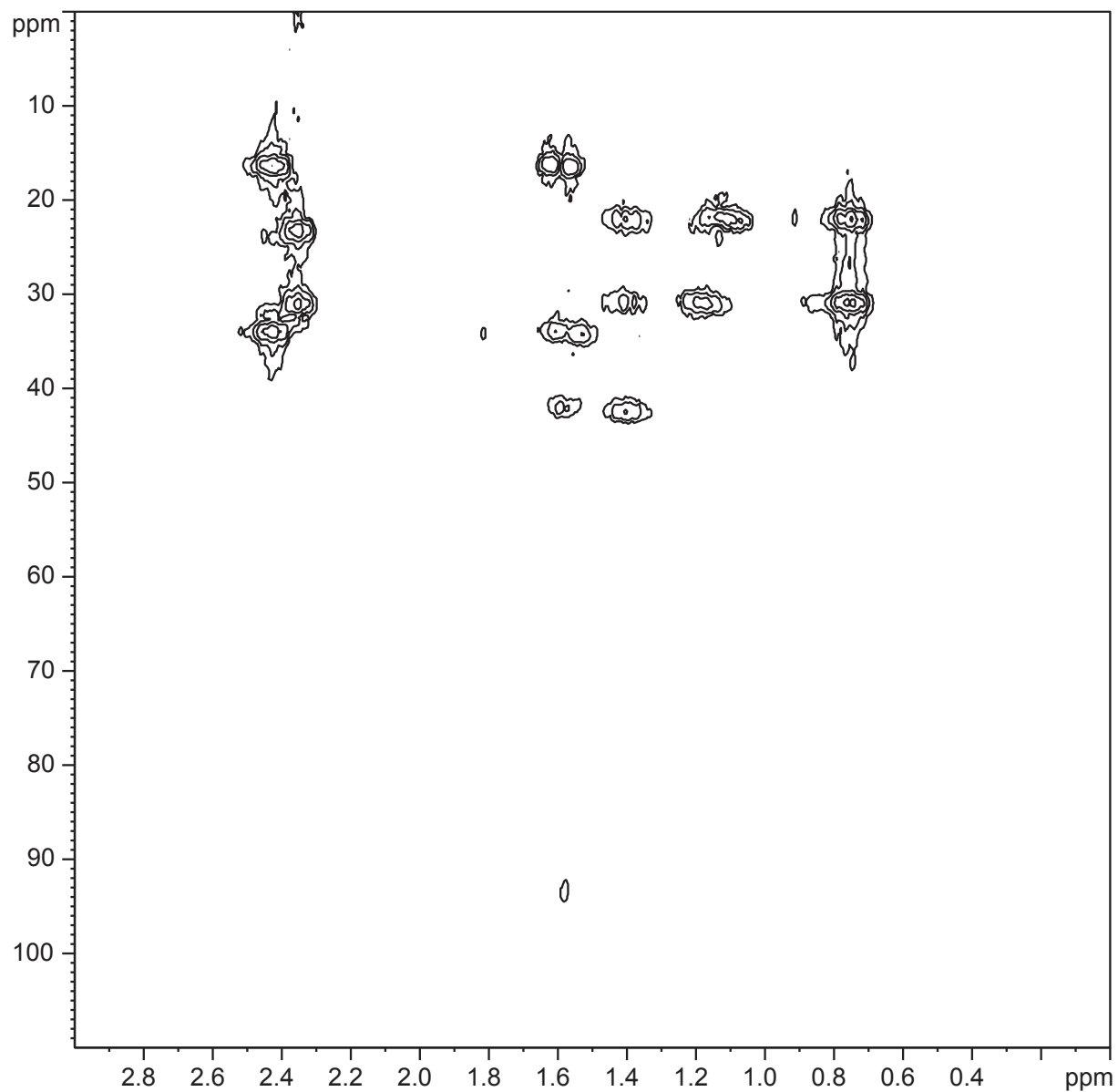


Abb. 8.3 HMBC-Spektrum (250 MHz) vom Trifluormethylketon B 10694628 mit einer 50 mM Probe in d_6 -DMSO bei 37 °C mit 64 Scans.

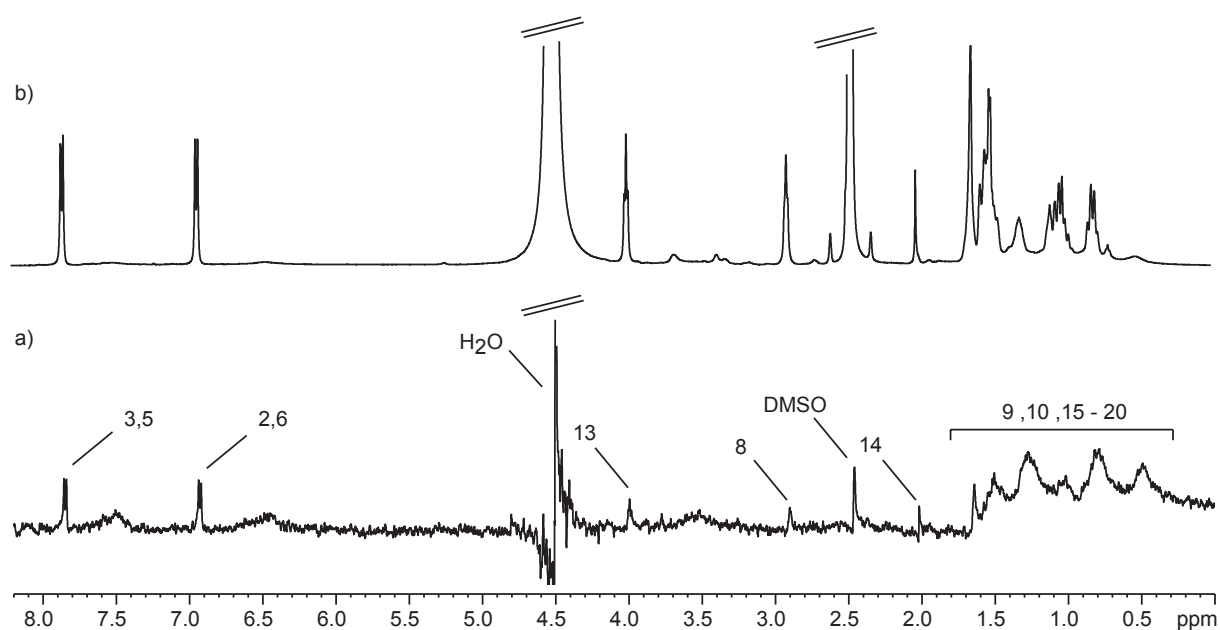


Abb. 8.4 Vergleich eines STD-NMR-Spektrums (a) von inaktivierter porciner Pankreaslipase mit dem Lipaseinhibitor B 10682871 mit einem ^1H -NMR-Referenzspektrum (b) in 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O bei 12 °C und 500 MHz. Das Protein wurde für 2 sec bei -2 ppm für das *on-resonance* und bei -20 ppm für das *off-resonance* Spektrum gesättigt (Positionen siehe Abb. 5.26).

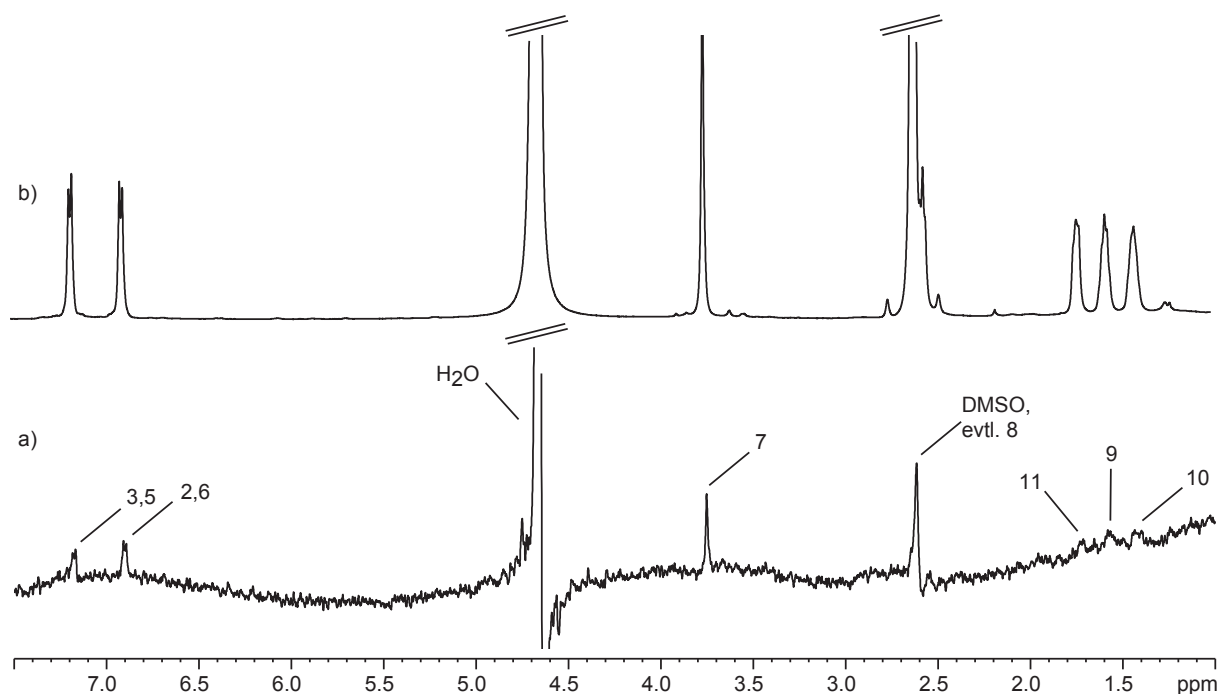


Abb. 8.5 Vergleich eines STD-NMR-Spektrums (a) von porciner Pankreaslipase mit dem Lipaseinhibitor B 10551089 mit einem ^1H -NMR-Referenzspektrum (b) in 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O bei 12 °C und 500 MHz. Das Protein wurde für 2 sec bei -2 ppm für das *on-resonance*- und bei -20 ppm für das *off-resonance* Spektrum gesättigt (Positionen siehe Abb. 5.27).

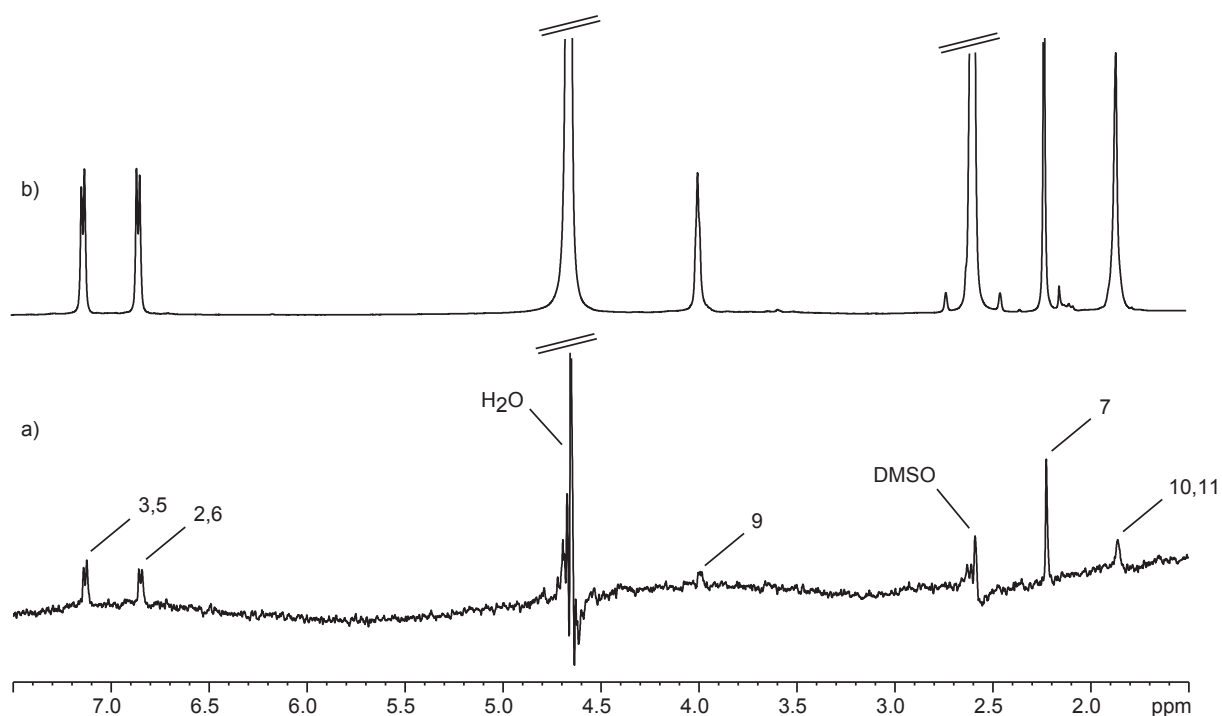


Abb. 8.6 Vergleich eines STD-NMR-Spektrums (a) von porciner Pankreaslipase mit dem Lipaseinhibitor B 10539242 mit einem ^1H -NMR-Referenzspektrum (b) in 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O bei 12 °C und 500 MHz. Das Protein wurde für 2 sec bei -2 ppm für das *on-resonance* und bei -20 ppm für das *off-resonance* Spektrum gesättigt (Positionen siehe Abb. 5.28).

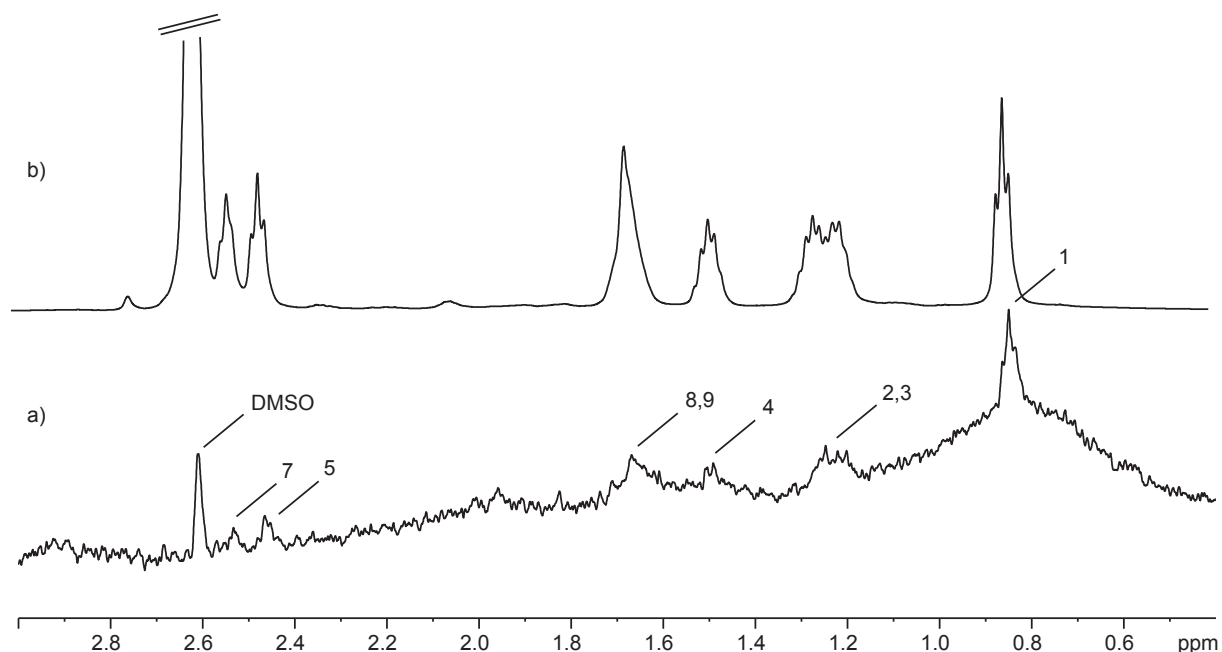


Abb. 8.7 Vergleich eines STD-NMR-Spektrums (a) von porciner Pankreaslipase mit dem Lipaseinhibitor B 10694628 mit einem ^1H -NMR-Referenzspektrum (b) in 50 % d_6 -DMSO und 50 % D_2O bei 12 °C und 500 MHz. Das Protein wurde für 2 sec bei 8 ppm für das *on-resonance* und bei -20 ppm für das *off-resonance* Spektrum gesättigt (Positionen siehe Abb. 5.29).

8.2 Verwendete Pulsprogramme

8.2.1 Standardexperimente (Bruker)

Experimentname	Pulsprogramm	NS/DS	Parameter
HSQC	hsqcetgpsi	32/16	$d_1 = 1 \text{ sec}$ $D_{24} = d_4$
HMBC	hmbcgplpndqf	64/16	$d_1 = 1 \text{ sec}$ $^1J_{C,H} = 8 \text{ Hz}$
^{13}C , mit Entkopplung	zgpg30	1024/4	-
^{13}C , ohne Entkopplung	zg30	512/4	-
1D INADEQUATE, selektiv	selina	16384/4	$^1J_{C,C} = 40 \text{ Hz}$ O1P = 130,2 ppm O1P = 163,5 ppm O1P = 198,7 ppm
2D INADEQUATE	inadqf	512/16	$d_1 = 1 \text{ sec}$ $^1J_{C,C} = 40 \text{ Hz}$
^{19}F	zgfngl	64/8	-

8.2.2 1D STD

```
;zgdifspsl.tb
```

```
;avance-version
```

```
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
```

```
;presaturation by shaped pulses
```

```
;frequency alternates after 8 scan
```

```
;spin lock for protein suppression
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
1 ze
```

```
2 d1 fq1:f2
```

```
3 p11:sp1:f2
```

```
d11
```

```
lo to 3 times l7
p1 ph1
go=2 ph31
wr #0
exit
```

```
ph1=0 0 2 2 2 2 0 0 1 1 3 3 3 3 1 1
ph2=1 1 3 3 3 3 1 1 2 2 0 0 0 0 2 2
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 1 3 3 1 3 1 1 3
```

```
,*****Power Level*****
```

```
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
```

```
;p10: f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB)
```

```
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse ;between 40 -70 dB depending on
protein and ligand ;
```

```
,*****Pulse*****
```

```
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
```

```
;p6 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending on the
protein)
```

```
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec) ;
```

```
,*****Delays*****
```

```
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

```
;d11 : delay between shaped pulses [20usec] ;
```

```
;presaturation = (p11 + d11) * l7 (presaturation should be around 2 sec)
```

```
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation ;
```

```
;NS = 16*n
```

```
;DS = 16
```

LEBENS LAUF

Maiko Wolff, geboren am 12.04.1975 in Bielefeld

SCHULAUSBILDUNG

08/1981 - 07/1985	Grundschule in Stieghorst, Bielefeld
08/1985 - 06/1994	Ratsgymnasium Bielefeld
10.06.1994	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

BERUFS AUSBILDUNG

08/1994 - 07/1996	theoretische Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin an den Sabine Blindow Schulen, Hannover
08/1996 - 01/1997	praktische Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin in der Fontane-Apotheke, Bielefeld
08.02.1997	Erlangung der Berufsbezeichnung pharmazeutisch-technische Assistentin

STUDIUM

04/1997 - 05/2001	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
06/2001 - 11/2001	Pharmaziepraktikum in der Vita-Apotheke, Bielefeld
12/2001 - 05/2002	Pharmaziepraktikum bei Solvay Pharmaceuticals, Hannover
22.07.2002	Approbation zur Apothekerin
seit 08/2002	Beginn der Arbeiten zur Dissertation bei Prof. Dr. T. Peters am Institut für Chemie der Universität zu Lübeck in Kooperation mit der Firma Solvay Pharmaceuticals in Hannover

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. T. Peters für die interessante Themenstellung, die hervorragende Ausstattung des Spektrometers, die fruchtbaren Diskussionen, sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für sein Vertrauen und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Der Firma Solvay Pharmaceuticals in Hannover danke ich für ihre großzügige finanzielle Unterstützung zur Durchführung meiner Arbeit und für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Labors.

Bei Herrn Dr. J. Antel möchte ich mich dafür bedanken, dass er es mir ermöglichte, meine Arbeit im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit der Firma Solvay Pharmaceuticals durchzuführen. Besonders genannt seien auch seine stete Diskussionsbereitschaft sowie sein Vertrauen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich...

... Herrn Dr. A. J. Benie für seine kompetenten NMR-spektroskopischen Anregungen, seine großzügige Hilfsbereitschaft und Betreuung, seine hilfreichen Diskussionen und für die kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

... Frau Dr. A. Blume und Herrn Dr. T. Biet für die anregenden Diskussionen, ihre stetige Hilfsbereitschaft und die kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

...allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Chemie der Universität zu Lübeck für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und das angenehme und entspannte Arbeitsklima.

... Frau Dr. S. Eyting und Herrn Dr. A. Potthoff, dass sie mir ein Labor in der Enzymanalytik zur Verfügung gestellt haben, und für nützliche Tipps über die Pankreaslipase.

... Herrn M. Galle für die Aufreinigung und die Bereitstellung der porcinen Pankreaslipase, für die aufschlussreichen Diskussionen in enzymatischen Fragestellungen und seine Hilfsbereitschaft.

... Herrn M. Rust für die kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit und seine Hilfsbereitschaft für das Lösen von technischen Problemen.

... Herrn M. Gramer für seine geduldige Einführung in die Thematik des *Molecular Modeling* und seine stetige Hilfsbereitschaft.

... allen namentlich nicht aufgeführten Mitarbeitern des „Obesity“-Teams und der pharmazeutischen Enzymanalytik für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für ein angenehmes Arbeitsklima.

... und schließlich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Freund Maik Richey für das fortwährende Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die moralische Unterstützung.