

- [1] N. J. Oppenheimer, A. L. Handlon in *The Enzymes*, Vol. 20 (Hrsg.: D. S. Sigman), Academic Press, San Diego, **1992**, S. 453–504.
- [2] G. J. Dutton, *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1980**.
- [3] L. Kjellén, U. Lindahl, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 443–475.
- [4] *The Biology of Hyaluronan* (Hrsg.: D. Evered, J. Whelan), Wiley, Chichester, **1989**.
- [5] B. A. Dougherty, I. van de Rijn, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7118–7124.
- [6] C. Arrecubieta, E. García, R. López, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 2971–2974.
- [7] D. A. Watson, D. M. Musher, *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 3135–3138.
- [8] E. R. Moxon, J. S. Kroll, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1990**, *150*, 65–86.
- [9] M. R. Wessels, J. B. Goldberg, A. E. Moses, T. J. DiCesare, *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 433–441.
- [10] R. E. Campbell, R. F. Sala, I. van de Rijn, M. E. Tanner, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3416–3422.
- [11] G. L. Nelsestuen, S. Kirkwood, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3828–3834.
- [12] J. L. Strominger, E. S. Maxwell, J. Axelrod, H. M. Kalckar, *J. Biol. Chem.* **1957**, *224*, 79–90.
- [13] A. B. Ordman, S. Kirkwood, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1320–1326.
- [14] J. G. Schiller, A. M. Bowser, D. S. Feingold, *Carbohydr. Res.* **1972**, *25*, 403–410.
- [15] T. Müller, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1467–1468; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1328–1329.
- [16] D. D. Reynolds, W. L. Evans, *Organic Syntheses*, Vol. 3, (Hrsg.: E. C. Horning), Wiley, New York, **1955**, S. 432–434.
- [17] R. W. Binkley, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1216–1221.
- [18] D. Nicoll-Griffith, L. Weiler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 659–661.
- [19] L. Lombardo, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 4293–4296.
- [20] C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *Biochemistry* **1973**, *12*, 5031–5037.
- [21] A. N. Singh, J. S. Newborn, F. M. Raushel, *Bioorg. Chem.* **1988**, *16*, 206–214.
- [22] I. Meynial, V. Paquet, D. Combes, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1627–1631.
- [23] D. Horton, M. Nakadate, J. M. J. Tronchet, *Carbohydr. Res.* **1968**, *7*, 56–65.
- [24] Eine Dismutierung zu Alkohol und Säure zu Beginn der Reaktion wurde während der Oxidation von Aldehyden durch Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase beobachtet (G. T. M. Henahan, N. J. Oppenheimer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 735–738). Mit UDP-Glucose-Dehydrogenase läuft diese Reaktion nicht ab, weil UDP-Glucuronsäure (und nicht NADH) als letztes Produkt vom Enzym freigesetzt wird [10]. Während der Oxidation von **1** wurde keine Anfangsverzögerung beobachtet.
- [25] Die Anpassung dürfte noch besser sein, wenn Korrekturen für den Einfluß schwacher allosterischer Wechselwirkungen berücksichtigt würden. Diese Korrekturen (Hill-Koeffizient $n = 1.5$ für UDP-Glucose und 1.3 für **1**) würden allerdings den k_{cat} -Wert um nicht mehr als 10% ändern.
- [26] B. Franzen, C. Carrubba, D. S. Feingold, J. Ashcom, J. S. Franzen, *Biochem. J.* **1981**, *199*, 603–609.
- [27] W. P. Ridley, J. P. Houchins, S. Kirkwood, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 8761–8767.
- [28] C. Corbier, F. Della Seta, G. Branlant, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12532–12535.
- [29] J. I. Harris, M. Waters in *The Enzymes*, Vol. 13 (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1976**, S. 1–49.

Computergestützte Studien zur Bindung in orthogonalen Cyclosporin-Cyclophilin-Paaren**

Albert C. Pierce und William L. Jorgensen*

Professor Dieter Seebach zum 60. Geburtstag gewidmet

Von der Gentherapie verspricht man sich viel für die Behandlung von Erbkrankheiten, und gegenwärtig wird intensiv nach effektiven Gen-Transportsystemen gesucht. Die exakte Dosierbarkeit des Genprodukts ist dabei ein wichtiger Gesichtspunkt, dem sich in den letzten Jahren Schreiber, Crabtree und

Mitarbeiter zugewandt haben.^[1] Ihre elegante Methode zur Regulierung von Transgenen ist durch die Aktivierung eines zellulären Prozesses via Assoziation von zwei Proteinen nach Zugabe eines einzelnen Wirkstoffmoleküls gekennzeichnet (Abb. 1).

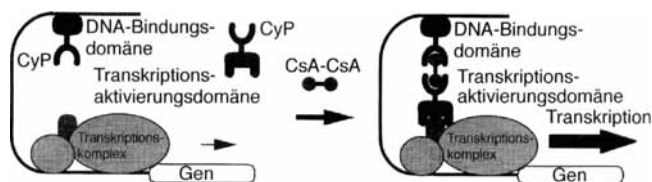
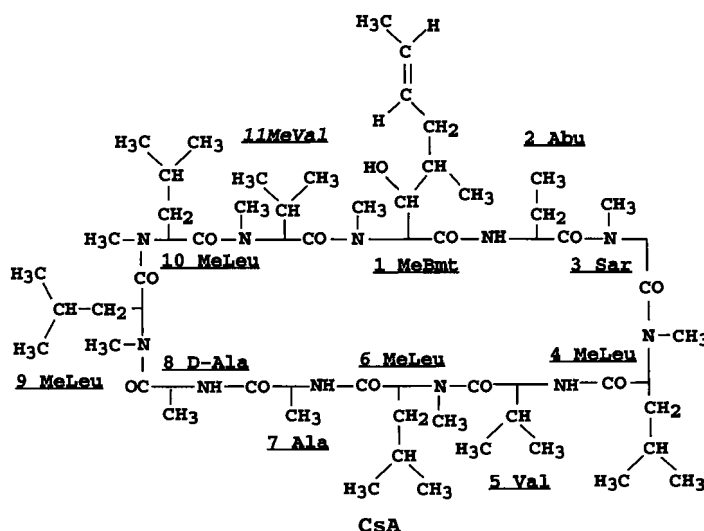


Abb. 1. Schematische Darstellung der Regulierung der Proteinsynthese mit einem chemischen Dimerisierungsauslöser.

Wenn es sich bei diesen Proteinen um die DNA-Bindungs- und die Promotordomänen eines Transkriptionsaktivators handelt, kann die Genexpression induziert werden. Die Rezeptoren sind chimäre Proteine, die Domänen zum Binden nichtüberlappender Regionen des Wirkstoffmoleküls enthalten. In der ersten Arbeit waren die wirkstoffbindenden Domänen Immunophiline wie Cyclophilin CyP oder FKBP12 mit einem synthetischen Dimer eines assoziierten immunsuppressiven Wirkstoffs als chemischem Dimerisierungsauslöser (chemical inducer of dimerization = CID).^[1] Mit diesem System gelangen Proteinsynthesen sowohl in vitro^[1] als auch in vivo^[1c, 1d, 2]. Das Ausmaß der Genexpression kann dabei durch Variation der Zeiten und der Menge des verabreichten Wirkstoffs beeinflusst werden.

Ein Problem jedoch ergibt sich aus der Tatsache, daß die Immunophilinen in vielen Zellarten in großer Menge exprimiert werden. Als Konsequenz kann der Wirkstoff im ganzen Organismus durch Immunophilinen unter Bildung von unproduktiven Proteinkomplexen gebunden werden. Eine Lösung bot das Konzept der orthogonalen Rezeptor-Ligand-Paare.^[3] Schreiber und Mitarbeiter modifizierten das cyclische Undecapeptid Cyclosporin A (CsA) mit einem sterisch anspruchsvollen Rest



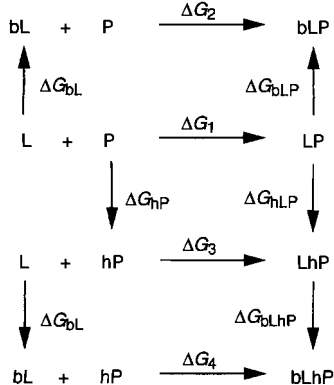
(„Höcker“), indem sie den Rest MeVal11 durch den Rest Melle ersetzen, was zu einer drastischen Reduzierung der Bindung an Wildtyp-CyP führte. Danach wurden Mutanten von CyP mit zu dem Höcker passenden „Löchern“ exprimiert, z. B. die Mutante, in der der Phe113 durch Ala ersetzt ist (F113A) und deren Bindung an das veränderte CsA ähnlich gut ist wie die im natürlichen System.^[3] Auf diesem Weg können Probleme durch die

[*] Prof. W. L. Jorgensen, A. C. Pierce
Department of Chemistry, Yale University
New Haven, CT 06520-8107 (USA)
Telefax: Int. + 203/432-6299
E-mail: bill@adrik.chem.yale.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health unterstützt. Dank gilt außerdem Dr. J. Tirado-Rives und M. L. Lamb für hilfreiche Diskussionen und Mitarbeit.

Verdünnung des Wirkstoffs im Organismus eliminiert werden, und weiterhin werden diese veränderten Wirkstoffe nicht die unerwünschte Eigenschaft ihrer Eltern haben, immunsuppressiv zu sein.

Hier demonstrieren wir, wie Computermethoden zum Design und Verständnis der Struktur von orthogonalen Rezeptor-Ligand-Paaren beitragen können. Unter thermodynamischen



Schema 1. Thermodynamische Cycles, die für das Studium von orthogonalen Rezeptor-Ligand-Paaren wichtig sind. L und P sind die Referenzliganden bzw. -proteine, bL und hP die veränderten Liganden bzw. Proteine. Die FEP-Rechnungen wurden für die durch vertikale Pfeile beschriebenen Prozesse durchgeführt.

$\Delta G_4 - \Delta G_3$ (Einfluß des Höckers auf die Bindung an das Protein mit Loch). Für ein brauchbares Höcker-Loch-Paar muß $\Delta G_2 - \Delta G_1 \gg 0$ gelten, und außerdem ist es wünschenswert, daß $\Delta G_4 - \Delta G_1 \leq 0$ gilt, d. h. der Höcker unterbindet das Binden, und das Loch macht es wieder möglich. Die letzte Bedingung ist bei $\Delta G_3 - \Delta G_1 < 0$ und $\Delta G_4 - \Delta G_3 < 0$ leichter zu erfüllen. Berechnet werden können diese Differenzen über Computersimulationen unter Verwendung von Gibbs-Energie-Störungsmethoden (free-energy perturbation = FEP).^[4] Es ist leicht, rechnerisch die in Schema 1 vertikal eingezeichneten Störungen durchzuführen, wobei z. B. ΔG_{bL} und ΔG_{bLP} für die Gibbs-Energien stehen, die nötig sind, um im freien Referenzliganden bzw. im Komplex aus ihm und dem Referenzprotein den Höcker einzuführen. Aus dem thermodynamischen Cyclus folgt $\Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_{bLP} - \Delta G_{bL}$.

Als erstes wandten wir uns dem von Schreiber et al. beschriebenen Einführen eines Melle11-Höckers in Cyclosporin A und eines Ala113-Lochs in Cyclophilin zu. Die Ensemblekonfigurationen wurden mit dem Monte-Carlo(MC)-Verfahren des Programms MCPRO generiert.^[5] Neben einer Studie über Komplexe von Trypsin mit Benzamidinen^[6] sind dies die ersten MC/FEP-Rechnungen für Proteine. Üblicherweise werden Proteinkonformationen mit Moleküldynamik(MD)-Methoden simuliert; kürzliche Vergleiche der Effizienz von MD- und MC-Verfahren bei Konformationsstudien^[7] und frühere Erfolge mit MC/FEP-Rechnungen bei organischen Wirt-Gast-Komplexen^[4, 8] ermutigten uns aber zu diesen Monte-Carlo-Simulationen. Für alle Atome außer für Wasserstoffatome an gesättigten Kohlenstoffatomen wurde das AMBER/OPLS-Kraftfeld eingesetzt.^[9] Die Nichtstandard-Aminosäuren in CsA konnten alle durch für Amide und Kohlenwasserstoffe existierende Parameter beschrieben werden. Die Ausgangs-Proteinkoordinaten basierten auf den Kristallstrukturen von Humancyclophilin A^[10] und dem CsA-CyP-Komplex.^[11] Für das Versetzen von freiem

Gesichtspunkten konzentriert sich das Problem auf die Gibbs-Bildungsenergien ΔG_1 bis ΔG_4 der vier Protein-Ligand-Komplexe in Schema 1. Zwischen den Gibbs-Bildungsenergien und den experimentell zugänglichen Assoziationskonstanten gilt die Beziehung $\Delta G_i = -RT \ln K_i$. Wichtig für Vergleiche sind die Differenzen $\Delta G_2 - \Delta G_1$ (Einfluß des Höckers auf die Bindung an das Referenzprotein), $\Delta G_4 - \Delta G_1$ (Ausmaß der Wiederherstellung der Bindung durch die Höcker-Loch-Paarung), $\Delta G_3 - \Delta G_1$ (Einfluß des Lochs auf die Bindung an den Referenzliganden) und

CsA mit einem Höcker wurden zwei Strukturen verwendet. Eine stammte aus einer Neutronenbeugungsuntersuchung an einem Kristall, der aus einem Ethanol/Öl-Gemisch erhalten worden war,^[12] die andere wurde aus der Struktur des CsA-CyP-Komplexes hergeleitet, in dem die CsA-Konformation der NMR-spektroskopisch in Lösung ermittelten ähnlicher ist.^[13] Alle Ausgangsstrukturen wurden mit dem Programm AMBER in 250–1000 „Steepest-descent“-Schritten unter Verwendung einer abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstante energieminiert.^[14] Für eine effiziente Behandlung des Proteinsystems wurden nur 107 der 165 Reste im Abstand von ungefähr 18 Å vom ausgetauschten MeVal in die MC-Simulationen einbezogen. Die Längen der CsA-Bindungen, außer der, mit der der Ring geschlossen wird, wurden festgehalten, während alle Bindungs- und Diederwinkel variiert wurden. Bei den Proteinen wurden alle Bindungslängen festgehalten, während Seitenketten-Bindungs- und -Torsionswinkel, ausgenommen die von Arenen, für alle Reste mit irgendeinem Atom, das weniger als 9.5 Å von MeVal11 entfernt war, variiert wurden. Nach den Energieminimierungen wurde das Proteinrückgrat nicht mehr verändert. Diese Vereinfachung sollte wegen der geringen Bewegung im Rückgrat, die sich bei MD/FEP-Rechnungen typischer Dauer insbesondere für kleine Störungen wie Val → Ile gezeigt hat, zulässig sein; dennoch wäre für eine optimale Genauigkeit eine Variation aller Parameter wünschenswert. Derzeit sind CsA und die Proteinseitenketten flexibel gehalten, so daß sich diese der Einführung des Höckers bzw. Lochs anpassen können.

Jedes System wurde bis zu einem Abstand von 18 Å (bezogen auf das Zentrum des CsA-Rings beim freien CsA und auf das α -Kohlenstoffatom von MeVal11 beim gebundenen CsA) mit TIP3P-Wassermolekülen^[15] solvatisiert. Nach dem Ausschluß von Wassermolekülen mit gravierenden sterischen Wechselwirkungen verblieben 748 Wassermoleküle für das ungebundene System und ≈ 450 für die Proteine und Komplexe. Die Störungsrechnungen wurden für eine Temperatur von 20 °C durchgeführt, und nichtbindende Wechselwirkungen wurden nur innerhalb von Kugeln um die Reste mit 9 Å Radius berücksichtigt. Das erste Fenster einer jeden FEP-Rechnung wurde mit 5×10^6 Konfigurationen äquilibriert, und die Endstruktur diente als Ausgangsstruktur für das nächste Fenster. Nach der Äquilibrierung mit 3×10^6 Konfigurationen wurde über wenigstens diese Zahl an Konfigurationen gemittelt, bis zusätzliche 10^6 Konfigurationen den ΔG -Wert des Fensters um nicht mehr als 0.02 kcal mol⁻¹ änderten. Bei den meisten Fenstern benötigte man hierzu 4×10^6 – 6×10^6 Konfigurationen, in einigen wenigen Fällen allerdings auch bis zu 11×10^6 . Insgesamt wurden für jede der fünf Störungen, die in Schema 1 durch vertikale Pfeile beschrieben sind, 18–26 MC-Simulationen durchgeführt. Die resultierenden Graphen der Gibbs-Energien sind glatt (siehe Abb. 2 und 3), und in Tabelle 1 sind die berechneten ΔG -Werte den experimentell ermittelten gegenübergestellt. Die statistische Ungenauigkeit ($\pm \sigma$) wurde für die berechneten Größen aus den Fluktuationen bei separaten Mittelwertbildungen mit Sätzen von 2×10^5 Konfigurationen erhalten. Ein ähnliches Verfahren war bei den Trypsinkomplexen angewendet worden; hohe Genauigkeit war dabei durch das Einbeziehen von Hysteresen von ca. 0.3 kcal mol⁻¹ für Störungen in geschlossenen Cyclen mit drei Inhibitoren, d. h. $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A$, erreicht worden.^[6]

Abbildung 2 ist zu entnehmen, daß der Nettowert von ΔG_{bL} für die Einführung des Höckers in ungebundenes CsA nicht von der ursprünglich gewählten CsA-Struktur abhängt. Der Übergang von Phe zu Ala (Abb. 3) bedeutet eine für FEP-Rechnungen relativ große Änderung, doch die MC-Rechnungen verliefen mit hoher Genauigkeit. Die numerischen Ergebnisse hängen

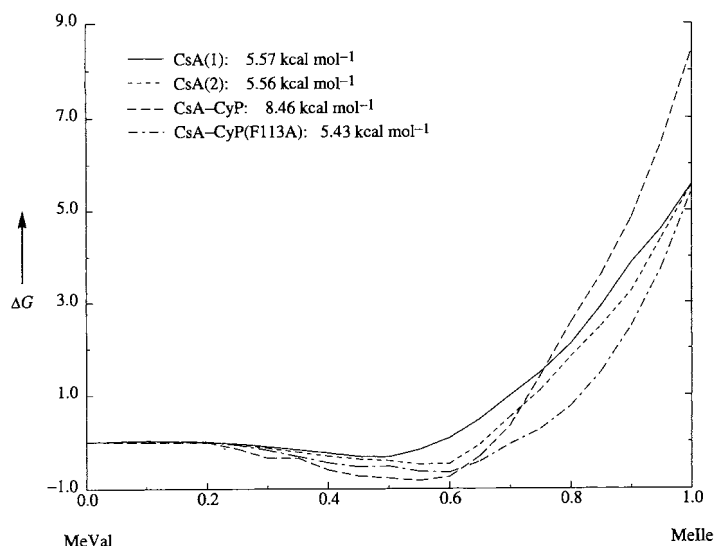


Abb. 2. Berechnete ΔG -Werte in kcal mol^{-1} für die Mutation von CsA zu Melle11-CsA unter verschiedenen Bedingungen. Die beiden Graphen für ungebundenes CsA gehören zu zwei unterschiedlichen Ausgangsgeometrien (siehe Text). Die Mutation wurde auch mit an das Protein CyP und das mutierte Protein F113A-CyP gebundenem CsA durchgeführt.

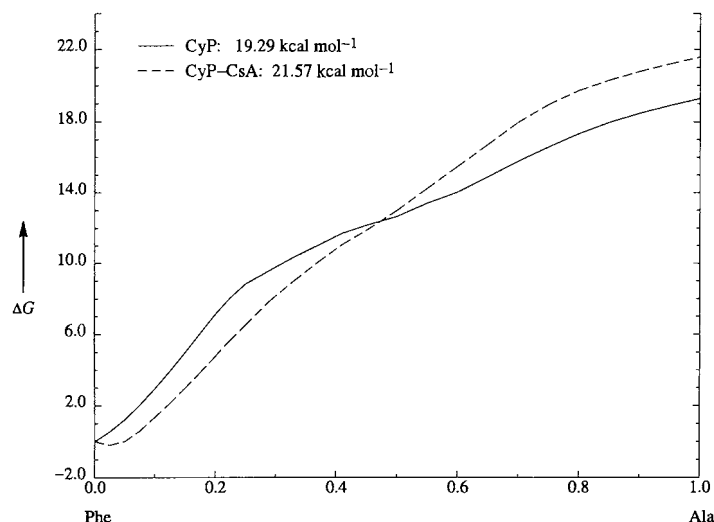


Abb. 3. Berechnete ΔG -Werte in kcal mol^{-1} für die Mutation von CyP zu Ala113-CyP im ungebundenen Zustand und im Komplex mit CsA.

davon ab, wie die Störung durchgeführt wird, und enthalten z. B. Beiträge von veränderten intramolekularen nichtbindenden Wechselwirkungen, wenn eine Gruppe größer wird. Die Zahlen bekommen eine Bedeutung, wenn sie Differenzen zwischen freien und komplexierten Komponenten (siehe Schema 1) entsprechen. Es sei auch darauf hingewiesen, daß es keine Probleme mit den Endpunkten der MC/FEP-Rechnungen, d. h. den Stellen, an denen Atome auftreten oder verschwinden, gibt, denn die Kräfte, die in diesen Fällen bei MD-Simulationen unendlich werden, werden bei MC-Simulationen nicht verwendet. Die berechneten und die experimentell ermittelten Differenzen der ΔG -Werte (Tabelle 1) stimmen vernünftig überein. Es gibt keine qualitativ bedeutenden Fehler, und der mittlere quantitative Fehler ist $< 1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Der Höcker wirkt deutlich destabilisierend auf den Komplex mit CyP ($\Delta G_2 - \Delta G_1$), während er die Stabilität des Komplexes mit dem Loch-Protein nahezu nicht beeinflusst ($\Delta G_4 - \Delta G_3$). Für die Bindungsstärke beim Höcker-Loch-Paar im Vergleich zu der beim Referenz-

Tabelle 1. Berechnete und experimentelle ΔG -Werte [kcal mol^{-1}] für die Prozesse in Schema 1 mit L = CsA, bL = Melle11-CsA, P = CyP und hP = F113A-CyP.

$\Delta \Delta G$	exp. [a]	ber. [b]
$\Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_{\text{bLP}} - \Delta G_{\text{bL}}$	> 3.7	2.9 ± 0.2
$\Delta G_4 - \Delta G_1 = \Delta G_{\text{bLP}} + \Delta G_{\text{bLhP}} - \Delta G_{\text{bL}} - \Delta G_{\text{hP}}$	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.3
$\Delta G_3 - \Delta G_1 = \Delta G_{\text{hLP}} - \Delta G_{\text{hP}}$	1.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3
$\Delta G_4 - \Delta G_3 = \Delta G_{\text{bLhP}} - \Delta G_{\text{bL}}$	0.0 ± 0.2	-0.1 ± 0.2

[a] Lit. [3]. [b] Diese Arbeit.

komplex, $\Delta G_4 - \Delta G_1$, ergab sich ein $0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ niedrigerer Wert, als experimentell ermittelt wurde.

Auf der Grundlage dieser vernünftigen thermodynamischen Ergebnisse wurden die Strukturen aus den Simulationen analysiert, um eine Erklärung dafür zu finden, warum der Wechsel von MeVal11 zu Melle11 den ΔG -Wert der Komplexbildung mit CyP um ca. 3 kcal mol^{-1} stärker beeinflusst als den der Komplexbildung mit der F113A-Mutante. Die Diederwinkelverteilungen zeigten keine auffällenden Differenzen für den Liganden und die Proteinseitenketten. Die Analyse der Wasserstoffbrückenbindungen ergab ebenfalls keinen eindeutigen Vorteil des einen Proteins gegenüber dem anderen. Im Kristall lassen sich vier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen CsA und CyP identifizieren: MeBmt1-O...Gln63-HN^e, Abu2-HN...Asn102-O, MeLeu9-O...Trp121-HN^e und MeLeu10-O...Arg55-HNⁿ. Bei den Simulationen zeigten die CsA-Reste 1–3 beträchtliche strukturelle Veränderungen: Die erste Wasserstoffbrückenbindung ist in allen Komplexen erheblich verlängert; die zweite ist ebenfalls verlängert, wenn die Mutation nahe dem Melle11-Ende ist. Jedoch trat dies bei beiden Proteinen auf und kann somit die bevorzugte Bindung an die F113A-Mutante nicht erklären.

Zuletzt wurden sterische Wechselwirkungen durch Bestimmung der mittleren Abstände zwischen C^δ des Melle11-Rests und allen Atomen in den Bindungstaschen beider Proteine über 10^6 Konfigurationen analysiert. Diese Abstände wurden dann verwendet, um die mittleren Lennard-Jones-Wechselwirkungsenergien für jedes Paar zu berechnen. Die ungünstigsten Wechselwirkungen in den beiden Bindungstaschen sind in Abbildung 4 dargestellt. Beim Wildtyp-Protein treten ungünstige Wechselwirkungen zwischen Melle-C^δ und Phe60-C^ε, Met61-C^γ sowie Phe113-C^ε und -C^δ auf (Abb. 4 oben); die mittleren Lennard-Jones-Wechselwirkungen sind mit ca. $0.5\text{--}0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ repulsiv, und die mittleren C-C-Abstände betragen rund $3.3\text{--}3.5 \text{ Å}$. Damit wurden Phe60 und Met61 neben dem bisher veränderten Rest Phe113 (F113A-[¹³] und F113G-Mutanten[¹⁶]) als zusätzliche Kandidaten identifiziert, deren Verkleinerung zur Bildung eines Lochs für die Aufnahme des statt MeVal11 eingeführten Höckers führen sollte. Das Loch in F113A-CyP ist eigentlich zu groß,[^{13, 16}] womit es weniger massive Mutationen, wie es Änderung bei Met61 wären, wert sind, erforscht zu werden. Betrachtet man die F113A-Mutante, so zeigen sich keine nachteiligen Wechselwirkungen mit Melle11-C^δ mehr (Abb. 4 unten): Die kürzesten C-C-Abstände betragen etwa $3.8\text{--}3.9 \text{ Å}$, und die mittleren Wechselwirkungsenergien sind nahe null. Es ist bemerkenswert, daß zwei Wassermoleküle helfen, den freien Raum in der Bindungstasche der F113A-Mutante zu füllen. Dies macht den Komplex tolerant gegenüber dem zu großen Loch, sogar in einer hydrophoben Tasche wie der von CyP.

Die fünf hier untersuchten Mutationen ermöglichten die detaillierte thermodynamische und strukturelle Beschreibung eines Höcker-Loch-Paares. Die Rechnungen reproduzierten die beobachteten relativen Bindungsenergien gut, und die Analyse der erzeugten Strukturen bestätigte, daß die Unterschiede in den

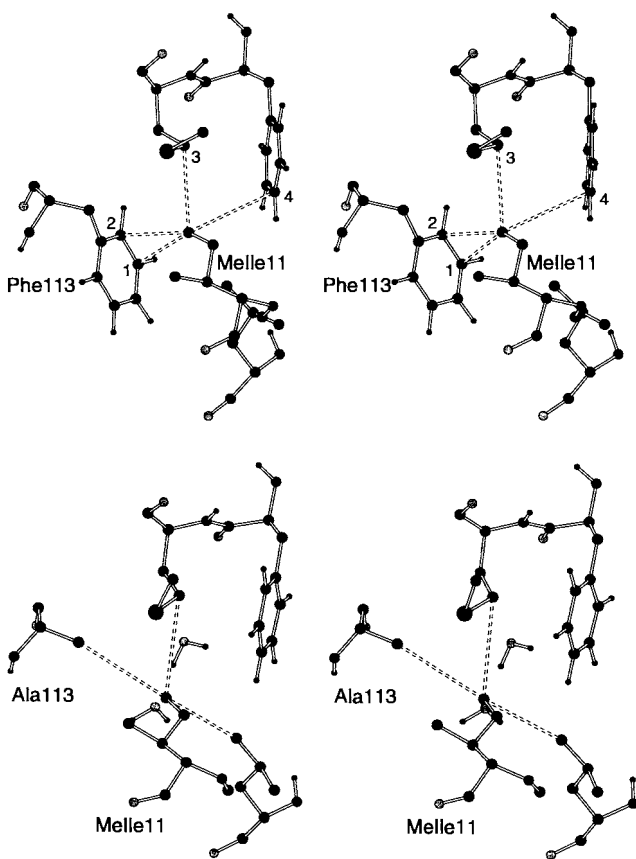


Abb. 4. Stereobilder zur Veranschaulichung der vier (oben) und der drei ungünstigsten Kontakte (unten) zwischen dem Melle11-C δ -Atom und der CyP-Bindungstasche bzw. der Bindungstasche der F113A-Mutante von CyP. Die mittleren Werte für die eingezeichneten Abstände und die zugehörigen Lennard-Jones-Wechselwirkungsenergien sind für die C δ -CyP-Wechselwirkung: zu Phe113: 3.42 Å, + 0.49 kcal mol $^{-1}$ und 3.39 Å, + 0.58 kcal mol $^{-1}$; zu Met61: 3.54 Å, + 0.63 kcal mol $^{-1}$; zu Phe60: 3.33 Å, + 0.84 kcal mol $^{-1}$; für die C δ -CyP(F113A)-Wechselwirkung: zu Ala113: 3.91 Å, 0.00 kcal mol $^{-1}$; zu Met61: 3.92 Å, - 0.05 kcal mol $^{-1}$; zu Leu122: 3.80 Å, 0.14 kcal mol $^{-1}$.

Bindungsstärken sterische Gründe haben, und legte alternative Proteinmutationen nahe. Auch wenn eine noch bessere quantitative Übereinstimmung durch umfangreicheres Modeling und die Verwendung des OPLS-AA-Kraftfeldes^[17] erwartet werden kann, etablieren diese ersten MC/FEP-Ergebnisse doch bereits die Methode als vielversprechendes Werkzeug zum Studium von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter Einschluß des Designs und des Verständnisses von orthogonalen Rezeptor-Ligand-Paaren.

Eingegangen am 12. Dezember 1996 [Z9883]

Stichworte: Cyclophilin · Cyclosporin · Gentechnik · Molekulare Erkennung · Monte-Carlo-Verfahren

- [1] a) D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, 262, 1019; b) P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4604; c) D. M. Spencer, P. J. Belshaw, L. Chen, S. N. Ho, F. Randazzo, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1996**, 1, 839; d) S. N. Ho, S. R. Biggar, D. M. Spencer, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Nature* **1996**, 382, 822.
- [2] V. M. Rivera, T. Clackson, S. Natesan, R. Pollock, J. F. Amara, T. Keenan, S. R. Magari, T. Phillips, N. L. Courage, F. Cerasoli, Jr., D. A. Holt, M. Gilman, *Nature Med.* **1996**, 2, 1028.
- [3] P. J. Belshaw, J. G. Schoepfer, K.-Q. Liu, K. L. Morrison, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2313; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2129.
- [4] W. L. Jorgensen, *Chemtracts Org. Chem.* **1991**, 4, 91; P. A. Kollman, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2395.

- [5] W. L. Jorgensen, MCPRO, Version 1.3, Yale University, New Haven, CT, **1995**.
- [6] W. L. Jorgensen, E. M. Duffy, J. W. Essex, D. L. Severance, J. F. Blake, D. K. Jones-Hertzog, M. L. Lamb, J. Tirado-Rives, *NATO ASI Ser. Ser. C* **1997**, im Druck; J. W. Essex, J. Tirado-Rives, D. L. Severance, W. L. Jorgensen, *J. Phys. Chem.*, eingereicht.
- [7] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 14508.
- [8] Siehe beispielsweise W. L. Jorgensen, T. B. Nguyen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1194; E. M. Duffy, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6337.
- [9] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1657; W. L. Jorgensen, D. L. Severance, *ibid.* **1990**, 112, 4768.
- [10] H. Ke, *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 539.
- [11] H. Ke, D. Mayrose, P. J. Belshaw, D. G. Alberg, S. L. Schreiber, Z. Y. Chang, F. A. Etzkorn, S. N. Ho, C. T. Walsh, *Structure* **1994**, 2, 33.
- [12] R. B. Knott, J. Schefer, B. P. Schoenborn, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1990**, 46, 1528.
- [13] D. Altschuh, O. Vix, B. Rees, J.-C. Thierry, *Science* **1992**, 256, 92.
- [14] D. A. Pearlman, D. A. Case, J. C. Caldwell, G. L. Seibel, U. C. Singh, P. Weiner, P. A. Kollman, AMBER 4.0, University of California, San Francisco, **1991**.
- [15] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 126.
- [16] P. J. Belshaw, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1805.
- [17] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11225.

Vollständige enantiotopie Differenzierung zwischen den Kohlenstoffatomen einer Doppelbindung bei der Umsetzung von Diolaten mit *meso*-Bis(phenylsulfonyl)alkenen – Synthese enantiomerenreiner Ketone**

Sergio Cossu,* Ottorino De Lucchi* und Paolo Pasetto
Professor Waldemar Adam zum 60. Geburtstag gewidmet

Die enantiotopie Differenzierung zwischen zwei funktionellen Gruppen einer *meso*-Verbindung ist ein bekanntes und bequemes Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen, bei dem die Abtrennung und Entsorgung des nicht gewünschten Enantiomers umgangen wird.^[1] Dieses manchmal als „*meso*-Trick“ bezeichnete Verfahren wird gewöhnlich auf Diester oder andere Verbindungen mit Paaren enantiotoper funktioneller Gruppen angewendet und oft enzymatisch durchgeführt.^[2] Die enantiotopie Unterscheidung zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen ist sehr selten, und abgesehen von der Umlagerung bei *meso*-Epoxiden^[3] sind nahezu keine Beispiele für die Anwendung des *meso*-Tricks bei Alkenen bekannt.^[4] Wie hier beschrieben wird, reagieren *meso*-Alkene, die an den Doppelbindungen zwei Phenylsulfonylgruppen aufweisen, mit Salzen von Alkoholen und Diolen quantitativ zu vollständig unsymmetrischen Verbindungen. Wir stellen damit eine Methode zur enantiotopen Differenzierung^[4] der Kohlenstoffatome einer Doppelbindung vor. Die Reaktion liefert diastereo- und enantiomerenreine Ketone, die auf konventionellen Wegen schwer zugänglich sind und in Synthesen zahlreicher Naturstoffe,^[5] Antibiotika^[6] und Wirkstoffe eingesetzt werden können, welche bei der Krebs-^[7] und AIDS-Behandlung^[8] eine Rolle spielen.

[*] Dr. S. Cossu, Prof. Dr. O. De Lucchi, Dr. P. Pasetto
Dipartimento di Chimica, Università Ca' Foscari di Venezia
Dorsoduro 2137, I-30123 Venezia (Italien)
Telefax: Int. +41/529-8517
E-mail: delucchi@unive.it

[**] Diese Arbeit wurde vom CNR (Rom) unterstützt. Wir danken Prof. R. Ballini (Universität Camerino, Italien) für hilfreiche Anregungen.