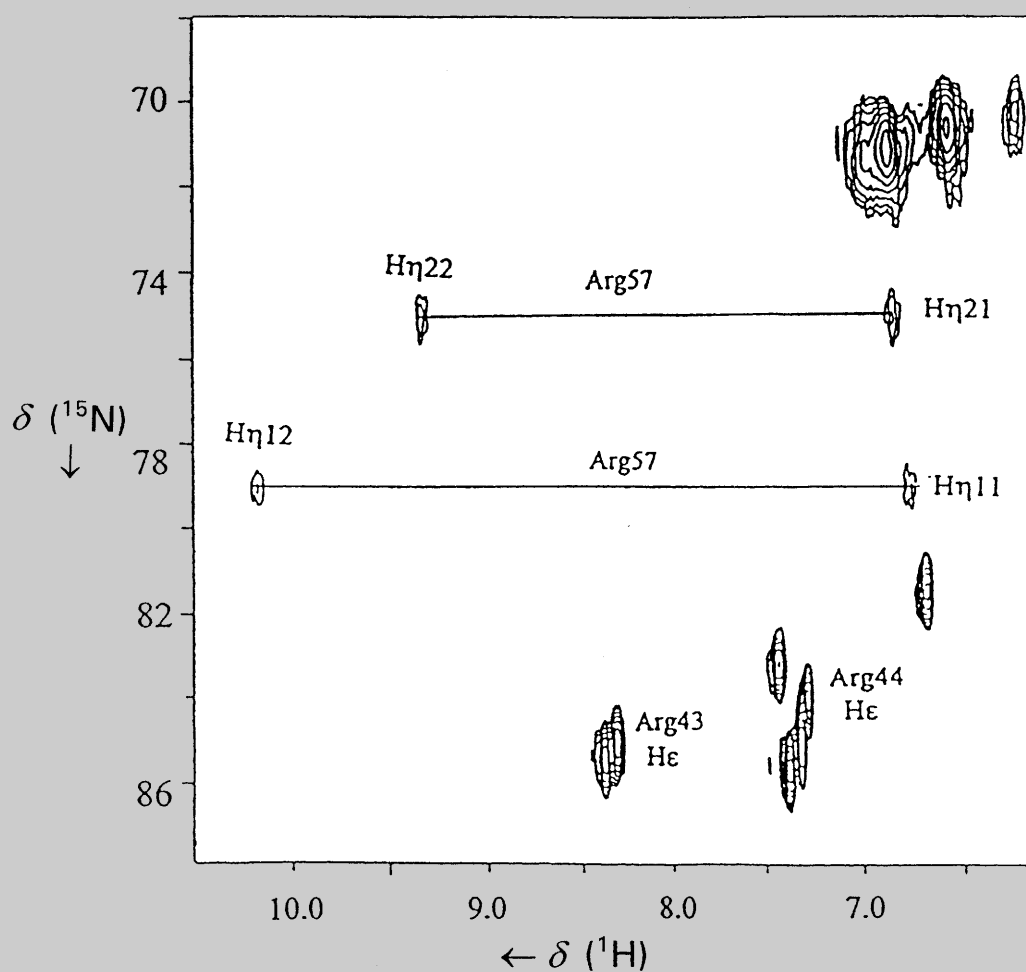
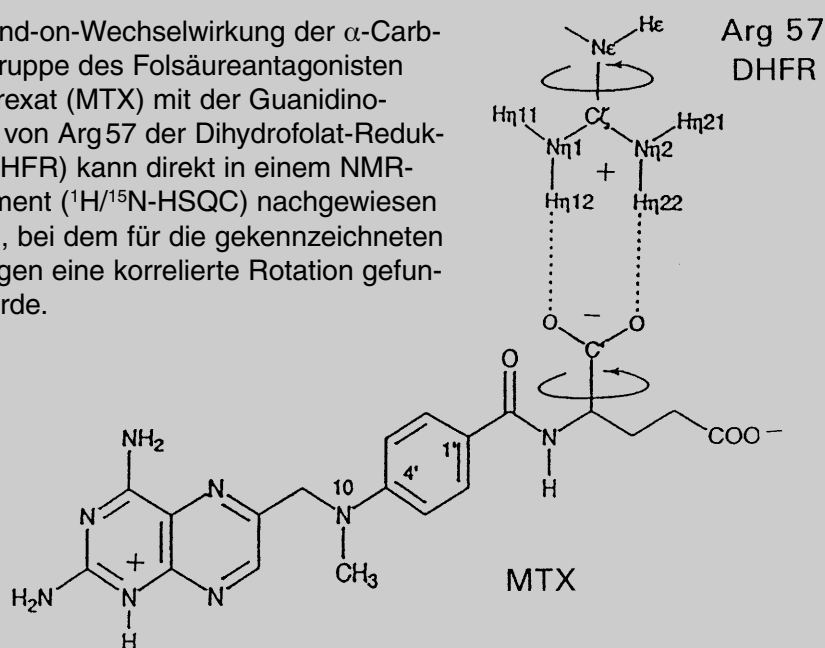


Die End-on-Wechselwirkung der α -Carboxylatgruppe des Folsäureantagonisten Methotrexat (MTX) mit der Guanidino-Gruppe von Arg57 der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) kann direkt in einem NMR-Experiment ($^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC) nachgewiesen werden, bei dem für die gekennzeichneten Bindungen eine korrelierte Rotation gefunden wurde.



NMR-Untersuchungen zur Ligandenbindung an Dihydrofolat-Reduktase

James Feeney*

Erst vor 50 Jahren beschrieben Farber und Mitarbeiter, dass die Behandlung mit dem Folsäure-Antagonisten Aminopterin ein Nachlassen einiger Formen von Leukämie bei Kindern bewirken kann. Zuvor hatte man bereits die Wirkung von Substanzen auf 2,4-Diaminopyrimidin-Basis als Folsäure-Antagonisten erkannt – bahnbrechende Arbeiten, die zur Entwicklung von Wirkstoffen wie Trimethoprim (antibakteriell) und Pyrimethamin (Anti-Malaria-Wirkung) führten. Die medizinische Bedeutung dieser Arbeiten wurde 1988 anerkannt, als Hitchings und Elion sich den Nobelpreis für Physiologie und Medizin teilten (zusammen mit Black), womit ihre Untersuchungen über Inhibitoren des Purin- und Pyrimidinmetabolismus gewürdigt wurden. Das Zielenzym für die Folsäure-Antagonisten ist die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), und ihre Entdeckung durch Futterman 1957 löste

eine bis heute anhaltende Flut von Arbeiten aus. Komplexe von DHFR mit kleinen Molekülen wurden frühzeitig zum Zielobjekt für das Studium von Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen; wegen der Möglichkeit, Forschungen auf molekularer Ebene an einem wohldefinierten System von medizinischer Bedeutung durchzuführen, zogen sie die Aufmerksamkeit nicht nur der Pharmakologen und Biochemiker, sondern auch der Chemiker und Physiker auf sich. Nach der Entdeckung des Enzyms wurden die DHFRs verschiedenster Herkunft gereinigt und detailliert biochemisch und biophysikalisch untersucht. Mehr als 60 Strukturen von DHFR-Komplexen wurden bislang durch Röntgenstrukturuntersuchungen aufgeklärt. Diese Strukturen ermöglichten ein Verständnis des Mechanismus der Enzymwirkung und halfen beim Aufbau von Strukturmodellen von DHFR-Kom-

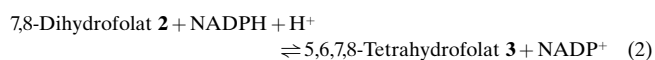
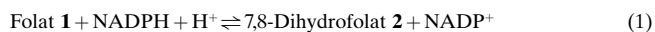
plexen mit neuartigen Inhibitoren. Erst kürzlich wurde die NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der Strukturen von DHFR-Komplexen in Lösung eingesetzt. Die größten Stärken der NMR-Methoden liegen dabei in ihrer einzigartigen Möglichkeit, spezifische Wechselwirkungen von Enzymen mit Substraten oder Substrat-Analoga auszuloten, die vielfältigen Konformationen der Komplexe zu charakterisieren und die zahlreichen dynamischen Prozesse in derartigen Systemen zu untersuchen. Solche Untersuchungen von Komplexen der Dihydrofolat-Reduktase werden in diesem Aufsatz beschrieben.

Stichwörter: Enzyme • NMR-Spektroskopie • Proteindynamik • Protein-Liganden-Wechselwirkungen • Proteinstrukturen • Wirkstoff-Forschung

1. Einleitung

Gegenwärtig besteht ein großes Interesse daran, die molekularen Erkennungsprozesse zu untersuchen, die an der Bildung von Wirkstoff-Rezeptor-Komplexen beteiligt sind. Ansporn für diese Untersuchungen ist die Annahme, dass ein Verständnis der molekularen Ursprünge der Bindungsspezifität schließlich eine verlässliche Grundlage für ein rationales Wirkstoff-Design liefern könnte. Eines der dabei am gründlichsten untersuchten Systeme bilden das Enzym

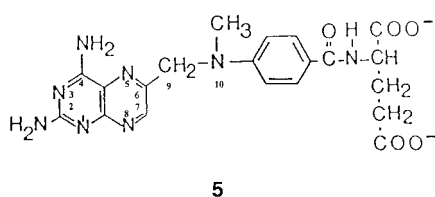
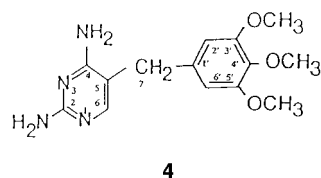
Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und seine Wechselwirkungen mit Folsäure-Antagonisten.^[1-27] Dieses Enzym katalysiert mit NADPH als Coenzym die Reduktion von Folat **1** über Dihydrofolat **2** zu Tetrahydrofolat **3** [Gl. (1, 2)].



DHFR ist ein essentielles zelluläres Enzym, da das Endprodukt seiner katalytischen Wirkung, Tetrahydrofolat, ein wichtiger, in vielen biochemischen Prozessen benötigter Ausgangsstoff ist, der für die Biosynthese der Purine, Pyrimidine und einiger Aminosäuren eine Rolle spielt.^[6] DHFR ist daher ein exzellentes Ziel für Wirkstoffe, die darauf abzielen, selektiv die Enzyme invasiver Zellen zu inhibieren. Es gibt zahlreiche klinisch nützliche Folsäure-

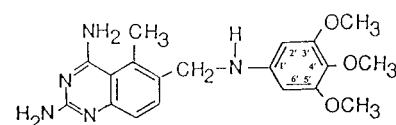
[*] J. Feeney
Molecular Structure Division
National Institute for Medical Research
The Ridgeway, Mill Hill
London, NW7 1AA (Großbritannien)
Fax: (+44) 181-906-4477
E-Mail: jfeeney@nimr.mrc.ac.uk

Antagonisten, darunter Trimethoprim **4** (antibakteriell), Methotrexat **5** (ein Antitumormittel) und Pyrimethamin **13** (ein Antimalariawirkstoff), die jeweils durch Inhibierung des Enzyms in parasitären oder malignen Zellen wirken. Trimethoprim z.B. hemmt die bakteriellen Enzyme 16500-mal effektiver als die entsprechenden Säugerenzyme.^[5]



Dihydrofolat-Reduktasen sind im Allgemeinen kleine Proteine (18000–25000 Da bei den meisten Arten), die weder Disulfidbrücken aufweisen noch Metallionen benötigen. Die Faszination, die von diesem Enzym ausgeht, beherrschte die Forschungsaktivitäten vieler Wissenschaftler, und der Fortschritt auf diesem Gebiet hat sich in zahlreichen Übersichten^[5–12] niedergeschlagen. Viele modifizierte DHFRs wurden durch gezielte Mutagenese hergestellt und untersucht, um bestimmte Fragen hinsichtlich der Enzymkatalyse oder der Ligandenbindung zu beantworten.^[27–31] Ausführliche Untersuchungen zur Bindung von Inhibitoren und Coenzymen an DHFR aus *Lactobacillus casei* wurden durchgeführt, und die Bindungskonstanten typischer binärer Komplexe wurden z. B. für Methotrexat **5** ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), Trimethoprim **4** ($2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), Trimetrexat **6** (ca. $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), NADPH ($1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) und NADP⁺ ($4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) bestimmt (K_a -Werte gemessen bei pH 6.5–7.0).^[32–35]

Die Bildung des ternären Komplexes mit NADPH und einem Substrat-Analogen geht häufig mit (positiven oder negativen) kooperativen Effekten einher, bei denen die



6

beiden Liganden gegenseitig ihre Bindung beeinflussen.^[34, 35] Diese Effekte können recht groß sein und in einigen Fällen die Bindung um einen Faktor von bis zu 2000 verändern. Unterschiede bei der kooperativen Bindung von Liganden an die Enzyme verschiedener Arten tragen manchmal zur Bindungsspezifität bei. So ist beispielsweise die spezifische Bindung von Trimethoprim an bakterielle Enzyme statt an Säugerenzyme teilweise auf Unterschiede in der Kooperativität der Bindung von NADPH zurückzuführen: Der Kooperativitätsfaktor von 200, der für die Bindung an bakterielle Enzyme beobachtet wird, ist in Komplexen mit Säugerenzymen stark herabgesetzt.^[33] Da es wahrscheinlich ist, dass der ternäre DHFR-NADPH-Inhibitor-Komplex das therapeutisch relevante Agens ist, sollten solche Coenzymwirkungen auf die Bindungsspezifität von bedeutendem Einfluss auf das Design von Wirkstoffen sein. Obwohl DHFR ausführlich untersucht wurde, verbleiben doch noch viele unbeantwortete Fragen bezüglich der Ursachen der Bindungsspezifität und Kooperativität.

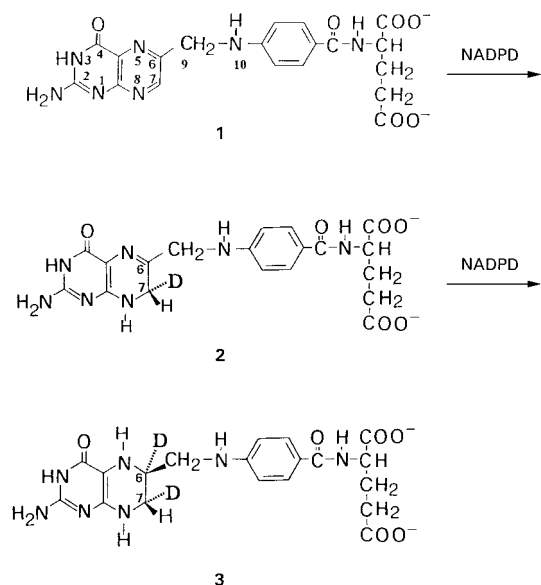
Die Strukturen vieler DHFR-Komplexe wurden durch Röntgenkristallographie aufgeklärt,^[13–16] und die so erhaltenen Strukturdaten wurden bei der Modellierung der Strukturen verwandter Ligandenkomplexe von DHFR mit quantenchemischen Methoden herangezogen.^[36, 37] In den vergangenen Jahren ermöglichten die Fortschritte bei den NMR-Methoden die Strukturaufklärung von mittelgroßen Proteinen, und die Strukturen zahlreicher Dihydrofolat-Reduktase-Komplexe wurden mittlerweile veröffentlicht.^[17–21] Die größte Stärke der NMR-Methoden ist aber ihre Fähigkeit, Informationen zu liefern, die durch andere Methoden nicht zugänglich sind. So hat sich z.B. die NMR-Spektroskopie als hervorragende Methode zur Untersuchung von spezifischen Protein-Liganden-Wechselwirkungen, multiplen Konformationen und dynamischen Prozessen in Protein-Liganden-Komplexen erwiesen.^[22–26]



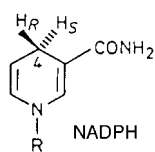
James Feeney wurde 1936 in St. Helens, England, geboren. Er studierte und promovierte an der University of Liverpool (B.Sc. 1958, Ph.D. 1960) und erhielt 1975 einen D.Sc. von der Universität. Von 1960–1964 war er Lecturer an der University of Liverpool. Er kam dann zu Varian Associates und wurde schließlich zum Direktor der Varian European Laboratories in Zürich (1967–1969) ernannt. Seit 1969 arbeitete er mit dem Medical Research Council, zunächst an der MRC Molecular Pharmacology Unit, dann am National Institute for Medical Research, Mill Hill (1972 bis jetzt). Dr. Feeney ist Head of the Molecular Structure Division (seit 1989) und Controller of the MRC Biomedical NMR Centre (seit 1980) am National Institute of Medical Research. Er ist Gastprofessor an der University of Surrey, Fellow der Royal Society of Chemistry und bekam die Ehrendoktorwürde der Universität von Roskilde, Dänemark, verliehen.

2. Einblicke in den Wirkungsmechanismus von Dihydrofolat-Reduktase

DHFR reduziert Folat **1** zunächst zu 7,8-Dihydrofolat und danach zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolat [Gl. (1, 2)], wobei in der durch das Enzym aus *L. casei* katalysierten Reaktion die Folatreduktion um den Faktor 100 langsamer ist als die anschließende Reduktion des 7,8-Dihydrofolats.^[38] Die Reduktion des 7,8-Dihydrofolats beinhaltet den Transfer des 4-pro-*R*-Wasserstoffatoms von NADPH auf die C6-Position des Dihydrofolats.^[39, 40] Wir verwendeten NMR-Methoden, um die regiochemischen Aspekte dieses Reduktionsvorgangs zu ermitteln. Zu diesem Zweck stellten wir selektiv deuteriertes 5,6,7,8-Tetrahydrofolat her, indem wir Folat **1** mit *L. casei*-DHFR und mit spezifisch an der 4-pro-*R*-Position deuteriertem NADPH reduzierten.



Daraufhin bestimmten wir die Deuterierungspositionen im Produkt durch Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der deuterierten und nicht deuterierten Tetrahydrofolate. Die Deuteriumatome, die an die C6- und C7-Positionen übertragen wurden, wurden beide an die gleiche Seite des Pterinrings addiert^[41, 42] (siehe Struktur **3**). Die Konfiguration des Wasserstoffatoms an der 6-Position des Tetrahydrofolats war bereits durch frühere Röntgenstrukturanalysen^[43, 44] als 6*S* erkannt worden. Somit ergaben die NMR-Untersuchungen für die enzymatische Deuterierung von Folat, dass die Konfiguration des addierten Protons an der 7-Position 7*S* war, das Proton sich also an der gleichen Seite befand wie das an der 6-Position. In der Struktur des Komplexes von DHFR mit Methotrexat **5** (MTX) und NADPH im Kristall^[13, 14] befindet sich das „übertragene“ Proton 4-*H_R* von NADPH in der Nähe derjenigen Seite des MTX-Pteridinrings, die entgegengesetzt der Seite ist, die die Protonen der Folatreduktion aufnehmen.^[13, 14, 41–45] Obwohl Methotrexat **5** und Folat **1** ähnliche Strukturen haben, die sich nur an den Positionen C4 und N10 unterscheiden, bindet der Pteridinring von **5** also in einer anderen Anordnung an



DHFR, als es **1**^[41, 42] und 7,8-Dihydrofolat^[13, 43, 45] tun. Dies wurde durch spätere Röntgenstruktur^[16] und NMR-Untersuchungen^[27, 46] bestätigt, bei denen festgestellt wurde, dass der Pterin-Ring im DHFR-Folat-Komplex in Bezug auf den im DHFR-MTX-Komplex um etwa 180° gedreht war. Dass derart ähnliche Moleküle in solch unterschiedlicher Weise binden können, unterstreicht die Bedeutung detaillierter Strukturstudien für das Inhibitor-Design.

Der Mechanismus der Protonierung von N8 (bei Folat) und N5 (bei Dihydrofolat) als erster Stufe jedes Reduktionsschritts wird noch immer nicht vollständig verstanden. Selinsky und Mitarbeiter^[47] untersuchten die binären Komplexe von Rinder-DHFR mit Folat und Dihydrofolat (markiert mit ¹⁵N an N5 und ¹³C an C6) und zeigten, dass N5 in keinem der Komplexe protoniert wurde. Mutagenese-Studien, in denen Asp27 der *E. coli*-DHFR modifiziert wurde, hatten diese Gruppe indirekt mit der enzymatischen Reduktion in Zusammenhang gebracht.^[31] Asp27 ist der einzige Strukturteil mit ionisierbarer Gruppe, der sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindet (entsprechend Asp26 in *L. casei*-DHFR und Glu30 in humaner DHFR). Die Struktur im Kristall^[16] spricht dafür, dass dieses Fragment sich weder zu N8 noch zu N5 in ausreichender Nähe befindet, um an einer direkten Protonierung beteiligt zu sein. Die Sauerstoffatome der Carboxygruppe der konservierten Asp-Gruppe bilden Wasserstoffbrücken zu einem der Protonen der 2-NH₂-Gruppe und zum N3-Proton des Folats.^[48, 49] Es wurden Protonierungswege für N8 und N5 vorgeschlagen, in denen das Asp-Fragment die Bildung einer protonierten Enolform des Pteridinrings als Zwischenstufe vor der Reduktion an N5 fördert (Cannon et al.^[50] führten Rechnungen durch, nach denen die Bildung eines Enoltautomers des Substrats möglich erschien).

Dagegen ergaben aber Untersuchungen der binären Komplexe von ¹³C- und ¹⁵N-markierten Folaten, dass das gebundene Folat für die humanen und bakteriellen Enzyme in der Ketoform vorliegt.^[46–49] Blakley et al. zeigten auch,^[49] dass N3 im Folatkomplex mit humaner DHFR sogar noch bei einem pH-Wert von 9.5 protoniert bleibt. Sie bemerkten das bevorzugte Vorliegen der Imino-Keto-Form von gebundenem Folat und schlossen daraus, dass Protonierungsmechanismen, die Enolformen durchliefen, sehr unwahrscheinlich sein dürften. Blakley und Mitarbeiter^[49] entdeckten keine Änderung des Ionisierungszustandes der Glu30-Carboxylatgruppe in einem pH-Bereich von 5 bis 7 im binären Komplex von Folat mit humaner DHFR und schlossen daher, dass die Ionisierung von Glu30 höchstwahrscheinlich nicht die Ursache der pH-Abhängigkeit des Hydridtransfers ist (scheinbarer p*K* ≈ 6).

Ähnliche Ergebnisse wurden für das äquivalente Asp26 im Komplex von *L. casei*-DHFR mit Folat gefunden.^[51] Oefner und Mitarbeiter^[16] entdeckten bei ihren Kristallstrukturuntersuchungen von Komplexen humaner DHFR mit Folat ein gebundenes Wassermolekül in der Nähe von N5 und schlugen daher dieses als wahrscheinlichen Vermittler der Protonenübertragung auf N5 vor. Ein entsprechendes Wassermolekül wurde auch bei Röntgenstruktur^[14] und NMR-Untersuchungen^[54] des Komplexes DHFR-MTX-NADPH entdeckt (das Wassermolekül 253 in Abbildung 1) sowie bei NMR-Unter-

DHFR mit Methotrexat getroffen waren, war es verhältnismäßig einfach, diese auf verwandte Komplexe zu übertragen, da in den 2D-NMR-Spektren der verschiedenen Komplexe Ähnlichkeiten in den Verknüpfungsmustern zu erkennen waren.

Als die heute üblichen NMR-Methoden für die Sequenzzuordnung von Proteinen noch nicht zur Verfügung standen, wurden die Signale oft nach NOE-Messungen von Kernen, die in der Struktur des Komplexes im Kristall benachbart waren, korreliert und zugeordnet.^[76] Dabei wird angenommen, dass die Strukturen in Lösung und im Kristall annähernd gleich sind. Viele der frühen Zuordnungen für Komplexe der *L.-casei*-DHFR wurden auf diesem Wege erhalten, und sie zeigten vollständige Übereinstimmung mit den später durch NMR-Methoden getroffenen Sequenzzuordnungen.^[61, 62, 76] Die Zuordnungsmethode auf der Grundlage von Kristallstrukturdaten ist nach wie vor ein wertvoller Weg für sehr große Proteine (>50 kDa), bei denen die skalaren Kopplungen zwischen den Kernen schwierig zu detektieren sind.

Die selektive Isotopenmarkierung von DHFR wurde angewendet, um die Spektren und die Signalzuordnung zu vereinfachen. Viele selektiv deuterierte *L.-casei*-DHFRs wurden durch biosynthetischen Einbau entsprechender deuterierter Aminosäuren hergestellt; durch Vergleich der Spektren der nicht deuterierten und der selektiv deuterierten Proben war es möglich, diejenigen ¹H-Signale zu entdecken und zuzuordnen, die nur in den Spektren der nicht deuterierten Proben vorkamen.^[77–82] Durch Interpretation der 2D-COSY-Spektren von DHFR, die γ -Me-deuteriertes Valin^[78, 79] und α -deuteriertes Valin^[80] enthielt, war es möglich, die Signale der Protonen zuzuordnen, die sich normalerweise an den deuterierten Positionen befinden. Wir stellten *L.-casei*-DHFR her, die (2*S*,4*R*)-[5,5,5-²H₃]Leucin^[81] enthielt, und erstellten stereospezifische Zuordnungen für die Leu-Methylgruppen, indem wir die ¹H-COSY-Spektren der deuterierten mit denen nicht deuterierter Proben verglichen (Abbildung 3).

In einigen Experimenten wurden auch *L.-casei*-DHFR-Proben mit mehreren deuterierten Aminosäuren untersucht.^[79, 82] Dies ist besonders nützlich, wenn man die Signale aromatischer Aminosäuren und ihre NOE-Verknüpfungen untersuchen will. Das in Abbildung 4 gezeigte Spektrum demonstriert die damit erzielbaren bemerkenswerten Vereinfachungen. Eine Vereinfachung des Spektrums kann auch durch photochemische CIDNP-Experimente (CIDNP = chemically induced dynamic nuclear (spin) polarization) erreicht werden, um die Signale der an der Oberfläche des DHFR-Inhibitor-Komplexes zugänglichen aromatischen Gruppen zu verstärken.^[83]

Verschiedene ¹³C- und ¹⁹F-markierte Aminosäuren wurden auf biosynthetischem Weg in das Enzym eingebaut und dann in NMR-Messungen zur Untersuchung der Effekte der Ligandenbindung genutzt.^[84–86] Ein bemerkenswertes Resultat wurde mit einer 6-F-Trp enthaltenden *L.-casei*-DHFR erhalten, in der sich die Fluorsubstituenten von zwei der Trp-Gruppen (Trp5 und Trp133) in ausreichender räumlicher Nähe für eine skalare Through-Space-¹⁹F-¹⁹F-Kopplung befinden.^[84]

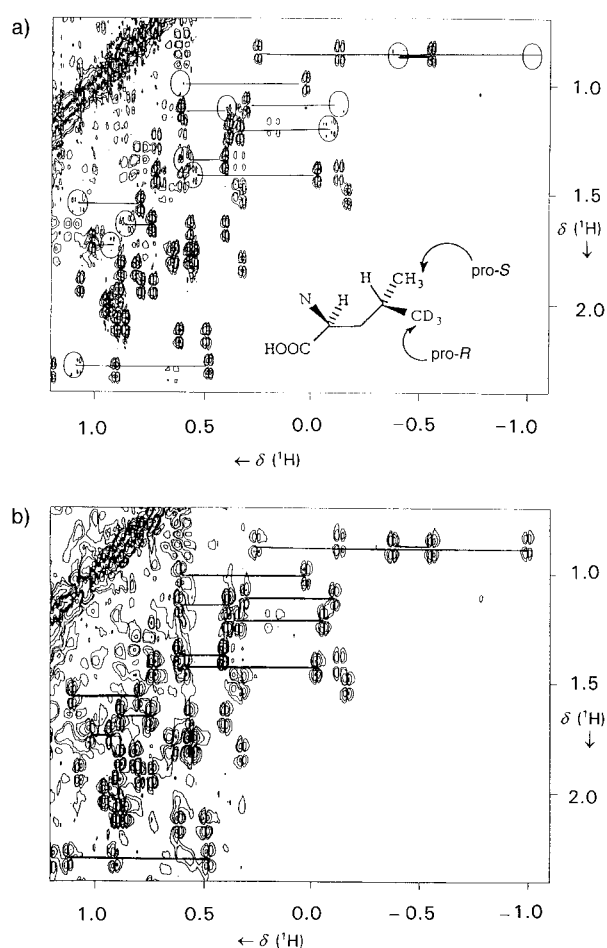


Abbildung 3. Der „aliphatische“ Hochfeldbereich des 2D-DQF-COSY-¹H-Konturplots des *L.-casei*-DHFR-MTX-Komplexes, aufgenommen bei 308 K. a) Der Komplex des selektiv deuterierten Enzyms mit (2*S*,4*R*)-[5,5,5-²H₃]Leucin; b) der Komplex des nicht deuterierten Enzyms. Die Positionen der Leucin-Kreuzsignale unter Beteiligung der 4-pro-*R*-Methylgruppe sind in (a) eingekreist, und die Methylpaare jedes Leucins sind durch Linien verbunden. (Wiedergabe mit Genehmigung von Ostler et. al.^[81])

3.2. Zuordnungen der NMR-Signale der Liganden

Die Kerne der Liganden sind ganz offensichtlich gut positioniert, um direkt Informationen über die Bindungsstelle im Komplex zu liefern. Die Zuordnungen der Ligandensignale sind daher von wesentlicher Bedeutung für detaillierte Strukturuntersuchungen, da sie den Ausgangspunkt für die Sammlung der intermolekularen Protein-Liganden-NOEs bilden, die für die Bestimmung weit reichender sterischer Wechselwirkungen benötigt werden. Für schwach bindende Liganden ($K_a \leq 10^3 \text{ M}^{-1}$), bei denen ein rascher Austausch zwischen gebundenem und freiem Zustand besteht, können die chemischen Verschiebungen des gebundenen Liganden leicht aus der Analyse der Bindungskurven berechnet werden.^[87, 88] Sehr fest gebundene Liganden ($K_a > 10^7 \text{ M}^{-1}$) zeigen ein stark verlangsamtes Austauschverhalten, so dass sich getrennte Signale für den gebundenen und den freien Liganden ergeben. Diese werden oft zugeordnet, indem isotopenmarkierte Analoga mit verschiedenen NMR-Experimenten untersucht werden. Bei den einfachsten Experimen-

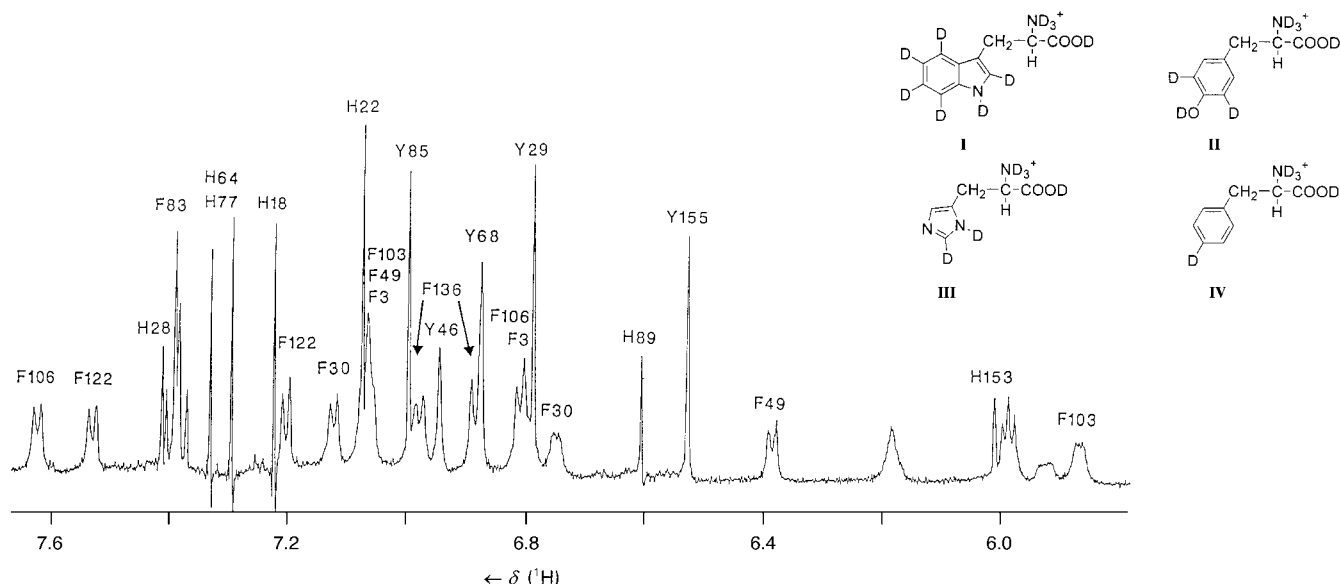


Abbildung 4. Der „aromatische“ Tieffeldbereich des auflösungsverbesserten ^1H -NMR-Spektrums eines selektiv deuterierten *L.-casei*-Dihydrofolat-Reduktase-Methotrexat-Komplexes, aufgenommen bei 600 MHz. Die selektiv deuterierten aromatischen Aminosäuren **I–IV** waren in die DHFR-Probe eingebaut. (Wiedergabe mit Genehmigung von Birdsall et al.^[82])

ten werden die mit dem markierten Liganden gebildeten Komplexe direkt ^{15}N - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch untersucht: Lediglich die Signale der Kerne an markierten Positionen werden beobachtet, und ihre Zuordnung ist normalerweise trivial. Zahlreiche derartige Studien wurden in unserem Labor durchgeführt, darunter solche mit isotope-markiertem Folat **1**,^[89, 90] Methotrexat **5**^[91] und Trimethoprim **4**.^[92–94]

Blakley und Mitarbeiter^[49] gingen auf die gleiche Weise vor, um isotope-markiertes Folat **1**, gebunden an humane DHFR, zu untersuchen. Huang und Mitarbeiter untersuchten entsprechend *E.-coli*-DHFR-Komplexe, die markiertes **1** und **4** enthielten.^[95, 96] Isotopen-Editieren oder Filter-Pulssequenzen können ebenfalls eingesetzt werden. Heteronucleare Mehrfach- und Einfach-Quantenkohärenz-Experimente (HMQC- bzw. HSQC) ermöglichen es, skalar gekoppelte $^1\text{H}/\text{X}$ -Paare selektiv zu detektieren (jedes charakterisiert durch seine ^1H - und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Frequenzen, wobei die X-Kerne indirekt über den ^1H -Kern detektiert werden).^[97, 98]

Für Komplexe mit weniger stark gebundenen Liganden ($K_a \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$) können die Dissoziationsgeschwindigkeiten ausreichen, um Magnetisierungstransfer-Experimente zu ermöglichen, so dass die getrennten Signale der gebundenen und freien Spezies miteinander in Beziehung gebracht werden können. Da die Zuordnungen der Signale der freien Liganden in der Regel als gesichert angesehen werden können, können daher die entsprechenden Signale der gebundenen Spezies zugeordnet werden. Wir haben Magnetisierungstransfer-Methoden verwendet, um die Signale von NADP^+ ,^[100] Trimethoprim **4**,^[101] Folat **1**^[32, 101] und Pyrimethamin-Analoga,^[102] gebunden an *L.-casei*-DHFR, zuzuordnen. Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden die ersten NOE-Transfer-Experimente zur Bestimmung intramolekularer NOEs in einem gebundenen Liganden durchgeführt.^[103, 104] Bei dieser Methode wird die Kreuzrelaxation (NOE) zwischen zwei Protonen des gebundenen Liganden durch Austausch zwischen gebun-

dener und freier Spezies auf das freie Molekül übertragen. Die negativen NOEs des gebundenen Zustands können daher an den Signalen des freien, in langsamem Austausch mit der gebundenen Spezies befindlichen Liganden gemessen werden (Abbildung 5) oder an gemittelten Signalen des freien und des gebundenen Liganden bei raschem Austausch.^[103] Quantitative Ergebnisse werden am günstigsten für Systeme mit raschem Austausch erhalten, in denen die Austauschgeschwindigkeiten deutlich höher sind als die Relaxationsgeschwindigkeiten des Protons im freien Liganden.^[105]

DHFR-Komplexe mit Liganden, die Isotope wie ^3H , ^{19}F und ^{31}P enthielten, wurden ebenfalls untersucht.^[102, 106–110] So wurde z. B. ^{19}F -NMR-Spektroskopie eingesetzt, um die Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit fluorhaltigen Pyrimethamin-Derivaten zu untersuchen; ihre einfachen ^{19}F -NMR-Spektren sind sehr gut geeignet, um die vielfältigen Konformationen und dynamischen Prozesse in den Komplexen zu verfolgen (siehe Abschnitt 8 über multiple Konformationen).^[102, 107, 110]

3.3. Liganden-Protein-NOE-Messungen

Das Isotopen-Editieren, das erstmals von Fesik und Mitarbeitern^[97] sowie von Otting und Wüthrich^[146] angewendet wurde, kann zur Bestimmung von Protein-Liganden-NOEs genutzt werden. Beispielsweise können in 2D-HMQC-NOESY-Experimenten NOEs zwischen Kernen der isotope-markierten Liganden und denen des Proteins gemessen werden. 3D-NOESY-HMQC ist eine leistungsfähige Erweiterung dieser Methode, die es ermöglicht, selektiv die NOEs zwischen Ligandenprotonen (gebunden an ^{13}C oder ^{15}N) und benachbarten Protonen im Protein zu detektieren, wobei die beobachteten NOESY-Kreuzsignale über den Bereich der chemischen Verschiebung des X-Kerns verteilt sind. Dies vereinfacht das NOESY-Spektrum bei jeder bestimmten X-Frequenz erheblich und ist daher sehr nützlich, wenn es

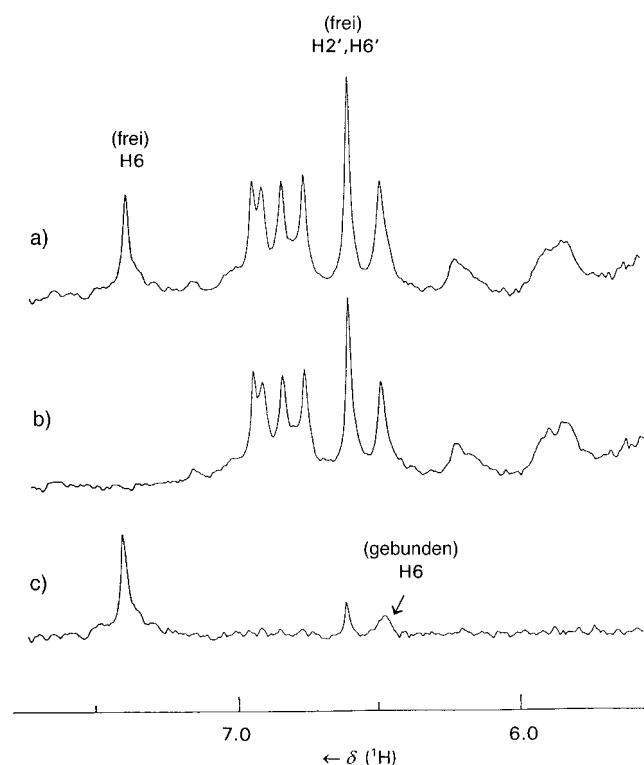


Abbildung 5. Arensignalbereich des bei 319 K gemessenen 270-MHz- ^1H -NMR-Spektrums einer selektiv deuterierten DHFR in Gegenwart von 2.7 Äquivalenten Trimethoprim **4**. a) Kontrollspektrum ohne Einstrahlung. b) Spektrum nach Einstrahlung bei der Frequenz des H6-Protons des freien Trimethoprims. c) Differenzspektrum; man erkennt einen negativen NOE zu H2'/H6' der freien Spezies ($\delta = 6.61$) und einen Magnetisierungstransfer auf H6 der gebundenen Spezies ($\delta \approx 6.5$). Übertragene NOEs^[103, 104] werden beobachtet zwischen den H6- und den H2'/H6'-Protonen des freien Trimethoprims in Gegenwart von an *L.-casei*-DHFR gebundenem Trimethoprim: Die in (b) und (c) bei Einstrahlung auf das H6-Signal der freien Spezies auf H2'/H6' übertragenen negativen NOEs werden durch Magnetisierungstransfer zwischen gebundenem und freiem Trimethoprim übertragen und spiegeln die negativen NOEs zwischen diesen Protonen in der gebundenen Spezies wider. (Wiedergabe mit Genehmigung von Cayley et al.^[104])

gilt, Proteinkomplexe zu untersuchen, bei denen Teile des 2D-NOESY-Spektrums durch Signalüberlappung kompliziert werden.^[98] Durch Anwendung solcher 2D- und 3D-Methoden haben wir auch Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit Trimethoprim **4**, die an den [1,3,2-Amino- ^{15}N]- oder den [7,4'-OCH $_3$ - ^{13}C]-Positionen^[17] markiert waren, untersucht und aus den gemessenen NOEs Informationen über die Trimethoprimbindungsstelle gewonnen. Die ^{15}N -editierten NOEs, die in den 2D-HMQC-NOESY- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Spektren dieses Komplexes gefunden wurden, zeigt Abbildung 6.^[17]

$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterte 2D-NOESY-Experimente bieten ebenfalls eine Möglichkeit zur Detektion der NOEs zwischen Protonen in unmarkierten Liganden und Protonen, die an ein ^{13}C -Atom in einem ^{13}C -markierten Protein gebunden sind: Abbildung 7 zeigt die Liganden-Protein-NOE-Verknüpfungen, die durch die N10-CH $_3$ -Gruppe und die α -CH-Protonen von nicht markiertem Methotrexat **5** an gebundener ^{13}C -markierter *L.-casei*-DHFR hervorgerufen werden.^[19] Alle NOEs zwischen an ^{13}C -Atome gebundenen Protonen wurden unterdrückt. Ähnliche Experimente mit $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -gefilterten

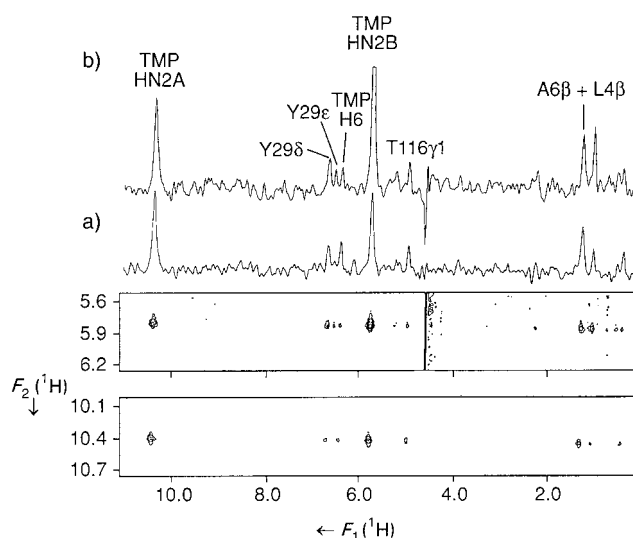


Abbildung 6. Teil des ^{15}N -editierten 2D-NOESY-Spektrums des Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit [1,2,3-Amino- ^{15}N]Trimethoprim (editiert bei $\delta(^{15}\text{N}) = 59.6$ bezogen auf NH_4Cl als externen Standard). Die oberen Bahnen zeigen die Reihen bei den Frequenzen der HN2A- und HN2B-Protonen, die sowohl intra- als auch intermolekulare NOEs erkennen lassen. (Wiedergabe mit Genehmigung von Martorell et al.^[17])

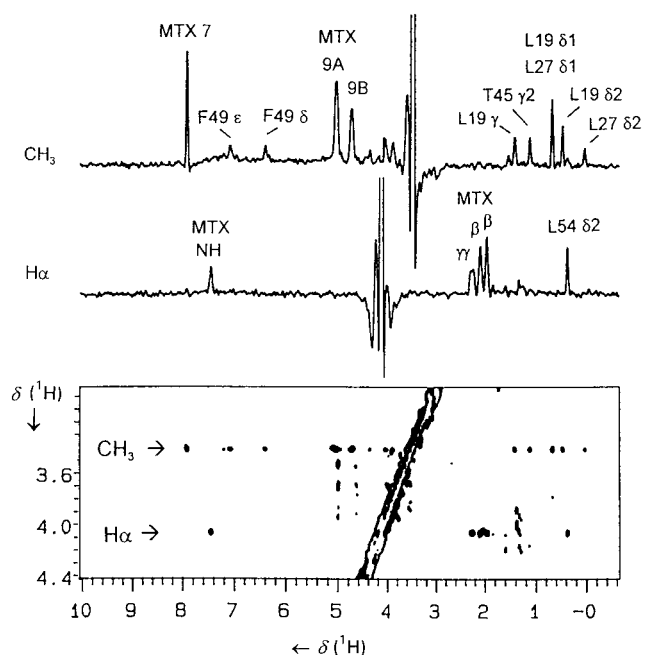


Abbildung 7. Teil eines $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -gefilterten 2D-NOESY-Spektrums, das mit einer Probe mit unmarkiertem Methotrexat **5** und ^{13}C -markierter *L.-casei*-DHFR aufgenommen wurde (308 K, pH 6.5). Es zeigt die NOEs, die durch die Methotrexat-N10-CH $_3$ -Gruppe und die H α -Protonen hervorgerufen werden. (Wiedergabe mit Genehmigung von Gargaro et al.^[19])

NOESY-Sequenzen wurden verwendet, um die NOEs zwischen NH-Protonen in unmarkierten Liganden und Protonen in ^{15}N -markierter DHFR zu detektieren.^[99] Abbildung 8 zeigt die Liganden-Protein-NOEs, die für **5** im Komplex mit *L.-casei*-DHFR bestimmt wurden.

Bei nicht markierten Liganden ist es manchmal möglich, aus den dynamischen Prozessen des gebundenen Liganden Nutzen zu ziehen, um die Zuordnung der Protein-Liganden-

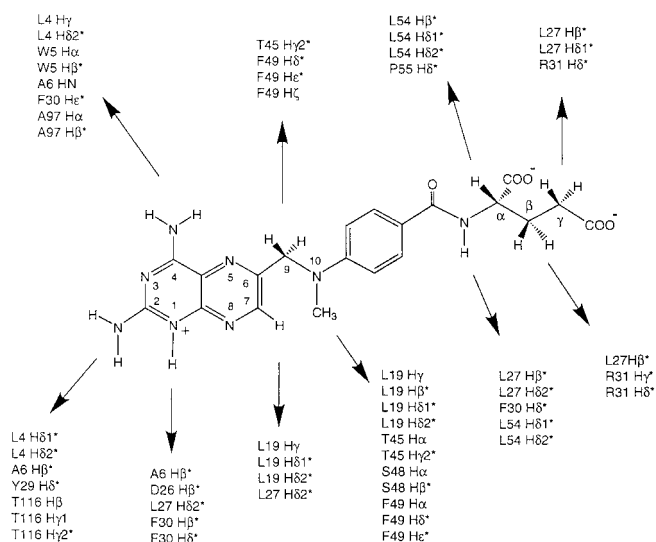


Abbildung 8. Intramolekulare Protein-Liganden-NOEs im DHFR-Methotrexat-Komplex. (Wiedergabe mit Genehmigung von Gargaro et al.^[19])

NOEs zu erleichtern. Zahlreiche NOEs wurden durch diese neuartige Methode nachgewiesen, indem der Einfluss der Temperatur auf die NOE-Signale beobachtet wurde, der aus den dynamischen Prozessen in Trimethoprim **6**, gebunden an DHFR, resultiert.^[20] Bei 278 K klappt der Trimethoxyring des gebundenen Trimethoprim hinreichend langsam um, um getrennte, gut aufgelöste Signale für die in langsamem Austausch befindlichen 3'- und 5'-OCH₃-Protonen zu ergeben, und diese liefern gute NOE-Kreuzsignale zu den Proteinsignalen. Bei höherer Temperatur verbreitern sich die Ligandensignale aufgrund des beschleunigten Umlappens, und ihre NOE-Kreuzsignale verschwinden. Dies ermöglicht es, die entsprechenden Signale, die lediglich in dem bei niedrigerer Temperatur aufgenommenen Spektrum beobachtet werden, als mit den Ligandenprotonen zusammenhängende NOEs zu identifizieren.

4. Strukturbestimmung von DHFR-Komplexen

In den vergangenen Jahren hat sich die NMR-Spektroskopie zu einer leistungsfähigen Methode zur Bestimmung der Strukturen von Proteinen in Lösung entwickelt.^[59, 111] Sobald die Signalzuordnungen einmal bekannt sind, ist es möglich, die NOE-Informationen und die Kopplungskonstanten aus den NMR-Spektren abzuleiten und sie zu nutzen, um eine Liste der Protonen-Protonen-Abstands- und Winkelbeschränkungen zu erhalten. Moleküldynamik-Rechnungen (simulated annealing) können anschließend durchgeführt werden, um Modelle der Proteinstruktur zu erhalten, die mit diesen Einschränkungen konsistent sind.^[112, 113]

Wir verwendeten derartige Methoden, um die dreidimensionalen Strukturen von Komplexen der Inhibitoren **4–7** mit *L.-casei*-DHFR zu bestimmen.^[17–20] Stereospezifische Zuordnungen und die möglichen Torsionswinkelbereiche wurden aus den NOE-Daten und Kopplungskonstanten mit dem Programm AngleSearch^[114] abgeleitet. Zahlreiche ¹³C- und ¹⁵N-Analoga von Trimethoprim **4** und Methotrexat **5** wurden

verwendet, um die isotope-editierten oder isotope-gefilterten Spektren zu erhalten, die für die Festlegung der Protein-Liganden-NOEs benötigt wurden. Die Strukturen der Komplexe wurden bestimmt, indem entweder konventionelle Moleküldynamik-Rechnungen oder diverse Docking-Methoden angewendet wurden. Beispielsweise wurde die dreidimensionale Struktur des Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit dem Antitumormittel Methotrexat **5** in Lösung^[19] dadurch bestimmt, dass 2531 Abstands-, 361 Diederwinkel- und 48 Wasserstoffbrückenbereiche durch die Analyse mehrdimensionaler NMR-Spektren erhalten wurden. Moleküldynamik-Rechnungen ergaben eine wohldefinierte Gruppe von Strukturen, die vollständig konsistent mit den ermittelten Wertebereichen war (Abbildung 9a).

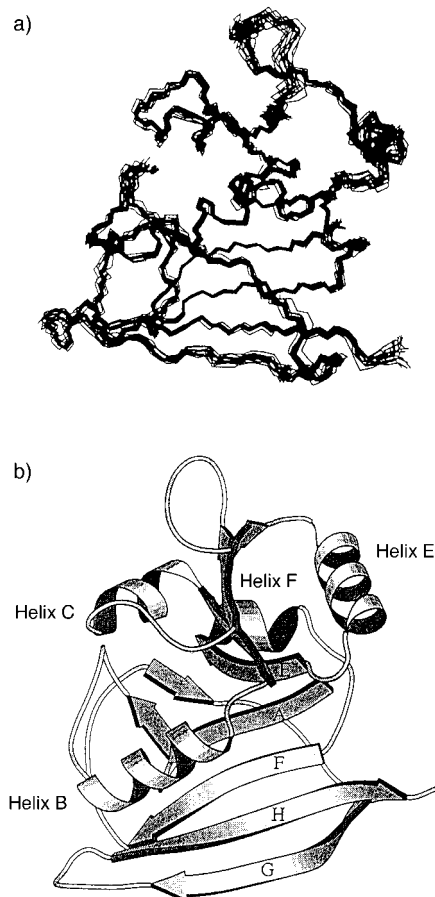


Abbildung 9. a) Überlagerung der Reste 1–162 im Rückgrat der 21 energieminierten Strukturen des *L.-casei*-DHFR-Methotrexat-Komplexes.^[19] b) MOLSCRIPT-Darstellung^[172] der repräsentativen Struktur dieses Komplexes, die die Elemente der Sekundärstruktur zeigt. Die repräsentative Struktur ist die am nächsten an der Durchschnittsstruktur liegende. (Wiedergabe mit Genehmigung von Gargaro et al.^[19])

Die Struktur weist vier α -Helices auf sowie acht β -Stränge mit zwei anderen Regionen, bestehend aus den Aminosäuren 11–14 und 126–127, die außerdem miteinander wechselwirken wie in β -Faltblattstrukturen (Abbildung 9b). Die gesamte Faltung des binären Komplexes in Lösung ist derjenigen sehr ähnlich, die man durch Röntgenstrukturanalyse des ternären Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit Methotrexat **5** und NADPH^[14] findet (Abbildung 10).

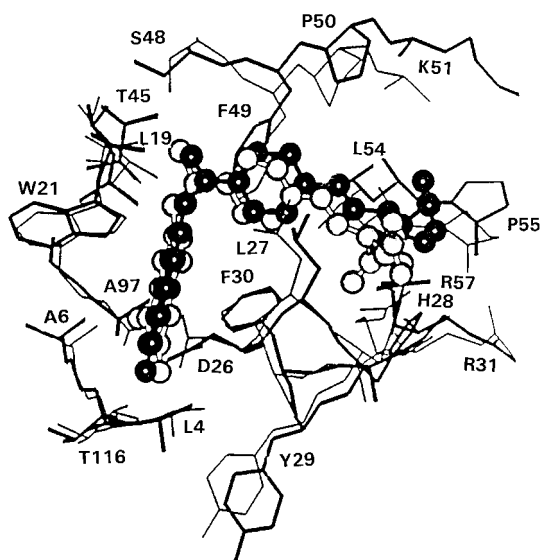


Abbildung 10. Vergleich der Methotrexat-Bindungsstelle in der NMR-spektroskopisch in Lösung bestimmten *L.-casei*-DHFR-Methotrexat-Struktur (dunkel hervorgehoben) mit der in der Kristallstruktur (hell hervorgehoben) des ternären DHFR-Methotrexat-NADPH-Komplexes (nach Kristalldaten von Bolin et al.^[14]). (Wiedergabe mit Genehmigung von Gargaro et al.^[19])

Um hochwertige Strukturbilder der Ligandenbindungsstelle zu erhalten, ist es notwendig, möglichst viele der Protein-Liganden-Abstandsbereiche zu kennen (siehe Abbildung 8). Wir fanden bei früheren Simulationsuntersuchungen,^[115] bei denen ähnliche Abstandsbereiche verwendet wurden wie solche aus NMR-Untersuchungen (klassifiziert als stark, mittel und schwach), die allerdings aus der Kristallstruktur von Folat, gebunden an humane DHFR, stammten, dass für Moleküle dieses Typs zumindest 50 Liganden-Protein-Abstandsbereiche erforderlich sind, um zu akzeptablen Strukturmodellen zu gelangen. Im Fall der für Methotrexat **5** bestimmten Bindungsstelle ist der Pteridinring-Anteil sehr gut definiert (siehe Abbildung 10), jedoch musste der Strukturteil um die Glutamatgruppe verbessert werden, indem Einschränkungen (Restraints) hinzugenommen wurden, die die früher bestimmten^[116, 117] spezifischen Wechselwirkungen zwischen der α -Carboxylatgruppe des Glutamats mit Arg57 und des γ -Carboxylats mit His28 widerspiegeln (siehe Abschnitt 5). Die NADPH-Bindungsstellen scheinen in dem binären Komplex bereits im Wesentlichen vorgebildet zu sein, und dies mag zu der festeren Bindung des Coenzyms in Gegenwart des Methotrexats beitragen, da keine größere Konformationsänderung mehr notwendig ist, wenn NADPH an den binären Komplex bindet.

Die Strukturen anderer Komplexe von *L.-casei*-DHFR – z.B. mit Trimetrexat **6** – sind ebenfalls bestimmt worden, und man kann nun beginnen, Ähnlichkeiten und Unterschiede der Art und Weise, wie verschiedene Liganden binden, zu vergleichen.^[20] Abbildung 11 zeigt eine Überlagerung von Methotrexat **5** und Trimetrexat **6** in ihren Bindungsstellen in DHFR. Wie man sieht, binden die 2,4-Diaminopyrimidin-haltigen Reste der beiden Wirkstoffe in der gleichen Bindungstasche. Die übrigen Teile der beiden Moleküle passen ihre Konformationen so an, dass sie effektive van-der-Waals-

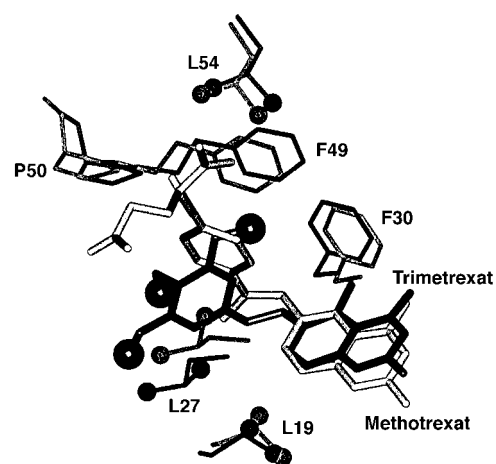


Abbildung 11. Vergleich der Bindungsstellen von Trimetrexat **6** (dunkel) und Methotrexat **5** (hell) in den Strukturen ihrer *L.-casei*-Dihydrofolat-Reduktase-Komplexe. Die Überlagerung der Strukturen wurde über die Rückgratatomme (N, Ca und C) aller 162 Reste in den beiden Strukturen vorgenommen. Methylgruppen sind als Kugeln dargestellt. (Wiedergabe mit Genehmigung von Polshakov et al.^[20])

Wechselwirkungen mit (im Großen und Ganzen) den gleichen hydrophoben Aminosäuren eingehen können und sich deren Seitenkettenorientierung und lokale Konformationen in beiden Komplexen nicht wesentlich unterscheiden.

Außer den konventionellen Strukturbestimmungen mit Hilfe der Moleküldynamik-Rechnungen haben wir verschiedene Methoden des Andockens der Liganden in die Struktur eines Referenzproteins eingesetzt.^[17, 18] Die Atomkoordinaten, die für das Referenzprotein verwendet werden, wurden gewöhnlich von einer Kristallstruktur eines verwandten Komplexes desselben Proteins erhalten. Wir haben kürzlich eine NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur eines verwandten Proteins bei einer Andock-Prozedur verwendet: Bei diesem Ansatz werden statt der Atomkoordinaten des Proteins die NMR-Parameter der Referenzstruktur eingesetzt.^[118] Die Methode nutzt einen Satz experimentell bestimmter Parameter für die Protein-Liganden-, Liganden-Liganden- sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen für Reste in oder in der Nähe der Bindungsstelle zusammen mit einer Reihe von Protein-Protein-Restraints, bei denen alle anderen Gruppen, die von der bereits verwendeten Liste von Restraints stammen, zur Erzeugung der Referenzstruktur eines verwandten Komplexes herangezogen werden. Diejenigen Reste der Bindungsstelle, die bei einem Ersatz des Referenzliganden durch den neuen Liganden beeinflusst wurden, werden durch Beobachtung der Unterschiede der chemischen ¹H-Verschiebungen bestimmt. Die Anwendbarkeit dieser Methode wurde dadurch bestätigt, dass eine hervorragende Übereinstimmung gefunden wurde zwischen der Struktur des *L.-casei*-DHFR-Trimetrexat-Komplexes, die mit der konventionellen Methode aus einem vollständig experimentell ermittelten Satz von Restraints ermittelt wurde, und derjenigen, die mit dieser neuen Restraint/Andock-Methode auf der Grundlage einer *L.-casei*-DHFR-Methotrexat-Referenzstruktur bestimmt wurde.^[118]

5. Bestimmung spezifischer Wechselwirkungen

Bei Protein-Liganden-Komplexen gibt es oftmals spezifische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen der interagierenden Moleküle, und die NMR-Spektroskopie erwies sich als exzellente Methode zur Bestimmung der Ionisierungszustände solcher Gruppen und für die Beobachtung von Änderungen bei der Komplexbildung. Eine Änderung der Ladung einer Gruppe kann eine große Veränderung der chemischen Verschiebung benachbarter Kerne zur Folge haben; dies ist besonders einfach für ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P nachzuweisen. So können z.B. die Ionisierungszustände von Phosphatgruppen bequem über die Messung ihrer chemischen ^{31}P -Verschiebungen gemessen werden. Für die Coenzymkomplexe von DHFR konnte gezeigt werden, dass die 2'-Phosphatgruppen von NADP^+ und NADPH in ihrer dianionischen Form binden (sowohl bei *L.-casei*-DHFR als auch bei *E.-coli*-DHFR), wobei der pK -Wert des 2'-Phosphats um mindestens drei Einheiten niedriger lag als der der freien Spezies.^[108] Der Unterschied $\Delta\delta$ der chemischen ^{31}P -Verschiebung zwischen der mono- und der dianionischen Spezies beträgt ungefähr 3,5, was es leicht macht, die gebundene Form als dianionisch zu erkennen.

Häufiger untersucht man Proben, die für derartige Untersuchungen spezifisch mit Isotopen markiert wurden. So haben Blakley und Mitarbeiter^[49] Messungen der chemischen Verschiebung von ^{15}N genutzt, um zu zeigen, dass das N3-Atom von [2-Amino,3- ^{15}N]Folat, gebunden an humane DHFR, sogar bei pH 9,5 in der nicht ionischen, protonierten Form vorliegt. Bei früheren Experimenten an Komplexen von [2- ^{13}C]Folat mit *Streptococcus-faecium*-DHFR wiesen die beobachteten chemischen ^{13}C -Verschiebungen darauf hin, dass sich das gebundene Folat im gleichen Protonierungszustand befindet wie das freie Folat.^[119]

5.1 Protein-Wechselwirkungen über den Pyrimidinring des Inhibitors

Eine nähere Betrachtung der Kristallstruktur des DHFR-Methotrexat-Komplexes^[14] legte nahe, dass eine protonierte N1-Position des Pteridinrings sich in ausreichender Nähe zur Carboxylatgruppe des konservierten Asp27 befinden sollte, um eine Wasserstoffbrücke zu bilden. Cocco und Mitarbeiter^[119] verwendeten die NMR-Spektroskopie, um diese Wechselwirkung zu charakterisieren. Sie untersuchten das ^{13}C -NMR-Spektrum von an *S.-faecium*-DHFR gebundenem [2- ^{13}C]Methotrexat, und durch Messungen der charakteristischen ^{13}C -Verschiebungen des C2-Kohlenstoffatoms zeigten sie, dass das benachbarte N1 im Komplex protoniert ist und es sogar bei einem pH-Wert von 10 bleibt. Auf diese Weise konnte durch Kombination der NMR-Ergebnisse (um den Protonierungszustand von N1 festzustellen) und einer Röntgenstrukturanalyse (zur Erkennung des wechselwirkenden Restes, Asp27) insgesamt ein vollständigeres Bild dieser bestimmten Wechselwirkung erhalten werden. Ähnliche Experimente sind mit *L.-casei*- und *E.-coli*-DHFRs sowie mit zwei mutierten *E.-coli*-Enzymen, in denen Asp27 jeweils

durch Asparagin bzw. Serin ersetzt war, durchgeführt worden.^[120] Während der pK -Wert von Methotrexat **5** im Komplex mit dem Wildtyp-Enzym größer als 10 ist, beträgt der pK -Wert in Komplexen der Enzymmutanten weniger als 4. Cannon und Mitarbeiter^[121] machten Vorhersagen für den pK -Wert der N1-Position im DHFR-Methotrexat-Komplex, und ihre quantenchemischen Berechnungen legen im Widerspruch zu den experimentellen Befunden nahe, dass N1 unprotoniert bleibt und eine Wasserstoffbrücke zu einer nicht ionisierten Carboxygruppe am konservierten Asp bildet. Obwohl die experimentellen Hinweise für eine Protonierung an N1 zu sprechen scheinen, steht das definitive Experiment – eine Untersuchung des DHFR-Komplexes mit [1- ^{15}N]Methotrexat – bislang noch aus: Ein protoniertes Stickstoffatom N1 würde zu einem ^{15}N - und/oder ^1H -NMR-Signal mit einer 90-Hz-Dublettaufspaltung infolge der ^1H - ^{15}N -Spinkopplung führen.

Messungen der chemischen ^{13}C -Verschiebung an [2- ^{13}C]Trimethoprim im Komplex mit *L.-casei*-DHFR deckten auf, dass N1 des Pyrimidins in gebundenem Trimethoprim protoniert vorliegt.^[92, 122] Abbildung 12 lässt erkennen, dass

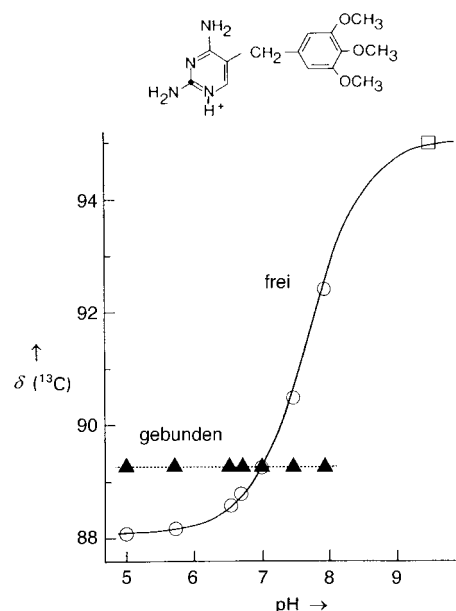


Abbildung 12. NMR-Titrationskurve (chemische ^{13}C -Verschiebung in Abhängigkeit vom pH-Wert) von [2- ^{13}C]Trimethoprim; (○) freier Ligand; (▲) im Komplex mit *L.-casei*-DHFR. Die durchgezogene Linie wurde für $\text{pK} = 7,70$ und $\Delta\delta = 7,09$ berechnet. Der Messwert bei pH 9,5 (□) wurde für freies Trimethoprim ohne anwesendes Enzym erhalten. (Wiedergabe mit Genehmigung von Roberts et al.^[122])

die chemische ^{13}C -Verschiebung der gebundenen Spezies derjenigen der freien, an N1 protonierten Spezies gleicht, und der pK -Wert von gebundenem Trimethoprim wird um mindestens 3 pK -Einheiten erniedrigt.

Die Protonierung von N1 wurde sogar noch unmittelbarer in ^1H -NMR-Experimenten an einem Komplex des Enzyms mit [1,3,2-Amino- ^{15}N]Trimethoprim demonstriert, bei dem es möglich war, das ^1H -NMR-Signal des direkt gebundenen N1-Protons zu messen (das Signal wurde bei $\delta = 14,4$ beobachtet und weist eine für ^1H - ^{15}N -Kopplungen charakteristische

Dublettaufspaltung von 90 Hz auf).^[92] Auch die ^{15}N -NMR-Spektren ließen deutlich erkennen, dass N1 protoniert ist (die chemische ^{15}N -Verschiebung verändert sich bei Protonierung um $\Delta\delta \approx 80$).

Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen unter Beteiligung der 2-NH₂- und 4-NH₂-Protonen von Trimethoprim **4** wurden außerdem durch Messung der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Verschiebungen an DHFR-Komplexen mit ^{15}N -markiertem Trimethoprim nachgewiesen. Dale und Mitarbeiter^[123] folgten diesem Ansatz bei ihren Untersuchungen einer Trimethoprim-resistenten DHFR-Mutante (Phe98→Tyr) aus *Staphylococcus aureus*, um zu zeigen, dass die 4-NH₂-Gruppe von Trimethoprim im Komplex mit der Enzymmutante und NADPH keine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoffatom von Leu5 mehr bildet.

5.2 Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung des Glutaminsäurerestes von Folat-Analoga

Bei Kristallstrukturuntersuchungen des ternären Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit Methotrexat **5** und NADPH fanden Matthews und Mitarbeiter,^[13, 14] dass die α -Carboxylatgruppe des Glutaminsäurerestes von Methotrexat so angeordnet ist, dass sie ein Ionenpaar mit der Guanidinogruppe des konservierten Arg57 bilden konnte, während die γ -Carboxylatgruppe so positioniert war, dass eine Wechselwirkung mit dem Imidazolring in His28 erfolgen konnte (Abbildung 13). Wir zeigten, dass NMR-Methoden angewendet werden können, um die Anwesenheit solcher Wechselwirkungen in Komplexen mit carboxygruppenhaltigen Liganden nachzuweisen.

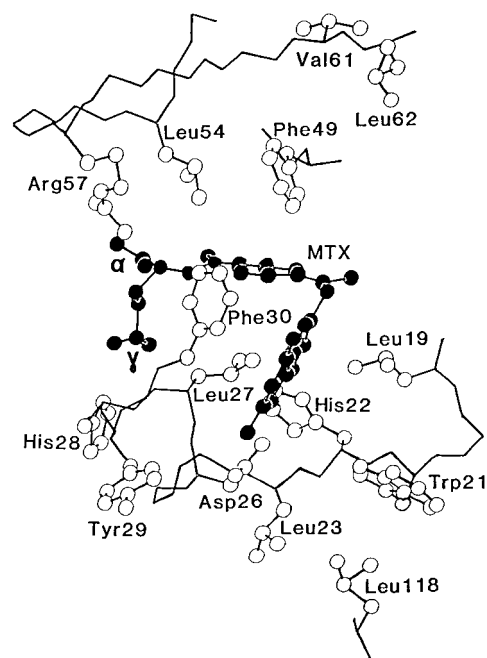


Abbildung 13. Ausschnitt aus der Struktur des *L.-casei*-DHFR-MTX-NADPH-Komplexes im Kristall (aus den Daten von Bolin et al.^[14]), der die Aminosäuren in der Umgebung der Methotrexat-Bindungsstelle zeigt. Die Schweratome von Methotrexat **5** sind als schwarze Kugeln gezeichnet und die ausgewählte Seitenketten als weiße Kugeln. (Wiedergabe mit Genehmigung von Hammond et al.^[159])

5.2.1. Wechselwirkung von Arg 57 mit Carboxylatgruppen von Liganden

Neuere Untersuchungen der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Signale von Argininresten erwiesen sich als besonders nützlich zur Beobachtung von Protein-Liganden-Wechselwirkungen.^[124–126a] So kann z. B. in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit Methotrexat die Wechselwirkung der α -Carboxylatgruppe mit der Guanidinogruppe von Arg57 direkt durch derartige Messungen nachgewiesen werden. In diesem Fall verursacht die Wechselwirkung große Veränderungen der chemischen Verschiebungen der beiden NH η -Protonen, und die gehinderte Rotation um die N ϵ -C ξ - bzw. C ξ -N η -Bindungen der Guanidinogruppe (Abbildung 14a) resul-

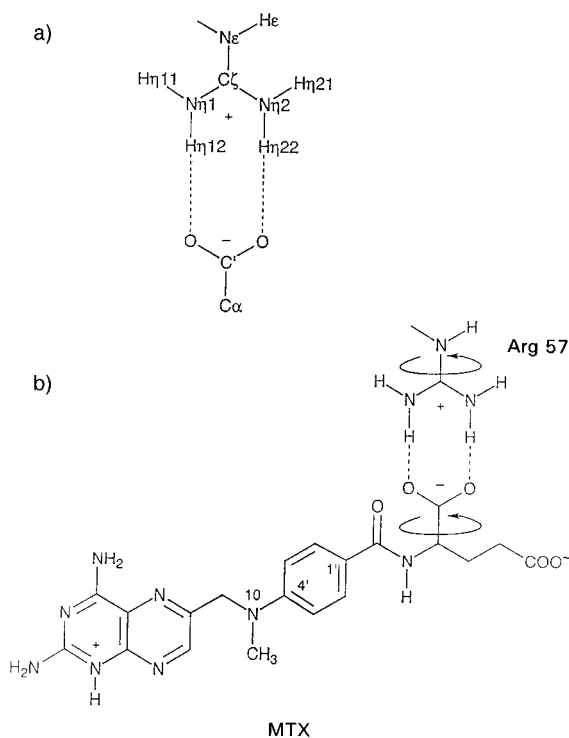


Abbildung 14. a) Symmetrische End-on-Wechselwirkung des α -Carboxylat-Sauerstoffatoms von Methotrexat mit der Guanidinogruppe von Arg57. b) Korrelierte Rotationen um die N ϵ -C ξ -Bindung der Arg57-Guanidinogruppe und die C ξ -C α -Bindung der Glutamat- α -Carboxylatgruppe von Methotrexat **5** (MTX) im Komplex mit *L.-casei*-DHFR. (Wiedergabe mit Genehmigung von Nieto et al.^[125])

tiert dann in vier getrennten Signalen, die in den HSQC-Spektren für die NH η -Kerne beobachtet werden (siehe Abbildung 15). Alle vier Signale konnten spezifisch den jeweiligen NH η -Protonen in Arg57 zugeordnet werden. Die für zwei dieser Signale beobachteten großen Tieffeldverschiebungen wiesen darauf hin, dass zwei der NH η -Protonen (NH η ¹² und NH η ²²) Wasserstoffbrücken zu geladenen Sauerstoffatomen der α -Carboxylatgruppe des Glutamatrestes von Methotrexat bilden. Da lediglich die beiden zentral gelegenen NH η -Protonen an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, muss die Guanidinogruppe einen Teil einer symmetrischen End-on-Wechselwirkung bilden, wie in Abbildung 14a gezeigt.^[124] Derartige Effekte von Arg57 gibt es nicht bei Komplexen

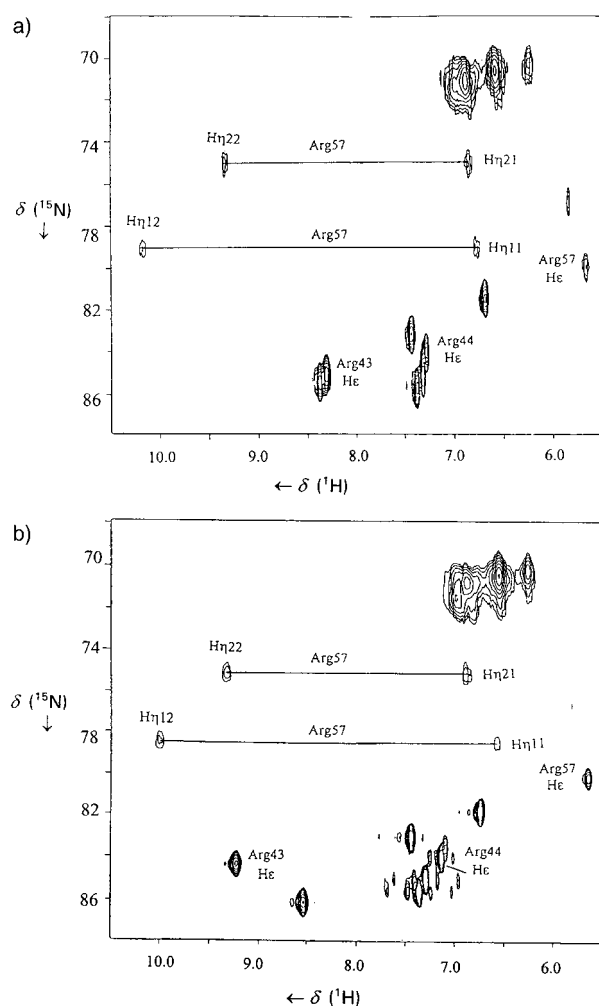


Abbildung 15. ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum der Arg57-NH-Protonen (274 K) des DHFR-Methotrexat-Komplexes (a) und des DHFR-Methotrexat-NADPH-Komplexes (b). Die chemischen Verschiebungen sprechen für eine symmetrische End-on-Wechselwirkung des α -Carboxylat-Sauerstoffatoms von Methotrexat mit der Guanidinogruppe von Arg57, wie durch die in Abbildung 14a gezeigte Struktur angedeutet. (Wiedergabe mit Genehmigung von Gargaro et al.^[124] sowie Nieto et al.^[125])

mit Liganden wie Trimethoprim **4**, die keine Carboxylatgruppen enthalten.

Das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum in Abbildung 15, das vier gut aufgelöste NH^η -Signale von Arg57 für den DHFR-Methotrexat-Komplex zeigt, wurde bei 274 K aufgenommen: Eine Erhöhung der Temperatur verursachte eine Linienverbreiterung und eine Koaleszenz der Signale aufgrund von Austauschwirkungen.^[125] Die Geschwindigkeiten für die Rotation um die $\text{N}^\epsilon\text{-C}^\zeta$ - und $\text{C}^\zeta\text{-N}^\eta$ -Bindungen wurden aus der Linienformanalyse berechnet sowie – für die $\text{N}^\epsilon\text{-C}^\zeta$ -Bindung – auf der Grundlage von 2D- zz -HSQC-Austauschexperimenten,^[126b,c] die unter Verwendung einer von Yamazaki et al.^[126a] beschriebenen Pulssequenz ausgeführt wurden. Diese Experimente ermöglichen die Beobachtung des heteronuclearen zz -Magnetisierungstransfers zwischen verschiedenen ^{15}N -markierten Stellen des Moleküls. Wechselwirkungen zwischen der Methotrexat- α -Carboxylatgruppe und der Arg57-Guanidinogruppe vermindern die Geschwindigkeit der Rotation um die $\text{N}^\epsilon\text{-C}^\zeta$ -Bindung etwa um den Faktor 3 und um die

$\text{C}^\zeta\text{-N}^\eta$ -Bindungen um einen Faktor von mehr als 300 bezogen auf Werte für freies Arginin.^[126a–128]

Überraschenderweise sind die relativen Rotationsgeschwindigkeiten für diese beiden Bindungen im Vergleich zu den Werten für freies Arginin in den Proteinkomplexen vertauscht (siehe Abbildung 16). Dies kann leicht erklärt

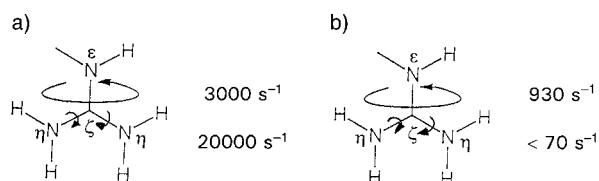


Abbildung 16. Geschwindigkeit der Rotation um die $\text{N}^\epsilon\text{-C}^\zeta$ - und $\text{C}^\zeta\text{-N}^\eta$ -Bindungen bei 313 K in a) freien Argininresten und b) in Arg57 im DHFR-Methotrexat-Komplex.

werden, wenn korrelierte Rotationen um die $\text{N}^\epsilon\text{-C}^\zeta$ -Bindung der Arg57-Guanidinogruppe und die $\text{C}'\text{-C}^\alpha$ -Bindung der Glutamat- α -Carboxylatgruppe von Methotrexat vorliegen (siehe Abbildung 14b). Solche korrelierten Rotationen würden eine Rotation um die $\text{N}^\epsilon\text{-C}^\zeta$ -Bindung zulassen, ohne dass die Wechselwirkungen der NH^η -Protonen mit den Carboxylatsauerstoffatomen unterbrochen werden müssten. Letztere würden dann bevorzugt die Rotationen um die $\text{C}^\zeta\text{-N}^\eta$ -Bindungen verlangsamen.^[125]

Im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des ternären Komplexes mit Methotrexat **5** und NADPH (Abbildung 15b) zeigt das NH^ϵ -Proton von Arg43 im Vergleich zu dem im binären Komplex mit **5** eine große Tieffeldverschiebung und außerdem eine Verzögerung seines Protonenaustauschs mit Wasser.^[124] Aufgelöste Einzelsignale für die vier NH^η -Protonen von Arg43 wurden nicht beobachtet. Dies ist ein deutlicher Unterschied zum Fall von Arg57 und ist in Einklang mit der Anwesenheit einer Side-on-Wechselwirkung des Guanidinium- NH^ϵ -Protons mit den geladenen Sauerstoffatomen der Ribose-2'-Phosphatgruppen von NADPH. Bereits früher wurde anhand von ^{31}P -NMR-Untersuchungen festgestellt, dass die 2'-Phosphatgruppe sowohl in Lösung als auch im Festkörper in ihrer dianionischen Form an DHFR bindet.^[129]

5.2.2. Wechselwirkung von His28 mit Carboxylatgruppen

Bei unseren früheren NMR-Untersuchungen der ^1H -NMR-Verschiebungen des C2-Protons des Histidin-Imidazolrings in Komplexen der *L.-casei*-DHFR mit Methotrexat **5** (und zahlreichen anderen glutaminsäurehaltigen Liganden) fanden wir, dass der pK -Wert von His28 ca. 1 pK -Einheit höher war als im ligandenfreien Enzym (Abbildung 17).^[130, 131] Dies spiegelt die Wechselwirkung von His28 mit der MTX- γ -Carboxylatgruppe (Abbildung 13) wider und stellt eine ausgezeichnete Methode zur Verfügung, um Wechselwirkungen mit His28 zu verfolgen.^[132] Wir nutzten diese Effekte, um Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit den α - und γ -Amid-Analoga von Methotrexat, **8** bzw. **9**, zu untersuchen. Diese binden um zwei Größenordnungen (α -Amid) bzw. eine (γ -Amid) Größenordnung schwächer an *L.-casei*-DHFR als Methotrexat selbst. Im Falle des MTX-Komplexes mit dem

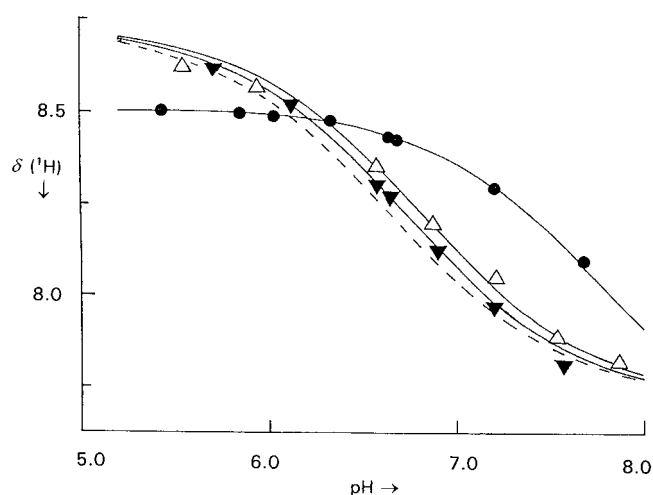
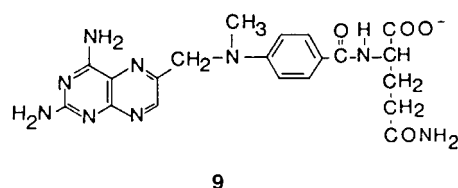
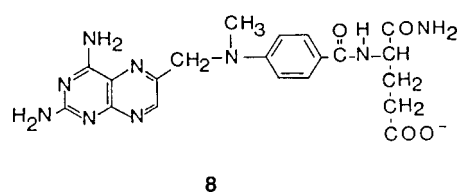


Abbildung 17. pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung (^1H , bezogen auf Natrium-2,2-dimethyl-2-silapent-5-sulfonat) der C2-Protonen von His28 in zahlreichen Dihydrofolat-Reduktase-Komplexen. (●) Methotrexat **5**; (▼) Methotrexat- γ -amid **8**; (Δ) Methotrexat- α -amid **9**; (---) freies Enzym.^[116] (Wiedergabe mit Genehmigung von Feeney.^[23])



γ -Amid und DHFR deuten die chemischen ^1H -Verschiebungen des His28-C2-Protons darauf hin, dass sein pK -Wert nicht gegenüber dem des freien Enzyms verändert ist, was zeigt, dass keine Ionenpaar-Wechselwirkung besteht (siehe Abbildung 17).^[116]

Das ^1H -NMR-Spektrum des α -Amid-Komplexes mit MTX **5** und DHFR zeigte ebenfalls keine Veränderung des pK -Wertes von His28, obwohl hier die γ -Carboxylatgruppe für Wechselwirkungen verfügbar ist. Dies bedeutet, dass Modifikationen der α -Carboxylatgruppe nicht nur die Arg57-Wechselwirkungen unterbinden, sondern auch die Gesamtstruktur so stören, dass verfügbare γ -Carboxylatgruppen kein Ionenpaar mit His28 bilden können. Veränderungen in der Abschirmung zahlreicher Protonen in der Nachbarschaft des Benzoylrings gehen ebenfalls mit dem Fehlen der α - CO_2^- -Wechselwirkung mit Arg57 einher. Diese Unterschiede der chemischen Verschiebungen sind in Einklang mit einer Umorientierung des Benzoylrings, was zu Änderungen der Ringstrom-Abschirmungseffekte auf benachbarte Protonen führt.^[116, 133]

6. Rationales Design von Inhibitoren

Die detaillierten Strukturinformationen, die für Komplexe der Dihydrofolat-Reduktase verfügbar sind,^[13–20] wurden zusammen mit Molecular Modeling genutzt, um verbesserte Inhibitoren zu entwerfen.^[12, 45, 133–144] NMR-Methoden erwiesen sich dabei als Alternative zur Röntgenkristallographie,^[140] um spezifische Wechselwirkungen zwischen einem neuen Inhibitor und dem Protein zu beobachten und zu prüfen, ob die vorausgesagten Wechselwirkungen bestehen oder nicht.^[25, 116, 117, 143]

Wir haben verbesserte DHFR-Inhibitoren entwickelt, indem wir Analoga von Trimethoprim **4** (oder Analoga von Brodimoprim **10**, in dem die 4'- OCH_3 -Gruppe durch einen Bromsubstituenten ersetzt ist) herstellten, die solche Seitenketten an ihren $\text{O}3'$ -Positionen enthalten; diese zielen darauf ab, zusätzliche Wechselwirkungen mit bestimmten Proteinfragmenten einzugehen, die normalerweise an der Substratbindung beteiligt sind, nicht aber an der Bindung von **4**. Wenn man beispielsweise den 2,4-Diaminopyrimidinring eines Brodimoprim-Analogons in seiner Bindungstasche in der DHFR modelliert, erkennt man, dass Brodimoprim **10** – anders als Folat **1** oder Methotrexat **5** – keine direkte Wechselwirkung mit Arg57 und His28 eingehen kann (Abbildung 18).^[117]

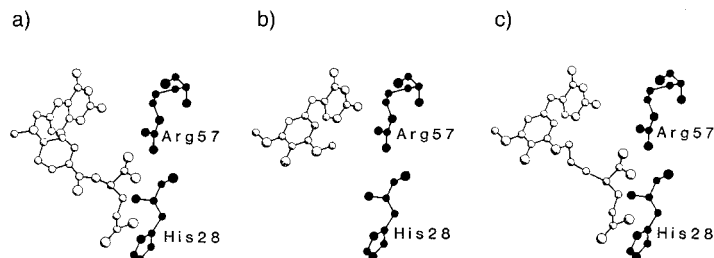
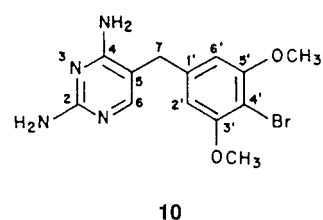
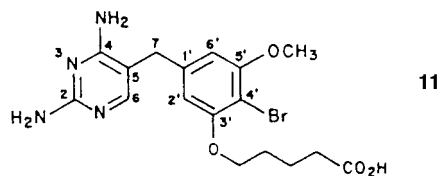


Abbildung 18. a) Detail der kristallographisch ermittelten Struktur des Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit Methotrexat **5** und NADPH (Bolin et al.^[14]). Die Nähe der α - und γ -Carboxygruppen von Methotrexat zu Arg57 und His28 wird deutlich. b) Brodimoprim **10** weist in seiner gebundenen Form keinen Kontakt mit diesen Aminosäuren auf. c) Ein Modell der Bindungsweise des Dicarboxy-Derivats **7** von **10**^[117] unter Verwendung von Kristallstrukturdaten von Matthews et al.^[13, 14] (Wiedergabe mit Genehmigung von Feeney.^[25])

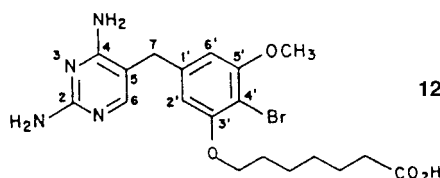
In Zusammenarbeit mit Kollegen von Hoffmann-LaRoche synthetisierten wir zahlreiche Analoga von Brodimoprim **10**.^[117] Diese rational entworfenen Analoga haben eine zusätzliche Seitenkette mit einer oder zwei Carboxylatgruppen, die mit Arg57 und/oder His28 des Proteins wechselwirken sollen. Die gemessenen Inhibierungskonstanten der verschiedenen Analoga (Tabelle 1) liefern Schätzwerte für ihre verbesserte Bindungsfähigkeit. Die chemischen ^1H -Verschiebungen der C2-Protonen des His28-Imidazolrings wurden zur Überwachung der pK -Werte der His28-Gruppierungen herangezogen, die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Verschiebungen der Arg57-Guanidi-

Tabelle 1. Inhibierungskonstanten (K_i) und pK -Werte von His28 für Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit Brodimoprim und einigen seiner Analoga.

Ligand	K_i [nM]	$pK(\text{His28})$
10	11.3	6.80
11	0.2	6.83
12	0.6	6.80
7	< 0.01	7.80



11



12

nogruppen wurden verwendet, um Wechselwirkungen mit Ligandencarboxylatgruppen in den unterschiedlichen DHFR-Komplexen zu verfolgen.^[143] Diese Experimente ermöglichten es uns, einzuschätzen, ob die Seitenketten der Liganden in der geplanten Weise binden. So wurde das Carboxybutyl-Derivat **11** so geplant, dass es mit dem Arg57-Rest interagieren konnte. Die beobachteten Abweichungen der chemischen $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Verschiebungen der Kerne der Arg57-Guanidinogruppe entsprachen denen, die man für eine symmetrische End-on-Wechselwirkung der Carboxylatgruppe erwartet. Dies führt zu vier getrennten NH^+ -Signalen im HSQC-Spektrum, von denen zwei (eines von jeder NH_2 -Gruppe) infolge einer Wasserstoffbrücke deutliche Tieffeldverschiebungen aufweisen.^[143] Wie für dieses Derivat zu erwarten war, fand sich keine Abweichung beim pK -Wert von His28.

Ein weiterer Ligand, das Dicarboxy-Derivat **7**, wurde entworfen, um sowohl mit His28 als auch mit Arg57 wechselwirken zu können. Sein Komplex mit DHFR zeigte einen um etwa 1 erhöhten pK -Wert von His28 (siehe Tabelle 1), was darauf hindeutet, dass eine Carboxylat-His28-Wechselwirkung erreicht wurde (siehe Abbildung 18). Die Wechselwirkung einer Carboxylatgruppe mit der Arg57-Guanidinogruppe wurde außerdem durch vier NH^+ -Signale im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum bestätigt, die eine symmetrische End-on-Wechselwirkung mit den Carboxylatsauerstoffatomen und eine Hinderung der Rotation innerhalb der Guanidinogruppen anzeigen (siehe Abbildung 15). Das Dicarboxy-Derivat **7** bindet um drei Größenordnungen fester an DHFR als die Stammverbindung **10**, wobei seine Bindungsspezifität in Bezug auf humane DHFR erhalten bleibt.

Einige der anderen Brodimoprim-Analoga binden dagegen nicht in der erwarteten Weise. So veränderte z.B. das Carboxyhexyl-Derivat **12** (siehe Tabelle 1), das entworfen wurde, um die Carboxylat-His-28-Wechselwirkung zu erreichen, den pK -Wert von His28 nicht, wenngleich es ziemlich fest an das Enzym bindet. Obwohl **12** also His28 erreichen

könnte, bindet es bevorzugt an einer anderen Position. Die Beobachtung der NMR-Signale von His28 und Arg57 stellt eine bequeme und direkte Methode dar, um abzuschätzen, ob eine beabsichtigte Wechselwirkung in derartigen Komplexen stattfindet oder nicht.^[117, 143]

7. Dynamische Prozesse in Protein-Liganden-Komplexen

Eine Analyse der Relaxation der ^{15}N - und ^{13}C -Kerne kann Informationen über rasche Segmentbewegungen in den Enzym-Liganden-Komplexen liefern (Geschwindigkeiten von 10^9 bis 10^{12} s^{-1}), während mit Linienformanalysen und Magnetisierungstransfer-Experimenten viel langsamere intramolekulare Bewegungen (Geschwindigkeiten von 10^0 bis 10^4 s^{-1}) charakterisiert werden können, wie sie etwa bei der Rotation um Einfachbindungen in Argininresten, beim Umklappen von Arenringen (ring flipping) und beim Aufbrechen oder der Neubildung von Wasserstoffbrücken beobachtet werden.

7.1 Schnelle Bewegungen

Epstein und Mitarbeiter^[145] setzten ^{15}N -Relaxationsmessungen am Komplex von *E.-coli*-DHFR mit Folat **1** ein, um die Beweglichkeit des Hauptstrangs und der Tryptophan-Seitenketten zu bestimmen. Sie fanden Bewegungen der Hauptkette mit hoher Amplitude im Pico- und Nanosekundenbereich in Bereichen des Proteins, die mit der Stabilisierung von Übergangszuständen in Verbindung gebracht wurden. Sie schlossen daher, dass diese zeitabhängigen Strukturvariationen mit den katalytischen Eigenschaften des Enzyms zusammenhängen könnten.^[145] Über Relaxationszeitmessungen an Komplexen des *L.-casei*-Enzyms wurde ebenfalls berichtet.^[20, 93] Auf der Grundlage einer Analyse der ^{13}C -Relaxationszeiten des C7-Kohlenstoffatoms in $[7,4'\text{-OCH}_3\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Trimethoprim – gebunden an *L.-casei*-DHFR – wurde die Gesamtkorrelationszeit (tumbling time) des Moleküls mit 15.4 ns bei 295 K berechnet. Das 4'- OCH_3 -Kohlenstoffatom hat eine sechsfach geringere Relaxationsgeschwindigkeit. Dies kann als zusätzliche rasche Bewegungen interpretiert werden, die die Relaxation des 4'- OCH_3 -Kohlenstoffatoms beeinflussen, und legt nahe, dass eine schnelle Librationbewegung des Benzylrings ($> 10^{10} \text{ s}^{-1}$) über einen Winkelbereich von $\pm 30^\circ$ vorliegt.^[93]

7.2 Langsame intramolekulare Prozesse

Beispiele für Rotationen um Einfachbindungen und damit korrelierte Rotationen haben wir für den Fall der mit Carboxylatgruppen in Liganden wechselwirkenden Arginin-Guanidinogruppen bereits diskutiert. Korrelierte Rotationen wurden ebenfalls beim Umklappen der *para*-substituierten aromatischen Ringe von Liganden erkannt. In Komplexen von *L.-casei*-DHFR mit Liganden, die symmetrisch substituierte aromatische Ringe enthalten, zeigen diese gewöhnlich

ein Umklappen. NMR-Spektroskopie ist die ideale Technik, um die Geschwindigkeiten solcher Prozesse zu bestimmen. In einigen Komplexen, z. B. denen mit Folat **1**, ist die Umklappgeschwindigkeit hoch genug, um zu gewährleisten, dass nur ein einziges Signal für die 2',6'-Protonen (sowie ein weiteres für die 3',5'-Protonen) des Benzoylrings beobachtet werden kann. Bei anderen Komplexen, etwa beim DHFR-Methotrexat-Komplex, wurden keine ^1H -NMR-Signale detektiert, wahrscheinlich aufgrund der Linienverbreiterung durch den Positionswechsel bei der Untersuchungstemperatur. Dennoch war es durch Untersuchung der ^{19}F -NMR-Spektren des Komplexes von 3',5'-Difluormethotrexat mit DHFR bei verschiedenen Temperaturen möglich, das Ringumklappen detailliert zu untersuchen (Abbildung 19).^[107]

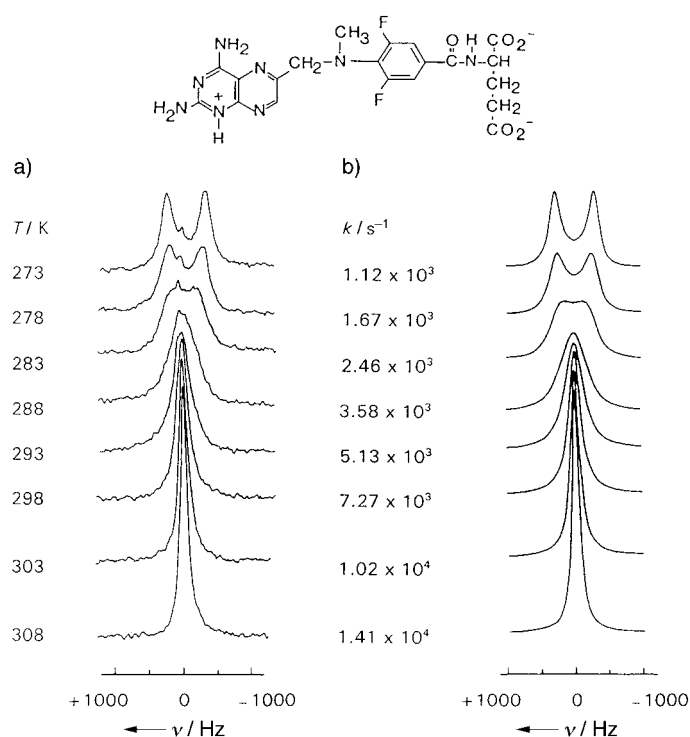


Abbildung 19. a) 188.2-MHz- ^{19}F -Spektren von 3',5'-Difluormethotrexat im Komplex mit *L.-casei*-DHFR bei verschiedenen Temperaturen. b) Die entsprechenden berechneten Spektren und Austauschgeschwindigkeiten. (Wiedergabe mit Genehmigung von Clore et al.^[107])

Bei 274 K wurden für die 3',5'-Fluorkerne zwei getrennte Signale beobachtet; bei Temperaturerhöhung kommt es zur Signalverbreiterung und schließlich zur Koaleszenz (bei ca. 298 K). Eine Linienformanalyse dieses klassischen Wechsels zwischen zwei Zuständen ergab eine Umklappgeschwindigkeit von $7 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ bei 298 K für den binären Komplex und von $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ bei 298 K für den ternären Komplex, der zusätzlich NADPH enthält. In beiden Komplexen erfordern die Umklappbewegungen korrelierte Rotationen um die Bindungen an den 1'- und 4'-Positionen des Rings. Verma und Mitarbeiter^[147] haben den möglichen Reaktionsweg für den Umklappprozess in diesem Komplex berechnet.

Die Umklappgeschwindigkeiten für Arenringe in Liganden wurden auch für Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit Trimethoprim **4**,^[93, 94] Pyrimethamin-Analoga^[102] und mit Trimetre-

nat **6**^[20] bestimmt. Linienformanalysen von ^{13}C -NMR-Spektren (und erst vor Kurzem von $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC-Spektren) von $[3'\text{-OCH}_3\text{-}^{13}\text{C}]\text{Trimethoprim}$ wurden verwendet, um die entsprechenden Geschwindigkeiten des Umklappens des Benzylrings in DHFR-Komplexen mit Trimethoprim-Analoga zu charakterisieren.^[93, 94] Beim binären DHFR-TMP-Komplex beträgt die Umklappgeschwindigkeit 793 s^{-1} bei 298 K, und aus einer Betrachtung der Bindungskonformation von **4** ergibt sich, dass eine Rotation um die C7-Cl'-Bindung (τ_2 in Abbildung 20) nicht ohne eine Änderung des C5-C7-Tor-

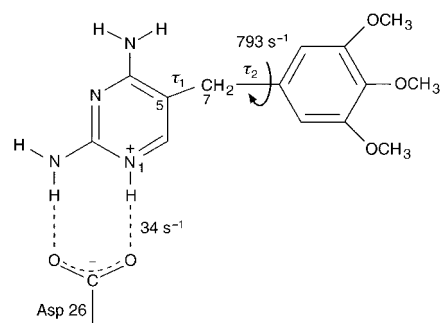


Abbildung 20. Dynamische Prozesse im Komplex von Trimethoprim mit *L.-casei*-DHFR bei 298 K. Die Lebensdauer des Komplexes bei dieser Temperatur beträgt 0.5 s. Die Umklappgeschwindigkeit wurde aus einer Linienformanalyse ermittelt^[148] und korrigiert den in Lit. [93] angegebenen Wert.

sionswinkels erfolgen kann (um die sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Benzyl- und dem Pyrimidinring auszuschließen). Dies wiederum erfordert eine Fluktuation in der Proteinstruktur, so dass der Torsionswinkel um die C5-C7-Bindung (τ_1 in Abbildung 20) in gebundenem **4** sich um mindestens 35° verändern kann, um diese sterische Hinderung abzubauen und so ein Umklappen um τ_2 zu erlauben.^[93]

Analysen der Linienbreiten von NH-Protonensignalen, die in Abhängigkeit von der Temperatur aufgenommen wurden, liefern Geschwindigkeiten für den Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel. In Fällen, bei denen das Aufbrechen einer Wasserstoffbrücke ein notwendiger Schritt ist, bevor ein Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel überhaupt stattfinden kann, können diese mit den Geschwindigkeiten für den Bruch und die Neubildung von Wasserstoffbrücken in Beziehung gesetzt werden.^[92] Für den DHFR-Trimethoprim-Komplex wurde die Geschwindigkeit für das Aufbrechen der Wasserstoffbrücke zwischen dem Trimethoprimpyrimidin-N1-Proton und dem Carboxylatsauerstoffatom von Asp26 zu 34 s^{-1} bei 298 K abgeschätzt. Bei dieser Temperatur ist die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes (2 s^{-1}) viel geringer als die Ring-Umklappfrequenz (793 s^{-1}) und auch als die Geschwindigkeit des Aufbrechens von Wasserstoffbrücken (34 s^{-1} , siehe Abbildung 20). Es ist klar, dass beide Prozesse ein vielfaches Lösen bzw. Neubilden von Protein-Liganden-Wechselwirkungen innerhalb der Lebensdauer des Komplexes erfordern. Die Lebensdauer der teilweise dissoziierten Spezies wird sehr kurz sein, und eine vollständige Dissoziation erfordert simultane oder zumindest in rascher Abfolge ablaufende Vorgänge.

Dieses Bild wäre konsistent mit unserem früheren Vorschlag eines „Reißverschluss“-Mechanismus für die Bindung und Freisetzung flexibler Liganden in Protein-Liganden-Komplexen.^[149] In diesem Modell wurde vorgeschlagen, die Bindung eines flexiblen Liganden an ein Protein über die erste Stufe der Bildung eines Nucleationskomplexes ablaufen zu lassen, in dem der Ligand nur teilweise gebunden ist und der dann eine Reihe von Konformationsänderungen erfährt; diese würden dann reißverschlussartig zu weiteren Wechselwirkungen mit dem Protein führen, um schließlich den vollständig gebundenen Komplex zu liefern (Abbildung 21).

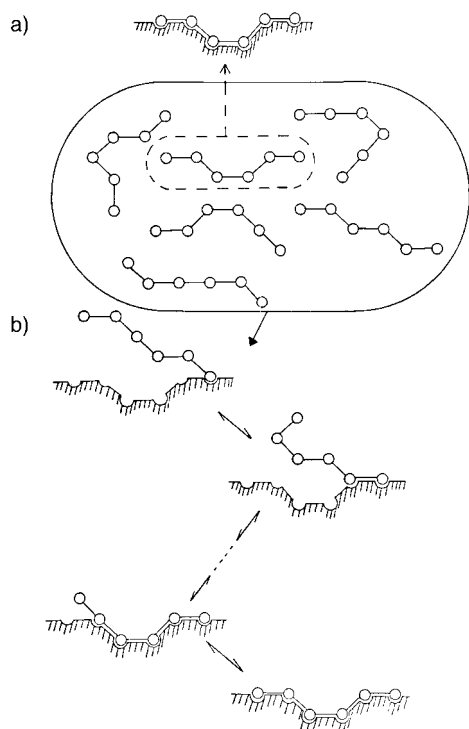


Abbildung 21. Schematische Darstellung des a) „Schlüssel-Schloss“- und b) „Reißverschluss“-Modells für die Ligandenbindung. Nur die Liganden, die sofort die richtige Konformation einnehmen, können im „Schlüssel-Schloss“-Modell binden, aber nahezu alle Liganden können wie in (b) binden, wobei die endgültige gebundene Konformation durch einen schrittweise reißverschlussartig verlaufenden Prozess eingenommen wird. (Wiedergabe mit Genehmigung von Burgen et al.^[149])

Die Dissoziation lief über eine ähnliche, schrittweise Umkehr der verschiedenen gebundenen Zustände ab. Solche Prozesse würden hohe Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten erlauben (durch die Aufteilung der Gesamtaktivierungsenergie in kleinere Teile), wobei die Bindungsspezifität als Folge der Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen dem flexiblen Liganden und dem Protein erhalten bliebe.

8. Multiple Konformationen

Die NMR-Spektroskopie hat sich als leistungsfähige Technik zur Aufdeckung multipler Konformationen in Protein-Liganden-Komplexen in Lösung erwiesen. In vielen Fällen konnten durch Beobachtung getrennter NMR-Spektren zwei

oder mehr Konformationen für die verschiedenen Formen erkannt werden. Der einfachste Weg, multiple Konformationen zu entdecken, besteht in der Untersuchung der NMR-Spektren von Komplexen, die mit isotoopenmarkierten Liganden (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F) gebildet wurden; das Vorliegen verschiedener Konformationen erkennt man dann schnell an der Vielzahl der Signale.

Multiple Konformationen, wie sie in Protein-Liganden-Komplexen gefunden werden, sind oft dadurch bedingt, dass der Ligand in mehr als einer Weise gebunden ist. Allerdings wurden sie auch bei freien Enzymen beobachtet. So haben z.B. NMR-Studien an der DHFR aus *E.-coli* zwei unterscheidbare Konformationen aufgedeckt, die sich im Bereich einer beweglichen Schleife um die Aminosäuren 16–20 unterscheiden.^[150] Für zahlreiche Komplexe, die mit den Dihydrofolat-Reduktasen aus *L. casei*, *E. coli* und *S. faecium* gebildet wurden, konnte NMR-spektroskopisch gezeigt werden, dass sie als Gemisch verschiedener Konformationen vorliegen.^[79, 90, 94, 103, 151–160] In diesen Fällen können die relativen Mengen der Konformere im Gleichgewicht über Intensitätsmessungen der NMR-Signale der verschiedenen Konformationen abgeschätzt werden. Die Konformationsgleichgewichte können manchmal durch Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes oder der Struktur (z.B. durch Austausch von Aminosäuren durch selektive Mutagenese) verschoben werden. Bei manchen Komplexen kann die Geschwindigkeit der Umwandlung der Konformere durch Linienformanalysen ermittelt werden, in manchen Fällen auch durch Magnetisierungstransfer-Methoden.^[161]

Das Auftreten multipler Konformationen hängt oft von der Herkunft des Enzyms ab. Beispielsweise existiert der Komplex des *E.-coli*-Enzyms mit Methotrexat **5** in Form von zwei Konformationen,^[91, 95, 160] während der gleiche Komplex mit dem *L.-casei*-Enzym als wohldefinierte, einzelne Konformation vorliegt.^[159] Bei anderen Liganden, z.B. Folat **1**, ist es jedoch der Komplex mit dem *L.-casei*-Enzym^[46, 90, 156, 157] und nicht der mit der *E.-coli*-DHFR,^[150] der multiple Konformationen zeigt. Multiple Konformationen wurden auch durch Röntgenstrukturuntersuchungen bekannt; in diesen Fällen ist es jedoch schwierig, den Einfluss der Kristallpackungskräfte auf die Stabilität der Konformationen abzuschätzen.^[137]

8.1. Ternäre Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit Trimethoprim und NADP^+

Der ternäre Komplex aus *L.-casei*-DHFR mit Trimethoprim und NADP^+ liegt als Gemisch zweier annähernd gleich häufig vorkommender Konformationen vor (Form I und Form II).^[156, 157] Diese wurden zuerst im ^1H -NMR-Spektrum des Komplexes entdeckt, in dem sechs der sieben His-C2-Protonen jeweils zwei getrennte Signale entsprechend den beiden Konformeren ergaben (Abbildung 22).^[156, 157] Die Paare der Histidinsignale koaleszierten bei Temperaturerhöhung, was typisch für einen Wechsel zwischen zwei Zuständen ist, und eine Linienformanalyse bei 314 K ergab die Umwandlungsgeschwindigkeit (18 s^{-1}).^[156] Detaillierte ^{13}C - und ^{31}P -Studien bestätigten das Vorliegen zweier Konformationen.^[157] Zwei ähnliche Konformationen werden ebenfalls

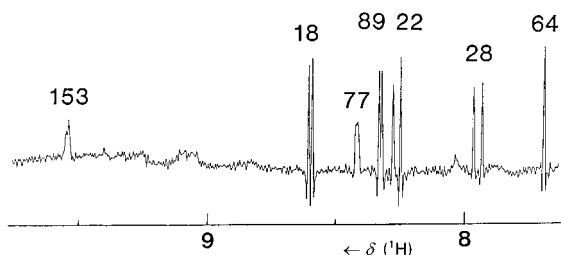
DHFR-TMP-NADP⁺

Abbildung 22. Ausschnitt aus dem Tieffeldbereich des auflösungsverbesserten 500-MHz-¹H-NMR-Spektrums des *L.-casei*-DHFR-Trimethoprim-NADP⁺-Komplexes, der die sieben zugeordneten Histidin-C2-Protonensignale enthält, von denen sechs als Dubletts erscheinen, da zwei Konformationen in annähernd gleicher Menge vorliegen. (Wiedergabe mit Genehmigung von Birdsall et al.^[157])

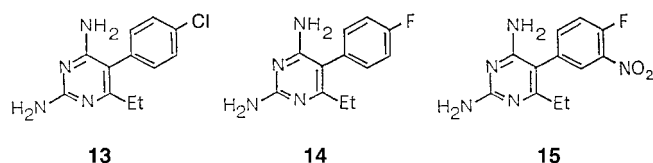
beim DHFR-Trimethoprim-NADP⁺-Komplex gefunden, der mit dem *E.-coli*-Enzym gebildet wurde.^[96]

Bei Betrachtung der gemessenen chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten und NOEs deutet sich an, dass, obgleich die Konformationen des gebundenen Trimethoprim in den beiden Formen ähnlich sind, die des gebundenen NADP⁺ stark differiert: Bei der Form II erstreckt sich der Nicotinamidring in die Lösung hinein, während er in Form I im Protein verborgen ist.^[156, 157] Konformationsunterschiede zwischen den Formen I und II wurden auch im Nicotinamid-Ribosering und den Pyrophosphatverknüpfungen gefunden, aber der Adeninring und seine Riboseeinheit sind in beiden Formen gleichartig gebunden.

Für Komplexe verschiedener Analoga von TMP und NADP⁺ mit DHFR wurde gleichfalls das Vorliegen zweier Konformationen nachgewiesen, wobei deren Verteilung von den bestimmten Strukturen der Analoga abhing.^[157] Solche Informationen liefern zusätzliche Erkenntnisse bei Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

8.2. Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit Pyrimethamin-Analoga

Bei einigen Komplexen resultieren die multiplen Konformationen daraus, dass die flexiblen Liganden im Wesentlichen in der gleichen Bindungsstelle gebunden werden, dort aber unterschiedliche Konformationen einnehmen. Dies ist z. B. der Fall bei Komplexen, die mit Pyrimethamin-Analoga wie **15** gebildet werden; diese enthalten asymmetrisch substituierte aromatische Ringe, bei denen zwei unterscheidbare Rotationsisomere des gebundenen Liganden eine Folge der gehinderten Rotation um die Pyrimidin-Phenylbindung sind.^[102] Wir setzten die NMR-Spektroskopie ein, um derartige gehinderte Rotationen in Komplexen von *L.-casei*-



DHFR mit den Pyrimethamin-Analoga **13–15** zu untersuchen.^[102] Diese sind sowohl als Antimalaria-^[162] wie auch als potentielle Antitumorwirkstoffe^[163, 164] von Interesse. Das 3'-Nitro-4'-fluorpyrimethamin-Derivat **15** hat einen asymmetrisch substituierten Arenring und kann als Gemisch von zwei Rotationsisomeren vorliegen (ein Enantiomerenpaar; Abbildung 23).

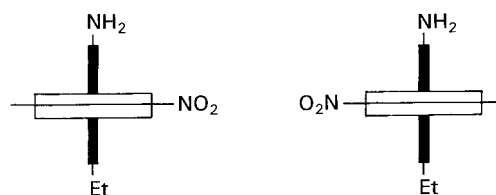


Abbildung 23. Schematische Darstellung der beiden Rotationsisomere (Enantiomere) von 3'-Nitro-4'-fluorpyrimethamin **15**. Die Ebenen der beiden Arenringe sind senkrecht zur Papierebene gezeichnet und als schwarze und weiße Balken dargestellt. (Wiedergabe mit Genehmigung von Birdsall et al.^[102])

Das ¹⁹F-NMR-Spektrum des Komplexes von **15** mit DHFR enthält zwei unterscheidbare Signale für den gebundenen Liganden, entsprechend den beiden verschiedenen Konformationszuständen des Komplexes. Das 2D-Austauschspektrum (Abbildung 24) lässt erkennen, dass die beiden Formen

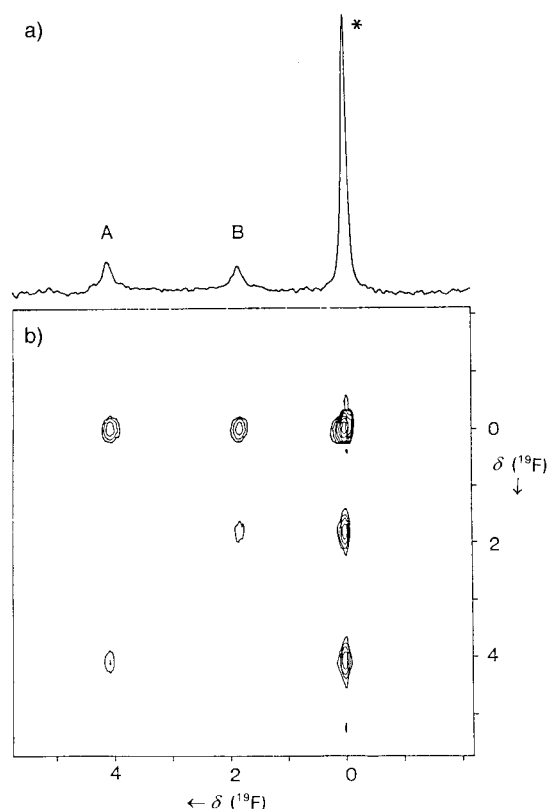


Abbildung 24. 376-MHz-¹⁹F-NMR-Spektren von DHFR (1.2 mM) in Gegenwart eines Überschusses an 3'-Nitro-4'-fluorpyrimethamin **15** (308 K, pH 6.5). a) 1D-Spektrum, b) 2D-NOESY-Austausch-Spektrum. Chemische Verschiebungen sind auf das Signal des freien Liganden bezogen (durch einen Stern markiert). Für die gebundenen Formen A und B einerseits und den freien Liganden andererseits gibt es jeweils Austausch-Kreuzsignale (Magnetisierungstransfer durch Austausch), aber zwischen den Formen A und B wird kein Austausch beobachtet. (Wiedergabe mit Genehmigung von Tendler et al.^[102])

mit dem freien Liganden austauschen, nicht jedoch miteinander.^[102] Aus Intensitätsmessungen folgt für die Populationen der beiden Formen A und B im binären Komplex ein Verhältnis von 0.6:0.4. Im ternären Komplex mit NADP⁺ kehrt sich dies zu einem A:B-Verhältnis von 0.3:0.7 um.^[102]

Wir setzten 2D-¹H-NMR-Austauschspektroskopie ein, um für Komplexe von DHFR mit den Liganden **13**–**15** die Signale der gebundenen Spezies mit den entsprechenden Signalen der freien Spezies in Beziehung zu setzen (Spektren nicht gezeigt). In Komplexen, in denen der Ligand einen symmetrisch substituierten Phenylring aufweist (wie bei **13** oder **14**), werden vier Signale für die vier aromatischen Protonen beobachtet; die Abschirmungen der vier Protonen unterscheiden sich also. Dies deutet auf eine gehinderte Rotation um die Phenyl-Pyrimidin-Bindung hin, wobei der Phenylring eine fixierte Position innerhalb seiner Bindungsstelle einnimmt, so dass sich jedes der vier aromatischen Protonen in einer anders abschirmenden Umgebung im Protein befindet. DHFR-Komplexe mit Pyrimethamin-Derivaten, die asymmetrisch substituierte Phenylringe aufweisen (wie **15**), zeigen für die gebundenen Liganden zwei vollständige Signalsätze für die Phenylprotonen (je drei Signale für Form A und Form B). Mit den Röntgenstrukturdaten verwandter Komplexe^[140, 165] sowie mit NOE-Daten des *L.-casei*-DHFR-Komplexes war es möglich, die Ligandenphenylprotonen in gebundenem Pyrimethamin zuzuordnen, die auf Phe30 hinorientiert sind,^[102] und so die Ligandensignale jeweils Form A und Form B zuzuordnen (Abbildung 25).

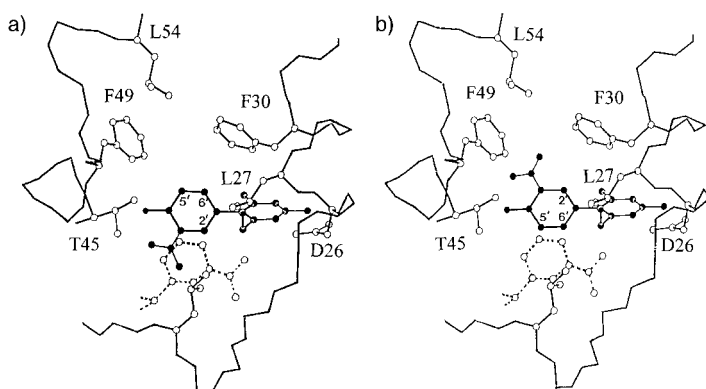


Abbildung 25. Modell der Bindungsstelle im 3'-Nitro-4'-fluorpyrimethamin-DHFR-Komplex für a) Form A und b) Form B. Die Position der Bindungsstelle des NADP⁺-Nicotinamidrings ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Für die Modellierung wurden kristallographische Daten von Matthews et al.^[13, 14] verwendet. (Wiedergabe mit Genehmigung von Birdsall et al.^[102])

Die Bevorzugung der Form A im binären Komplex von 3'-Nitro-4'-Fluorpyrimethamin **15** mit DHFR kann verstanden werden, wenn man das in Abbildung 25 gezeigte Modell des Komplexes in Betracht zieht. In Form A würde der Nitrosubstituent geradewegs auf die vakante Bindungsposition des Nicotinamidrings gerichtet werden, und dies könnte bei der bevorzugten Bindungsart unterstützend wirken. Die Zugabe von NADP⁺ kehrt diese Präferenz für Form A um, was in Einklang ist mit der unvorteilhaften sterischen Wechselwirkung zwischen der voluminösen Nitrogruppe und dem Nicotinamidring des gebundenen NADP⁺.^[102]

Bei ternären Komplexen von DHFR mit Pyrimethamin-Analoga und NADP⁺ wurde festgestellt,^[102] dass das NADP⁺ in zwei unterschiedlichen Konformationen (Form I und II) vorliegt,^[156, 157] die ähnlich denen beim DHFR-Trimethoprim-NADP⁺-Komplex sind. Die Ergebnisse legen nahe, dass die beiden Arten von Konformationszuständen lediglich mit einer Besetzung der Formen IB und IIA verbunden sein könnten. Dies wäre in Einklang mit einer Struktur, in der der Nitrosubstituent in Form IIA auf die vakante Nicotinamidring-Bindungsstelle gerichtet ist und in Form IB davon weg (siehe Abbildung 25).

8.3. Komplexe von *L.-casei*-DHFR mit Folat und NADP⁺

L.-casei-DHFR-Komplexe mit Folat und NADP⁺ liefern weitere Beispiele für Liganden, die in unterschiedlichen Konformationszuständen, aber im Wesentlichen an die gleichen Bindungsstellen im Protein binden. Für den ternären Komplex von *L.-casei*-DHFR mit Folat und NADP⁺ konnten drei unterscheidbare Konformationen, bezeichnet mit Form I, IIA und IIB, NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.^[46, 90, 106, 157] Bei diesen NMR-Untersuchungen wurden isoto-penmarkierte Folate (³H, ¹³C und ¹⁵N) verwendet. So wurden z.B. multiple ¹³C-NMR-Signale, die den drei verschiedenen Formen entsprechen, im ¹³C-NMR-Spektrum des Komplexes von *L.-casei*-DHFR mit NADP⁺ und [4,6,8a-¹³C]Folat **16** gefunden; die Spektren wurden bei unterschiedlichen pH-Werten aufgenommen^[46] (Abbildung 26).

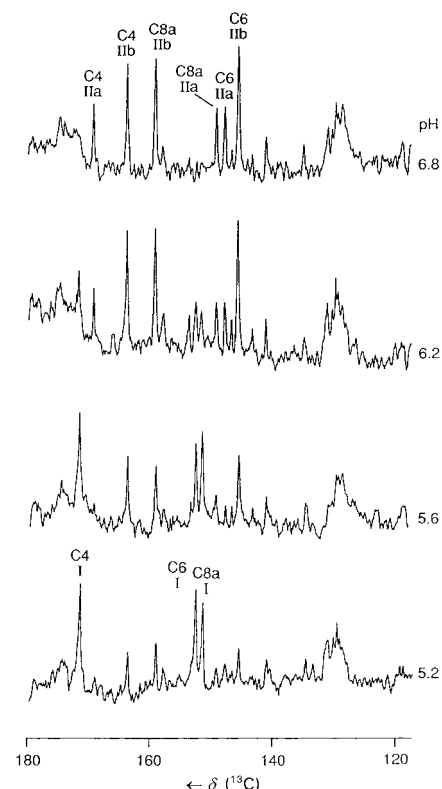


Abbildung 26. Tieffeldbereich des 100.6-MHz-¹³C-NMR-Spektrums des ternären Komplexes von *L.-casei*-DHFR, NADP⁺ und [4,6,8a-¹³C]Folat bei verschiedenen pH-Werten und 281 K. Signale des natürlich vorkommenden ¹³C im Protein werden ebenfalls beobachtet (bei δ = ca. 130, 157 und ca. 175). (Wiedergabe mit Genehmigung von Cheung et al.^[46])

Man erkennt, dass die Besetzung dieser Konformationszustände pH-abhängig ist. Bei pH 6.8 liegen die Formen Ia und Iib vor, wogegen bei pH 5.5 der ternäre Komplex beinahe ausschließlich die Form I bildet. Die NOE-Messungen bei pH 5.2 deuten klar darauf hin, dass sich das H7-Proton des Folats in der Nähe der Methylprotonen von Leu 19 und Leu 27 befindet, wie in Abbildung 27 gezeigt ist. Vergleichbare

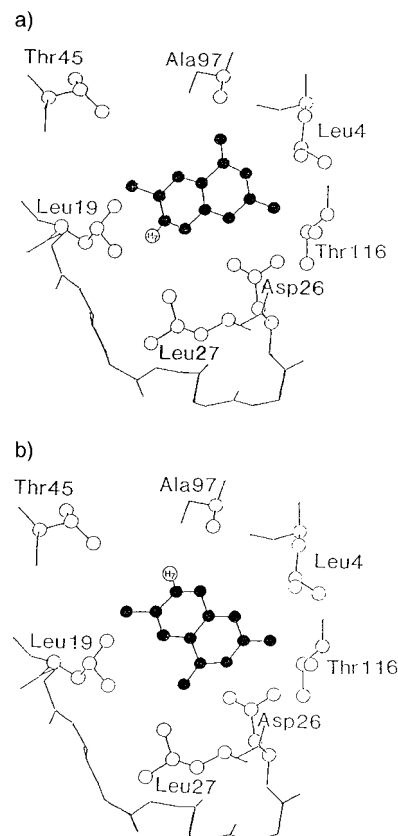
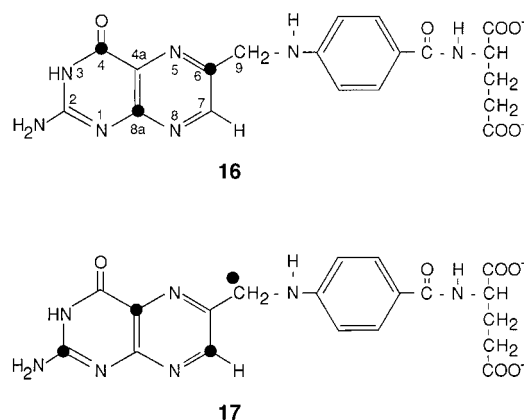


Abbildung 27. a) Vorgeschlagene Konformation des Pterinrings im Folat-DHFR-Komplex in den „inaktiven“ Formen I und Iia (auf Grundlage der Methotrexat-Konformation aus den Kristallstrukturdaten von Matthews und Mitarbeitern^[13, 14]). b) Vorgeschlagene Konformation des Pterinrings in der „aktiven“ Folat-DHFR-Form Iib (gegenüber den anderen Formen um etwa 180° um die Querachse gedreht). (Wiedergabe mit Genehmigung von Feeney^[24])

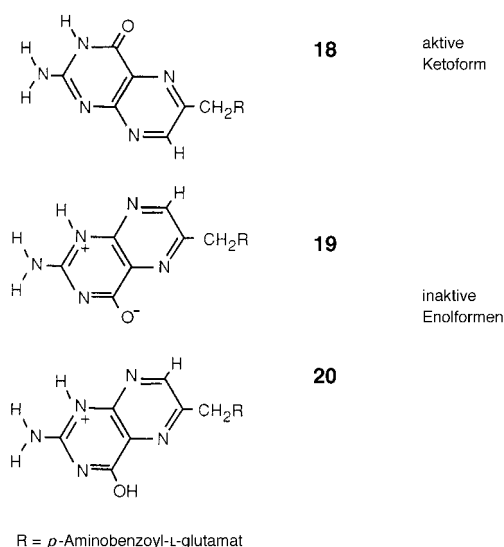
NOEs wurden in einem 2D-HMQC-NOESY- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Experiment am Komplex mit $[4,7,8a,9-^{13}\text{C}]$ Methotrexat detektiert; dort wurden editierte NOEs zwischen H7 von MTX und den Methylprotonen von Leu 19 und Leu 27 detektiert.^[46] Somit ist die Orientierung des Pterinrings in Form I der des Methotrexats im DHFR-Methotrexat-Komplex sehr ähnlich. Wie bereits erwähnt, weiß man von dieser Orientierung, dass sie von der des entsprechenden Rings im Folat in seinem katalytisch aktiven Komplex um etwa 180° abweicht (siehe Abschnitt 2).^[46] NOE-Daten des DHFR-Folat-NADP⁺-Komplexes sprechen dafür, dass Form Iia eine ähnliche Orientierung wie Form I (und wie gebundenes Methotrexat **5**) hat, aber Form Iib eine andere Orientierung des Pterinrings als im Methotrexatkomplex. Das H7-Proton in Form Iib zeigt eine NOE-Verbindung zu den Ala97-Methylprotonen, was seine räumliche Nähe zu diesen Protonen zeigt; jedoch gibt es keine

NOEs zu den Methylprotonen von Leu 19 und Leu 27 (siehe Abbildung 27). Diese NOE-Ergebnisse wurden durch Auswertung der 2D- $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HMQC-NOESY-Spektren von an *L.-casei*-DHFR gebundenen, ^{13}C -markierten Folaten ($[4,6,8a-^{13}\text{C}]$ Folat **16** und $[2,4a,7,9-^{13}\text{C}]$ Folat **17**) bestätigt.^[46]



Aus einer Analyse der von Bolin et al.^[14] erhaltenen Kristallstrukturdaten des DHFR-MTX-NADPH-Komplexes kann geschlossen werden, dass ein „umgedrehter“ Pterinring, der im Wesentlichen die gleiche Bindungsstelle einnimmt, sein H7-Proton in der Nähe der Methylprotonen von Ala 97 haben würde. Daher ist also der wichtigste Konformationsunterschied zwischen den Formen I und Iib die um etwa 180° verschiedene Orientierung des Pterinrings in den beiden Formen, wie in Abbildung 27 gezeigt. Bei Form I (und Form Iia) befindet sich der Pterinring in der gleichen Orientierung wie im Methotrexatkomplex; bei Form Iib ist der Pterinring um etwa 180° um eine verlängerte Liganden-C2-NH₂-Achse verdreht. In dieser Orientierung kann die katalytische Reduktion mit dem korrekten stereochemischen Verlauf stattfinden; sie wird daher als „aktive“ Konformation bezeichnet (Abbildung 27). Dagegen entsprechen die Formen I und Iia mit ihrer Methotrexat-artigen Orientierung des Pterinrings „inaktiven“ Konformationen (Abbildung 27). Der Folat-Pterinring nimmt in allen Formen annähernd die gleiche Bindungsstelle ein.^[46, 157]

NMR-Untersuchungen der chemischen ^{13}C -Verschiebungen von gebundenem Folat lieferten nützliche Informationen über die tautomeren Zustände in den drei Formen im Komplex mit *L.-casei*-DHFR. Durch Auswertung der ^{13}C -NMR-Verschiebungen der markierten, gebundenen Folate **16** und **17** wurde gefunden, dass Form Iib der freien Folsäure bei pH 5.5 sehr ähnlich ist; diese liegt in der Ketoform mit unprotoniertem N1 vor^[166] (siehe Struktur **18**).^[46] Dieses Resultat stützt nicht im Geringsten vorgeschlagene Enzymmechanismen, die Enolformen als Zwischenstufen erfordern, da nur Form Iib die „aktive“ Konformation des Pterinrings aufweist. Dagegen sind die chemischen Verschiebungen von C2 und C4 von gebundenem Folat in Form Iia sehr verschieden von denen der freien Folsäure, was auf eine mögliche Änderung in der Keto/Enol-Tautomerie oder am Protonierungszustand von N1/N3 hindeutet. Studien an Modellverbindungen liefern Schätzwerte für die ^{13}C -NMR-Verschiebungen der verschiedenen Tautomeren- und Ionisierungszu-



stände von Folat. Ein Vergleich dieser Werte mit den experimentellen Daten von gebundenem Folat ergab, dass die Formen I und IIa als Enolformen vorliegen und Form IIb als Ketoform (siehe Strukturen **19** und **20**).

^1H -NMR-Untersuchungen sprechen dafür, dass N1 in den Formen I und IIa protoniert vorliegt. Dies bedeutet, dass die Tautomer- und Ionisierungszustände der Formen I und IIa an N1 beide sehr ähnlich denen von Methotrexat sind, das eine NH_2 -Gruppe an der 4-Position aufweist. Da gezeigt wurde, dass der Pterinring wie im Methotrexat-DHFR-Komplex orientiert ist, ist es wahrscheinlich, dass der Pterinring im Folat in den Formen I und IIa an die gleichen Gruppen im Protein bindet wie Methotrexat.

Durch ortsspezifische Mutagenese an der Position von Asp26 wurde der direkte Beweis erbracht, dass diese Gruppe an der Kontrolle der pH-Abhängigkeit im Konformergleichgewicht beteiligt ist.^[167, 168] Allerdings ergaben neuere NMR-Untersuchungen von DHFR-Folat-NADP⁺-Komplexen mit Asp- γ - ^{13}C -CO₂-markierter DHFR und der Mutante Asp26 → Asn, dass Asp26 die pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts auf indirekte Weise beeinflusst, indem der *pK*-Wert des Pterinrings des gebundenen Folats modifiziert wird.^[51] Dies könnte dadurch bedingt sein, dass Asp26 sich in der Nähe der N1-Position befindet, die in den Formen I und IIa protoniert ist. Die Beobachtung von multiplen Konformationen bei mehr als 20 verschiedenen Komplexen von Dihydrofolat-Reduktase legt nahe, dass dieses Phänomen auch bei anderen Protein-Liganden-Komplexen gängig sein könnte. Dies ist ein wichtiger Befund, der nicht nur für das Verständnis komplexer Struktur-Funktions-Beziehungen bedeutsam ist, sondern auch als Hilfestellung für den Entwurf von Inhibitoren, da jede unterscheidbare Konformation einen neuen Ausgangspunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen liefert.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die NMR-Spektroskopie ist eine leistungsfähige Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen, Konformationen

und dynamischen Prozessen in Komplexen von Dihydrofolat-Reduktase und Folsäure-Antagonisten. Es ist anzunehmen, dass die zunehmende Bekanntheit der Fähigkeiten von NMR-Methoden zum Studium von Protein-Liganden-Komplexen sowie die immer bessere Verfügbarkeit von Hochfeld-NMR-Spektrometern, die hierfür benötigt werden, weitere Arbeiten auf diesem Gebiet initiieren werden. Der Aufwand bei den NMR-Experimenten wird immer geringer, und vergleichende Untersuchungen der Komplexe von Liganden mit DHFRs aus unterschiedlichen Spezies sind immer einfacher durchzuführen. Dies sollte die Bearbeitung von Fragestellungen wie der nach den Ursprüngen der Ligandenbindungsspezifität an verschiedene DHFRs (z.B. bakterielle und Säuger-DHFR) auf direkterem Wege ermöglichen. Strukturuntersuchungen von Komplexen mit DHFRs von Spezies, die bislang noch nicht untersucht worden sind (etwa *Plasmodium falciparum* und *P. carinii*), werden ohne Zweifel bald folgen.

Verbesserte Methoden der Strukturaufklärung – z.B. durch Einbeziehen der Informationen, die die chemischen Verschiebungen bieten – werden schließlich immer detailliertere Kenntnisse der Protein-Liganden-Komplexe in Lösung liefern. Die vor Kurzem entwickelten Ansätze auf der Grundlage der Beiträge von dipolaren Kopplungen als Folge der Orientierung der Moleküle in Lösung (durch Verwendung eines starken magnetischen Feldes, mit Flüssigkristallen oder durch Phagen-Orientierung) sollten einen bedeutenden Einfluss auf Strukturuntersuchungen von DHFR-Liganden-Komplexen haben.^[169] Die verbesserten Strukturinformationen sollten es ermöglichen, noch geringere Unterschiede in den Strukturen verschiedener Komplexe aufzudecken. Zukünftige Arbeiten sollten außerdem zu einem tieferen Verständnis der dynamischen Prozesse führen, die innerhalb solcher Protein-Liganden-Komplexe stattfinden.

Fesik und Mitarbeiter^[170, 171] schlugen eine neuartige Methode für den Entwurf von fest bindenden Enzyminhibitoren vor, die auf DHFR angewendet werden könnte. Bei dieser Methode wird eine große Zahl von Liganden sehr schnell in Bezug auf ihre potentielle Bindung an ein Zielprotein überprüft, indem die Veränderungen der chemischen Verschiebungen in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des ^{15}N -markierten Proteins in Gegenwart von Gemischen der Liganden detektiert werden. Ein bindender Ligand wird als derjenige identifiziert, der die chemischen $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Verschiebungen im Protein verändert. Sobald ein solcher Ligand gefunden wurde, wird das Protein mit diesem Liganden gesättigt und die Suche fortgesetzt, um einen anderen Liganden zu finden, der nichtkompetitiv mit dem ersten Liganden bindet. Wenn ein geeigneter zweiter Kandidat gefunden wurde, wird eine detaillierte NMR-Strukturuntersuchung an dem ternären Komplex unternommen und – auf Grundlage der erhaltenen Informationen – eine Strategie zur chemischen Verknüpfung der schwach bindenden Liganden zu einem hochaffinen neuen Liganden entwickelt. Dieser Ansatz wurde verfolgt, um Inhibitoren mit hoher Bindungsaffinität zu Metalloproteinen wie Stromelysin herzustellen.^[171] Ein solcher Weg könnte übernommen werden, um neue Leitstrukturen für potentielle Inhibitoren von Dihydrofolat-Reduktase zu finden. Ein derartiges Projekt ließe sich am besten in einem Industrielabor durchführen, in dem geeignete Verbindungs-

bibliotheken für eine solche Reihenuntersuchung gut zugänglich sind.

Es ist jetzt deutlich, dass sich DHFR, über seine pharmakologische Bedeutung hinaus, als ein ausgezeichnetes Testobjekt zum Finden von Methoden zur Erforschung der Bindungsspezifität erwiesen hat, und viele der an diesem System erhaltenen Ergebnisse werden sicherlich auch allgemein anwendbar sein.

Ich möchte an dieser Stelle die Mitarbeit vieler meiner Kollegen an den hier beschriebenen NMR-Untersuchungen von L.-casei-DHFR würdigen; vor allem bedanke ich mich für die Hilfe von Arnold Burgen, Gordon Roberts, Berry Birdsall, Andrew Cheung, Vladimir Polshakov, Tom Frenkiel, Gill Ostler und John McCormick. Arnold Burgen danke ich besonders dafür, dass er mein Interesse an molekularer Pharmakologie geweckt und meine frühen NMR-Arbeiten über Komplexe der Dihydrofolat-Reduktase initiiert hat. Berry Birdsall, Andrew Lane, Eva Hyde, Jürgen Schmidt und Mark Williams sei für ihre Kommentare zu diesem Aufsatz gedankt.

Eingegangen am 27. Januar 1999 [A322]

Übersetzt von Dr. Stefan Herrmann, Langenfeld

- [1] S. Farber, L. K. Diamond, R. D. Mercer, R. F. Sylvester, Jr., J. A. Wolff, *New Engl. J. Med.* **1948**, 238, 787–793.
- [2] L. J. Daniel, L. C. Norris, *J. Biol. Chem.* **1947**, 170, 747–756.
- [3] G. H. Hitchings, G. B. Elion, H. Van der Werff, E. A. Falco, *J. Biol. Chem.* **1948**, 174, 765–766.
- [4] S. Futterman, *J. Biol. Chem.* **1957**, 228, 1031–1038.
- [5] G. H. Hitchings, J. A. Burchall, *Adv. Enzymol.* **1965**, 27, 417–468.
- [6] „Chemistry and Biochemistry of Folate“: R. L. Blakley in *Folates and Pterins, Vol. 1* (Hrsg.: R. L. Blakley, S. J. Benkovic), Wiley, New York, **1984**, Kap. 5, S. 191–253.
- [7] J. R. Bertino, *Cancer Res.* **1963**, 23, 1286–1306.
- [8] F. M. Huennekens, M. J. Osborn, *Adv. Enzymol.* **1959**, 21, 369–446.
- [9] „The comparative biochemistry of dihydrofolate reductase“: J. H. Freisheim, D. A. Matthews in *Folate antagonists as therapeutic agents, Vol. 1* (Hrsg.: F. M. Sirotnak, J. J. Burchall, W. B. Ensminger, J. A. Montgomery), Academic Press, Orlando, Florida, **1984**, S. 70–132.
- [10] J. E. Gready, *Adv. Pharmacol. Chemother.* **1980**, 17, 37–102.
- [11] F. M. Huennekens, *Protein Sci.* **1996**, 5, 1201–1208.
- [12] Nobel-Vortrag (Physiologie/Medizin) „Selektive Inhibitoren der Dihydrofolat-reduktase“: G. H. Hitchings, Jr., in *In Vitro Cell. Develop. Biol.* **1989**, 25, 303–310; G. H. Hitchings, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 903–909; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 879–885.
- [13] D. A. Matthews, R. A. Alden, J. T. Bolin, D. J. Filman, S. T. Freer, R. Hamlin, W. G. J. Hol, R. L. Kisliuk, E. J. Pastore, L. T. Plante, N. Xuong, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 6946–6954.
- [14] J. T. Bolin, D. J. Filman, D. A. Matthews, R. C. Hamlin, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 13650–13662.
- [15] M. R. Sawaya, J. Kraut, *Biochemistry* **1997**, 36, 586–603, zit. Lit.
- [16] C. Oefner, A. D'Arcy, F. K. Winkler, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 174, 377–385.
- [17] G. Martorell, M. J. Gradwell, B. Birdsall, C. J. Bauer, T. A. Frenkiel, H. T. A. Cheung, V. I. Polshakov, L. Kuyper, J. Feeney, *Biochemistry* **1994**, 33, 12416–12426.
- [18] W. D. Morgan, B. Birdsall, V. I. Polshakov, D. Sali, I. Kompis, J. Feeney, *Biochemistry* **1995**, 34, 11690–11702.
- [19] A. R. Gargaro, A. Soteriou, T. A. Frenkiel, C. J. Bauer, B. Birdsall, V. I. Polshakov, I. L. Barsukov, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *J. Mol. Biol.* **1998**, 277, 119–134.
- [20] V. I. Polshakov, B. Birdsall, T. A. Frenkiel, A. R. Gargaro, J. Feeney, *Protein Sci.* **1999**, 8, 1–15.
- [21] J. M. Johnson, E. M. Meiering, J. E. Wright, J. Pardo, A. Rosowsky, G. Wagner, *Biochemistry*, **1997**, 36, 4399–4411.
- [22] „The interaction of substrates and inhibitors with dihydrofolate reductase“: G. C. K. Roberts in *Chemistry and Biology of Pteridines* (Hrsg.: J. A. Blair), de Gruyter, Berlin, **1983**, S. 197–214.
- [23] „NMR studies of protein ligand interactions“: J. Feeney in *NMR of Biological Macromolecules* (Hrsg.: S. I. Stassinopoulou), Springer, Berlin, **1994**, S. 115–154.
- [24] J. Feeney, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 40, 141–152; „NMR studies of dynamic processes and multiple conformations in protein ligand complexes“: J. Feeney in *NMR and Biomolecular Structure* (Hrsg.: M. Bertino, T. Molinari, A. Niccolai), VCH, Weinheim, **1991**, S. 189–205.
- [25] „NMR studies of ligand binding to dihydrofolate reductase and their application in drug design“: J. Feeney in *NMR in Drug Design* (Hrsg.: D. Craik), CRC, Boca Raton, FL, **1996**, S. 275–313.
- [26] „NMR spectroscopy and drug design: lessons from dihydrofolate reductase inhibitors“: B. Birdsall in *The Scientific Basis of Antimicrobial Chemotherapy* (Hrsg.: D. Greenwood, F. O'Grady), Cambridge University Press, Cambridge, **1985**, S. 267–281.
- [27] B. Birdsall, J. Andrews, G. Ostler, S. J. B. Tendler, W. Davies, J. Feeney, G. C. K. Roberts, H. T. A. Cheung, *Biochemistry* **1989**, 28, 1353–1362.
- [28] S. J. Benkovic, C. A. Fierke, A. M. Naylor, *Science* **1988**, 239, 1105–1110.
- [29] S. J. Benkovic, J. A. Adams, C. A. Fierke, A. M. Naylor, *Pteridines Folic Acid Deriv.* **1989**, 1, 37–43.
- [30] J. Thillet, J. Absil, S. R. Stone, R. Pictet, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 12500–12508.
- [31] J. E. Villafranca, E. E. Howell, D. H. Voet, M. S. Strobel, R. C. Ogden, J. N. Abelson, J. Kraut, *Science* **1983**, 222, 782–788.
- [32] J. Feeney, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *NMR in Biology* (Hrsg.: R. A. Dwek, I. D. Campbell, R. E. Richards, R. J. P. Williams), Academic Press, London, **1977**, S. 111–124; J. Feeney, B. Birdsall, J. P. Albrand, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, P. A. Charlton, D. W. Young, *Biochemistry* **1981**, 20, 1837–1842.
- [33] D. P. Baccanari, S. Daluge, R. W. King, *Biochemistry* **1982**, 21, 5068–5075.
- [34] B. Birdsall, E. I. Hyde, A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *Biochemistry* **1981**, 20, 7186–7195.
- [35] B. Birdsall, A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts, *Biochemistry* **1980**, 19, 3732–3737; B. Birdsall, A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts, *Biochemistry* **1980**, 19, 3723–3731.
- [36] C. L. Fisher, V. A. Roberts, A. T. Hagler, *Biochemistry* **1991**, 30, 3518–26.
- [37] S. H. Fleischman, C. I. Brooks III, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, 7, 52–61.
- [38] J. G. Dann, G. Ostler, R. A. Bjur, R. W. King, P. Scudder, P. C. Turner, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Biochem. J.* **1976**, 157, 559–571.
- [39] E. J. Pastore, M. Friedkin, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3002–3010.
- [40] M. Y. Lorenson, G. F. Maley, F. Maley, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 3332–3344.
- [41] P. A. Charlton, D. W. Young, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 922–924.
- [42] P. A. Charlton, D. W. Young, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 1349–1353.
- [43] „X-ray crystallography studies of the structure of 5,10-methylenetetrahydrofolic acid“: J. C. Fontecilla-Camps, C. E. Bugg, C. Temple, J. D. Rose, J. A. Montgomery, R. L. Kisliuk in *Chemistry and Biology of Pteridines* (Hrsg.: R. L. Kisliuk, G. M. Brown), Elsevier, New York, **1979**, S. 235–240.
- [44] J. C. Fontecilla-Camps, C. E. Bugg, C. Temple, J. D. Rose, J. A. Montgomery, R. L. Kisliuk, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6114–6115.
- [45] „Dihydrofolate reductases as targets for selective inhibitors“: G. R. Hitchings, B. Roth in *Enzyme Inhibitors as Drugs* (Hrsg.: M. Sandler), Macmillan, London, **1980**, S. 263–270.
- [46] H. T. A. Cheung, B. Birdsall, T. A. Frenkiel, J. Feeney, *Biochemistry* **1993**, 32, 6846–6854.
- [47] B. S. Selinsky, M. E. Perlman, R. E. London, C. J. Unkefer, J. Mitchell, R. L. Blakley, *Biochemistry* **1990**, 29, 1290–1296.
- [48] C. Bystroff, S. J. Oatley, J. Kraut, *Biochemistry* **1993**, 29, 3263–3277.
- [49] R. L. Blakley, J. R. Appleman, J. H. Freisheim, M. J. Jablonsky, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 306, 501–509.

- [50] W. R. Cannon, B. J. Garrison, S. J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2386–2395.
- [51] B. Birdsall, M. G. Cassarotto, H. T. A. Cheung, J. Basran, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *FEBS Lett.* **1997**, *402*, 157–161.
- [52] C. J. Falzone, S. J. Benkovic, P. E. Wright, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9667–9677.
- [53] B. J. Stockman, N. R. Nirmala, G. Wagner, T. J. Delcamp, M. T. DeYarman, J. H. Freisheim, *Biochemistry* **1992**, *31*, 218–229.
- [54] I. P. Gerothanassis, B. Birdsall, C. J. Bauer, T. A. Frenkiel, J. Feeney, *J. Mol. Biol.* **1992**, *204*, 549–554.
- [55] E. M. Meiering, H. J. Li, T. J. Delcamp, J. H. Freisheim, G. Wagner, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 309–325; E. M. Meiering, G. Wagner, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 294–308.
- [56] J. Andrews, C. A. Fierke, B. Birdsall, G. Ostler, J. Feeney, G. C. K. Roberts, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5743–5750.
- [57] C. R. Wagner, J. Thillet, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7834–7840.
- [58] G. Maharaj, B. S. Selinsky, J. R. Appleman, M. Perlman, R. E. London, R. L. Blakley, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4554–4560.
- [59] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, **1986**; K. Wüthrich, *Science* **1989**, *243*, 45–50.
- [60] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Science* **1991**, *252*, 1390–1399.
- [61] M. D. Carr, B. Birdsall, J. Jimenez-Barbero, V. I. Polshakov, C. J. Bauer, T. A. Frenkiel, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6330–6341.
- [62] A. Soteriou, M. D. Carr, T. A. Frenkiel, J. E. McCormick, C. J. Bauer, D. Sali, B. Birdsall, J. Feeney, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 535–546.
- [63] S. Altmann, A. M. Labhardt, H. Senn, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 445–446.
- [64] J. Andrews, G. M. Clore, R. W. Davies, A. M. Gronenborn, B. Gronenborn, D. Kalderon, P. C. Papadopoulos, S. Schafer, P. F. G. Sims, R. Stancombe, *Gene* **1985**, *35*, 217–222.
- [65] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659–4667.
- [66] T. A. Frenkiel, C. J. Bauer, M. D. Carr, B. Birdsall, J. Feeney, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 420–425.
- [67] M. Ikura, A. Bax, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9020–9022.
- [68] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Prog. NMR Spectrosc.* **1992**, *23*, 43–92.
- [69] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496–514.
- [70] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772–7777.
- [71] S. J. Archer, M. Ikura, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, *95*, 636–641.
- [72] A. Bax, G. M. Clore, P. C. Driscoll, A. M. Gronenborn, M. Ikura, L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 620–627.
- [73] S. W. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, *Quart. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 97–131.
- [74] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.
- [75] D. G. Davis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2820–2821.
- [76] S. J. Hammond, B. Birdsall, M. S. Searle, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *J. Mol. Biol.* **1986**, *188*, 81–97.
- [77] J. Feeney, G. C. K. Roberts, B. Birdsall, D. V. Griffiths, R. W. King, P. Scudder, A. S. V. Burgen, *Proc. R. Soc. London B* **1977**, *196*, 267–290; D. V. Griffiths, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *446*, 479–485; J. Feeney, G. C. K. Roberts, D. V. Griffiths, J. Thomson, R. W. King, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2316–2321; J. Feeney, B. Birdsall, J. Akiboye, S. J. B. Tendler, J. Jimenez-Barbero, G. Ostler, J. R. P. Arnold, G. C. K. Roberts, A. Kühn, K. Roth, *FEBS Lett.* **1989**, *248*, 57–61.
- [78] M. S. Searle, S. J. Hammond, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, R. W. King, D. V. Griffiths, *FEBS Lett.* **1986**, *194*, 165–170.
- [79] B. Birdsall, J. Feeney, D. V. Griffiths, S. Hammond, B. J. Kimber, R. W. King, G. C. K. Roberts, M. S. Searle, *FEBS Lett.* **1984**, *175*, 364–368.
- [80] J. Feeney, B. Birdsall, G. Ostler, M. D. Carr, M. Kairi, *FEBS Lett.* **1990**, *272*, 197–199.
- [81] G. Ostler, A. Soteriou, C. M. Moody, J. A. Khan, B. Birdsall, M. D. Carr, D. W. Young, J. Feeney, *FEBS Lett.* **1993**, *318*, 177–180.
- [82] B. Birdsall, J. R. P. Arnold, J. Jimenez-Barbero, T. A. Frenkiel, C. J. Bauer, S. J. B. Tendler, M. D. Carr, J. A. Thomas, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 659–668.
- [83] J. Feeney, G. C. K. Roberts, R. Kaptein, B. Birdsall, A. Gronenborn, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2466–2472.
- [84] B. J. Kimber, D. V. Griffiths, B. Birdsall, R. W. King, P. Scudder, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1977**, *16*, 3492–3350; B. J. Kimber, J. Feeney, G. C. K. Roberts, B. Birdsall, A. S. V. Burgen, B. D. Sykes, *Nature* **1978**, *271*, 184–185.
- [85] J. Feeney, J. E. McCormick, C. J. Bauer, B. Birdsall, C. M. Moody, B. A. Starkmann, D. W. Young, P. Francis, R. H. Havlin, W. D. Arnold, E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8700–8706.
- [86] L. Cocco, B. Roth, C. Temple, J. A. Montgomery, R. E. London, R. L. Blakley, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *226*, 567–577; L. Cocco, R. L. Blakley, T. I. Walker, R. E. London, N. A. Matwiyoff, *Biochemistry* **1978**, *17*, 4285–4290.
- [87] G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, V. Yuferov, J. Dann, R. Bjur, *Biochemistry* **1974**, *13*, 5351–5357.
- [88] J. Feeney, J. G. Batchelor, J. P. Albrand, G. C. K. Roberts, *J. Magn. Reson.* **1979**, *33*, 519–529.
- [89] B. Birdsall, A. Gronenborn, E. I. Hyde, G. M. Clore, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1982**, *21*, 5831–5838.
- [90] B. Birdsall, J. De Graw, J. Feeney, S. J. Hammond, M. S. Searle, G. C. K. Roberts, W. T. Colwell, J. Crase, *FEBS Lett.* **1987**, *217*, 106–110.
- [91] H. T. A. Cheung, B. Birdsall, J. Feeney, *FEBS Lett.* **1992**, *312*, 147–151.
- [92] A. W. Bevan, G. C. K. Roberts, J. Feeney, I. Kuyper, *Eur. Biophys. J.* **1985**, *11*, 211–218.
- [93] M. S. Searle, M. J. Forster, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, H. T. A. Cheung, I. Kompis, A. J. Geddes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3787–3791.
- [94] H. T. A. Cheung, M. S. Searle, J. Feeney, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, I. Kompis, S. J. Hammond, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1925–1931.
- [95] F.-Y. Huang, Q.-X. Yang, T.-H. Huang, *FEBS Lett.* **1991**, *289*, 231–234.
- [96] F.-Y. Huang, Q.-X. Yang, T.-H. Huang, L. Gelbaum, L. F. Kuyper, *FEBS Lett.* **1991**, *283*, 44–46.
- [97] S. W. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, E. T. Olejniczak, R. T. Gampe, Jr. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 161–167.
- [98] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659–4667.
- [99] B. Birdsall, V. I. Polshakov, J. Feeney, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [100] E. I. Hyde, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 3738–3746; E. I. Hyde, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 3746–3754; J. L. Way, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1975**, *14*, 3470–3475.
- [101] B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, J. G. Dann, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 5597–5604; B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *FEBS Lett.* **1980**, *120*, 107–109.
- [102] S. J. B. Tendler, R. J. Griffin, B. Birdsall, M. F. G. Stevens, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *FEBS Lett.* **1988**, *240*, 201–204; B. Birdsall, S. J. B. Tendler, J. R. P. Arnold, J. Feeney, R. J. Griffin, M. D. Carr, J. A. Thomas, G. C. K. Roberts, M. F. G. Stevens, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9660–9667; J. Feeney, C. J. Bauer, T. Frenkiel, B. Birdsall, M. D. Carr, G. C. K. Roberts, J. R. P. Arnold, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 607–613.
- [103] J. P. Albrand, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, *1*, 37–41; J. Feeney, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 628–633.
- [104] P. J. Cayley, J. P. Albrand, J. Feeney, G. C. K. Roberts, E. A. Piper, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3886–3895.
- [105] A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 115–119.
- [106] N. Curtiss, S. Moore, B. Birdsall, J. Bloxidge, C. Gibson, J. R. Jones, J. Feeney, *Biochem. J.* **1994**, *303*, 401–405.
- [107] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, *Biochem. J.* **1984**, *217*, 659–666.
- [108] J. Feeney, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Nature* **1975**, *257*, 564–566; B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *FEBS Lett.* **1977**, *80*, 313–316; I. P. Gerothanassis, B. Birdsall, C. J. Bauer, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 173–177.

- [109] P. J. Cayley, J. Feeney, B. J. Kimber, *Int. J. Biol. Macromol.* **1980**, *2*, 251–255.
- [110] B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *FEBS Lett.* **1977**, *80*, 313–316.
- [111] M. P. Williamson, T. K. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295–315.
- [112] A. T. Brünger, X-PLOR 3.1. – A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven, CT, **1992**.
- [113] M. Nilges, A. M. Gronenborn, A. T. Brünger, G. M. Clore, *Protein Eng.* **1988**, *2*, 27–38.
- [114] V. I. Polshakov, T. A. Frenkiel, B. Birdsall, A. Soteriou, J. Feeney, *J. Magn. Reson. Ser. X* **1995**, *108*, 31–43.
- [115] M. J. Gradwell, J. Feeney, *J. Biomol. NMR* **1996**, *7*, 48–58.
- [116] D. J. Antonjuk, B. Birdsall, A. S. V. Burgen, H. T. A. Cheung, G. M. Clore, J. Feeney, A. Gronenborn, G. C. K. Roberts, W. Tran, *Br. J. Pharmacol.* **1984**, *81*, 309–315.
- [117] B. Birdsall, J. Feeney, C. Pascual, G. C. K. Roberts, I. Kompis, R. L. Then, K. Muller, A. Kroehn, *J. Med. Chem.* **1984**, *23*, 1672–1676.
- [118] V. I. Polshakov, B. Birdsall, W. D. Morgan, J. Feeney, *J. Biomol. NMR* **1999**, *114*, 115–122.
- [119] L. Cocco, J. P. Groff, C. Temple, Jr., J. A. Montgomery, R. E. London, N. S. Matwiyoff, R. L. Blakley, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3972–3978.
- [120] R. E. London, E. E. Howell, M. S. Warren, J. Kraut, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7229–7235.
- [121] W. R. Cannon, B. J. Garrison, S. J. Benkovic, *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 656–668.
- [122] G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, S. Daluge, *FEBS Lett.* **1981**, *131*, 85–88.
- [123] G. E. Dale, C. Broger, A. D'Arcy, P. G. Hartman, R. DeHoogt, S. Jolidon, I. Kompis, A. M. Labhardt, H. Langen, H. Locher, M. G. P. Page, D. Stuber, R. L. Then, B. Wipf, C. Oefner *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 23–30.
- [124] A. R. Gargaro, T. A. Frenkiel, P. M. Nieto, B. Birdsall, V. I. Polshakov, W. D. Morgan, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 435–439.
- [125] P. M. Nieto, B. Birdsall, W. D. Morgan, T. A. Frenkiel, A. R. Gargaro, J. Feeney, *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 16–20.
- [126] a) T. Yamazaki, S. M. Pascal, A. U. Singer, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3556–3564; b) G. Wagner, G. Bodenhausen, N. Muller, M. Rance, O. W. Sorensen, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6440–6446; c) G. Wider, D. Neri, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 93–98.
- [127] R. J. Smith, D. H. Williams, K. James, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 682–683.
- [128] G. D. Henry, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 59–66.
- [129] I. P. Gerotheranassis, P. J. Barrie, B. Birdsall, J. Feeney, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 262–266.
- [130] B. Birdsall, D. V. Griffiths, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Proc. R. Soc. London B* **1977**, *196*, 251–265.
- [131] A. M. Gronenborn, B. Birdsall, E. I. Hyde, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1717–1722.
- [132] P. Wyeth, A. Gronenborn, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2608–2615.
- [133] C. E. Johnson, F. A. Bovey, *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 1012–1014.
- [134] D. R. Seeger, D. B. Cosulich, J. M. Smith, M. E. Hultquist, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1753–1758.
- [135] B. J. Roth, C. C. Cheng, *Prog. Med. Chem.* **1982**, *19*, 1–58.
- [136] K. A. Ohemeng, B. J. Roth, *Med. Chem.* **1991**, *30*, 3518–3526.
- [137] V. Cody, N. Galitsky, J. R. Luft, W. Pangborn, A. Rosowsky, R. L. Blakley, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13897–13903.
- [138] C. D. Selassie, Z. X. Fang, R. L. Li, C. Hansch, G. Debnath, T. E. Klein, R. Langridge, B. T. Kaufman, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1895–1905.
- [139] B. J. Roth, *Fed. Proc.* **1986**, *45*, 2765–2772.
- [140] L. F. Kuypers, B. Roth, D. P. Baccanari, R. Ferone, C. R. Beddell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. G. Dann, F. E. Norrington, D. J. Baker, P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1120–1122.
- [141] C. Hansch, *Drug Intell. Clin. Pharm.* **1982**, *16*, 391–396.
- [142] B. J. Roth, E. Aig, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1998–2004.
- [143] W. D. Morgan, B. Birdsall, P. M. Nieto, A. R. Gargaro, J. Feeney, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2127–2134.
- [144] R. J. Breckenridge, *Experientia* **1991**, *147*, 1148–1161.
- [145] D. M. Epstein, S. J. Benkovic, P. E. Wright, *Biochemistry* **1995**, *34*, 11037–11048.
- [146] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 586–594.
- [147] C. S. Verma, S. Fischer, L. S. D. Caves, G. C. K. Roberts, R. E. Hubbard, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2510–2518.
- [148] V. I. Polshakov, B. Birdsall, J. Feeney, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15962–15969.
- [149] A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts, J. Feeney, *Nature* **1975**, *253*, 753–754.
- [150] L. Li, C. J. Falzone, P. E. Wright, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7826–7833.
- [151] B. Birdsall, A. Gronenborn, G. M. Clore, E. I. Hyde, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Pteridines Folic Acid Deriv.* **1982**, 563–566.
- [152] B. Birdsall, A. Gronenborn, G. M. Clore, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101*, 1139–1144.
- [153] „Dihydrofolate reductase: interactions with the coenzyme NADPH“: J. Feeney, B. Birdsall, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen in *NMR in Biology* (Hrsg.: R. A. Dwek, I. D. Campbell, R. E. Richards, R. J. P. Williams), Academic Press, London, **1977**, S. 111–124.
- [154] J. P. Groff, R. E. London, L. Cocco, R. L. Blakley, *Biochemistry* **1981**, *20*, 6169–6178.
- [155] M. Johnson, E. M. Meiering, J. E. Wright, J. Pardo, A. Rosowsky, G. Wagner, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4399–4411.
- [156] A. M. Gronenborn, B. Birdsall, E. I. Hyde, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Nature* **1981**, *290*, 273–274.
- [157] A. M. Gronenborn, B. Birdsall, E. I. Hyde, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. S. V. Burgen, *Mol. Pharm.* **1981**, *20*, 145–153; B. Birdsall, A. W. Bevan, C. Pascual, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1984**, *23*, 4733–4742; B. Birdsall, J. Feeney, S. J. B. Tendler, S. J. Hammond, G. C. K. Roberts, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2297–2305.
- [158] R. E. London, G. P. Groff, R. L. Blakley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *86*, 779–786.
- [159] S. J. Hammond, B. Birdsall, J. Feeney, M. S. Searle, G. C. K. Roberts, H. T. A. Cheung, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8585–8590.
- [160] C. J. Falzone, P. E. Wright, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2184–2191.
- [161] G. M. Clore, G. C. K. Roberts, A. Gronenborn, B. Birdsall, J. Feeney, *J. Magn. Reson.* **1981**, *45*, 151–161.
- [162] B. T. Hill, L. A. Price, *Cancer Treat. Rev.* **1980**, *7*, 95–112.
- [163] E. A. Bliss, R. J. Griffin, M. F. G. Stevens, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1987**, 2217–2228.
- [164] R. J. Griffin, M. A. Meek, C. H. Schwalbe, M. F. G. Stevens, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2468–2474.
- [165] D. J. Baker, C. R. Beddell, J. N. Champness, P. J. Goodford, F. E. A. Norrington, B. Roth, D. K. Stammers in *Chemistry and Biology of Pteridines* (Hrsg.: J. D. Blair), de Gruyter, Berlin, **1982**, S. 545–549.
- [166] R. L. Blakley, *The biochemistry of folic acid and related pteridines*, North-Holland, Amsterdam-London, **1969**.
- [167] M. A. Jimenez, J. R. P. Arnold, J. Andrews, J. A. Thomas, G. C. K. Roberts, B. Birdsall, J. Feeney, *Protein Eng.* **1989**, *2*, 627–631.
- [168] J. Basran, M. G. Casarotto, I. L. Barsukov, G. C. K. Roberts *Biochemistry*, **1995**, *34*, 2872–2882.
- [169] J. H. Prestegard, *Nat. Struct. Biol. NMR Suppl.* **1998**, 517–522.
- [170] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [171] P. J. Hajduk, G. Sheppard, D. G. Nettesheim, E. T. Olejniczak, S. B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera, P. A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T. F. Holzman, D. W. Morgan, S. K. Davidsen, J. B. Summers, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5818–5827.
- [172] P. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 946–950.