

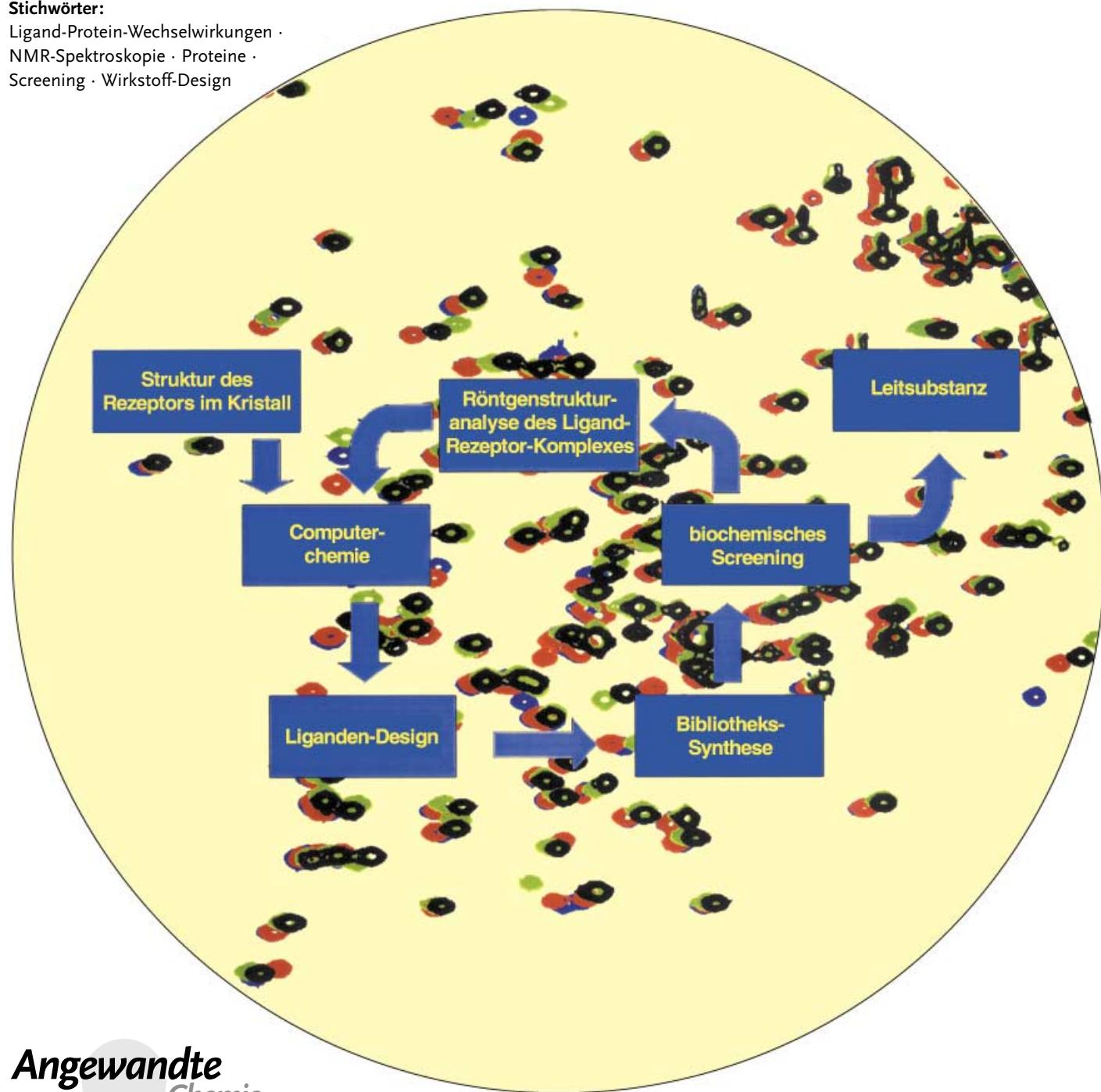
## NMR-Spektroskopie von Biomolekülen

# NMR-Methoden zum strukturgestützten Wirkstoff-Design

Steve W. Homans\*

### Stichwörter:

Ligand-Protein-Wechselwirkungen ·  
NMR-Spektroskopie · Proteine ·  
Screening · Wirkstoff-Design



Die biomolekulare NMR-Spektroskopie wurde in den vergangenen Jahren eindrucksvoll weiterentwickelt und ist inzwischen zu einer extrem leistungsstarken Methode zur Untersuchung von Strukturen, Dynamik und Wechselwirkungen von Biomolekülen gereift. Frühere Einschränkungen hinsichtlich der Molekülgröße sind weitgehend überwunden, sodass mittlerweile Systeme von bis zu 900 kDa untersucht wurden. Die NMR-Spektroskopie hat sich als effiziente Methode für das schnelle Liganden-Screening bewährt, interessante Perspektiven für eine Anwendung bieten sich außerdem beim strukturbasierten Wirkstoff-Design an, z. B. zur raschen Bestimmung von globalen Proteinfaltungen, zur Strukturcharakterisierung von Ligand-Protein-Komplexen und zur Ableitung von thermodynamischen Parametern. Ein wichtiger Vorteil der Methode ist, dass Wechselwirkungen in Lösung untersucht werden und auf eine zeitaufwändige Kristallisation verzichtet werden kann. Dieser Aufsatz konzentriert sich auf eine Anzahl neuer Entwicklungen und zeigt auf, wie mithilfe der NMR-Spektroskopie Engstellen in der gegenwärtigen strukturbasierten Wirkstoffsuche passiert werden können.

## 1. Einleitung

Das Humangenomprojekt liefert eine Fülle an Informationen über Genexpressionsprodukte, deren Funktion vielfach noch unbekannt ist. Die Identifizierung der Funktion dieser Moleküle und ihrer Wechselwirkungen in der Homöostase der Zelle wird noch nie dagewesene Möglichkeiten für therapeutische Eingriffe liefern. Ebenso ergeben sich durch die steigende Zahl an Krankheitserregern mit bekannten Genomsequenzen neue Perspektiven für die Entwicklung von Antibiotika. Dies wiederum hat dazu geführt, dass sich der Bedarf zur Aufklärung dreidimensionaler Proteinstrukturen drastisch erhöht hat. Die immer größer werdende Diskrepanz zwischen der Zahl der gelösten Proteinstrukturen und der Zahl der verfügbaren Proteinsequenzen verlangt nach einer schnellen und robusten Methode zur Bestimmung von globalen Proteinfaltungen.

Vom Standpunkt des strukturbasierten Wirkstoff-Designs ist die Strukturaufklärung nur ein Teil der Leitsubstanzsuche,

## Aus dem Inhalt

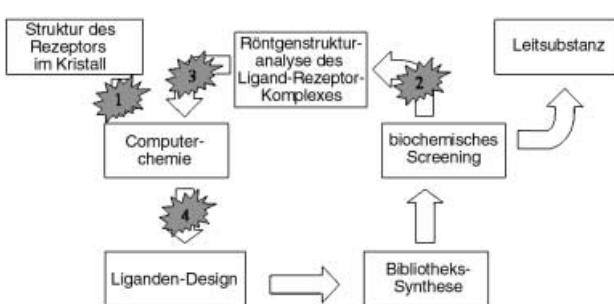
1. Einleitung	293
2. Aufklärung von Proteinstrukturen	293
3. Liganden-Screening	296
4. Aufklärung von Komplexstrukturen	298
5. Molekulare Dynamik und Liganden-Design	299
6. Zusammenfassung und Ausblick	301

wie der in Abbildung 1 dargestellte iterative Zyklus verdeutlicht. Dieser Prozess von Entwicklung, Synthese, Auswertung und Strukturanalyse umfasst außer der Strukturaufklärung des Zielproteins (oder idealerweise des Komplexes aus Zielprotein und dem natürlichen Liganden) auch die Strukturaufklärung von Ligand-Rezeptor-Komplexen. Darüber hinaus sind eine geeignete Screeningmethode zur Identifizierung aktiver Liganden sowie idealerweise Kenntnisse über die molekulare Basis von Liganden-Affinität und -Spezifität erforderlich. Angesichts dieser Anforderungen ist es nicht überraschend, dass eine Anzahl von Engpässen in diesem Prozess auftreten kann. Mit dem Aufkommen leistungsstarker NMR-Methoden existiert nun eine Möglichkeit, viele solcher Hindernisse zu umgehen. NMR-Methoden sind ausgezeichnet dafür geeignet, in den in Abbildung 1 hervorgehobenen vier Hauptschritten des iterativen Zyklus eingesetzt zu werden. Thema dieses Aufsatzes ist die Bewertung dieser Methoden, wobei der Schwerpunkt auf den Entwicklungen des letzten Jahrzehnts liegt. Diejenigen werden um Nachsicht gebeten, deren substantielle frühere Beiträge hier nicht ausführlich gewürdigt sind; viele wurden in früheren Übersichten bereits angemessen beschrieben.<sup>[1-8]</sup>

## 2. Aufklärung von Proteinstrukturen

### 2.1. Das Problem

Trotz einer Anzahl signifikanter Fortschritte in der Proteinkristallographie und der biomolekularen NMR-Spektroskopie in den letzten Jahren ist die Aufklärung dreidimen-



**Abbildung 1.** Iterativer Prozess zur Entdeckung von Leitsubstanzen mit „Engpässen“. Neue NMR-Methoden verbessern idealerweise die Effizienz 1) der Proteinstrukturbestimmung, 2) des Liganden-Screenings, 3) der Strukturanalyse von Ligand-Protein-Komplexen und 4) des Liganden-Designs.

[\*] Prof. S. W. Homans  
School of Biochemistry and Molecular Biology  
University of Leeds  
Leeds, LS2 9JT (Großbritannien)  
Fax: (+44) 113-343-3167  
E-mail: s.w.homans@leeds.ac.uk

sionaler Strukturen größerer Makromoleküle weit davon entfernt, Routine zu sein. Abgesehen von Problemen mit der Proteinüberexpression ist es sehr schwierig, einen Zeitraum für die Kristallisation eines Proteins mit Diffraktionsqualität anzugeben, und bestimmte Membranproteine dürften in absehbarer Zukunft überhaupt nicht in hinreichender Qualität zu kristallisieren sein. Für NMR-Methoden zur Aufklärung von Proteinstrukturen sind diese Einschränkungen zwar bedeutungslos, jedoch existiert eine Reihe anderer Nachteile, die ihren Einsatz als eine robuste und automatisierte Methode bislang weitgehend verhindert haben. In erster Linie zu nennen ist der Umstand, dass ein Großteil der beobachteten Resonanzen zugeordnet werden muss, um eine Liste von paarweisen NOE-Abstandsrestriktionen (NOE = Kern-Overhauser-Effekt) zu erzeugen, aus der die dreidimensionale Struktur des Moleküls zu bestimmen ist. Idealerweise werden zehn oder mehr solcher Restriktionen pro Aminosäure benötigt, um eine „gute“ dreidimensionale Struktur zu erhalten. Diese Liste umfasst sowohl Restriktionen, die von der Seitenkette stammen als auch solche vom Rückgrat, sodass per Definition Zuordnungen von Seitenkettenresonanzen erforderlich sind – ein äußerst zeitaufwändiger Prozess, der für eine Automatisierung wenig geeignet ist. Vom Standpunkt der Functional Genomics ist jedoch die Bestimmung der globalen Proteinfaltung im Prinzip ausreichend, um eine Genfunktion auf Grundlage einer dreidimensionalen Strukturhomologie zuzuordnen. Während eine globale Faltung für eine Leitstrukturoptimierung, die im Allgemeinen eine atomare Strukturauflösung erfordert, sicher unzureichend ist, können solche niedrig aufgelösten Strukturen für ein SAR-by-NMR-Screening herangezogen werden; dabei wird das Protein zugeordnet, ohne dass eine dreidimensionale Struktur verfügbar ist.

## 2.2. NOE-Methoden

Da die Zuordnung von Seitenkettenresonanzen sehr zeitaufwändig ist, überrascht es nicht, dass sich frühe Ansätze zur Bestimmung von globalen Proteinfaltungen ausschließlich auf NOE-Restriktionen des Proteinrückgrats gestützt haben. Einer der erfolgreichsten Ansätze stammt von Mal et al.,<sup>[9]</sup> die 155 Rückgratamid-NOEs und sieben Tryptophanindol-



Steve Homans promovierte 1982 im Fach Biochemie an der Universität Oxford. Nach einem Postdoc-Aufenthalt bei Prof. Raymond Dwek in Oxford wechselte er als Lecturer in Biochemie an die Universität Dundee. 1996 wurde er Professor für Biophysikalische Chemie an der Universität St. Andrews, 1997 wurde er zum Fellow of the Royal Society of Edinburgh gewählt. 1999 nahm er eine Professur in Strukturbioologie an der Universität Leeds an. Seine Forschungsinteressen umfassen die NMR-Spektroskopie von Kohlenhydraten und Proteinen sowie die Dynamik und Thermodynamik von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Rückgratamid-NOEs zur Bestimmung der globalen Faltung der Fyn-SH3-Domäne nutzten. Insbesondere ermöglichte die Verwendung eines perdeuterierten <sup>15</sup>N-markierten Proteins die Messung von NOEs zwischen Amid-Protonen, die bis zu 0.7 nm voneinander entfernt waren. Damit wurden entscheidende Informationen über weitreichende Kopplungen erhalten, mit denen die globale Faltung bestimmt werden konnte. Obwohl nur insgesamt 162 Restriktionen eingesetzt wurden, ergab sich eine respektable mittlere quadratische Abweichung (rmsd) der Schweratome von 0.29 nm in Bezug auf die Struktur im Kristall.

Nachdem erkannt worden war, dass die Genauigkeit der Bestimmung einer globalen Faltung stark von der Topologie abhängt, führten Kay et al. eine Strategie ein, die auf dem selektiven Einbau von protonierten Methylgruppen in ansonsten perdeuterierte Proteine basiert,<sup>[10]</sup> um so die Zahl der verfügbaren konformativen Restriktionen zu vergrößern. Diese Methode mit 287 Amid-Amid-, Methyl-Amid- und Methyl-Methyl-NOE-Restriktionen ergab für Schweratome der PLCC-SH2-Domäne einen rmsd-Wert von 0.44 nm in Bezug auf die hochauflöste Struktur in Lösung. Wie allerdings Clore et al. aufzeigten,<sup>[11]</sup> waren Ansätze, globale Faltungen ausschließlich durch NOE-Daten zu bestimmen, insgesamt wenig erfolgreich. Die Genauigkeiten, mit denen die Positionen von Rückgratatomen bestimmt werden konnten, lagen zwischen 0.25 und 0.7 nm.

## 2.3. RDC-Methoden

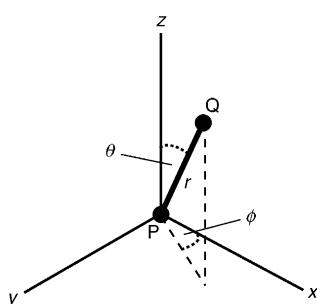
Ebenfalls Clore et al. zeigten,<sup>[11]</sup> dass mit RDC-Messungen (RDC = dipolare Restkopplung, „residual dipolar coupling“) eine signifikante Verbesserung der Genauigkeit zu erzielen ist, wenn diese als Restriktionen zusammen mit NOE-Minimaldatensätzen (wie den in Abschnitt 2.2 beschriebenen) angewendet werden. Im Unterschied zu NOEs, aus denen sich Abstandsrestriktionen ableiten, liefern RDCs direkte Informationen über die weitreichende anguläre Orientierung.

Um dies zu verstehen, ist ein kurzer Exkurs in die Theorie der dipolaren Restkopplung notwendig. Formal ist die dipolare Kopplung ( $D_{PQ}$ ) zwischen zwei Kernen P und Q durch Gleichung (1) gegeben.  $k$  ist eine Konstante, die eine

$$D_{PQ}(\theta, \phi) = -\frac{k}{r_{PQ}^3} [A_a(3\cos^2\theta - 1) + \frac{3}{2}A_r\sin^2\theta\cos 2\phi] \quad (1)$$

Reihe von Faktoren summiert, die für unsere Diskussion keine Rolle spielen,  $r_{PQ}$  ist der Abstand zwischen P und Q,  $A_a$  und  $A_r$  sind Komponenten einer mathematischen Funktion (des Orientierungstensors  $A$ ),  $\theta$  und  $\phi$  sind Zylinderkoordinaten, die die Orientierung des Vektors  $P-Q$  im Hauptachsensystem von  $A$  beschreiben.

Die Bedeutung dieser Gleichung lässt sich anhand von Abbildung 2 veranschaulichen. Für unsere Zwecke kann man sich das Hauptachsensystem des Orientierungstensors als ein imaginäres kartesisches Koordinatensystem vorstellen, in dem sich das interessierende Molekül befindet. Wenn wir P und Q als direkt gebundene NMR-aktive Kerne definieren, dann ist  $r_{PQ}$  die Länge der kovalenten Bindung und somit



**Abbildung 2.** Abhängigkeit der dipolaren Restkopplung ( $D_{PQ}$ ) von der Orientierung eines Bindungsvektors P-Q in Zylinderkoordinaten ( $r, \theta, \phi$ ) innerhalb des Hauptachsensystems ( $x, y, z$ ) des Orientierungstensors.

bekannt. Die dipolare Restkopplung ( $D_{PQ}$ ) hängt dann, wie in Abbildung 2 gezeigt, von der Orientierung des Bindungsvektors im imaginären Koordinatensystem ab.  $A_a$ ,  $A_r$  und die Orientierung des Koordinatensystems können mithilfe der gemessenen dipolaren Restkopplungen im Molekül bestimmt werden.<sup>[12,13]</sup> Durch Messung von  $D_{PQ}$  lässt sich also die Orientierung der Bindung im Koordinatensystem bestimmen. Wichtig ist, dass die gemessene dipolare Kopplung *jedes* NMR-aktiven Atoms mit der Orientierung des Bindungsvektors innerhalb desselben imaginären Koordinatensystems verknüpft ist. Somit werden die Orientierungen der Bindungsvektoren an gegenüberliegenden Enden eines Moleküls durch ein gemeinsames Koordinatensystem in Zusammenhang gebracht, wodurch, wie eingangs erwähnt, Informationen über weitreichende anguläre Orientierungen zugänglich werden. Eine Komplikation ergibt sich daraus, dass mehrere Orientierungen des Bindungsvektors zu den gleichen Werten von  $D_{PQ}$  führen können.

Die dipolare Kopplung resultiert im NMR-Spektrum in einer Aufspaltung der Resonanzlinien – analog wie bei skalaren  $J$ -Kopplungen. In isotroper Lösung sind wegen der ungerichteten Molekühlbewegung sämtliche Orientierungen des Bindungsvektors beteiligt, sodass die dipolare Kopplung im Mittel null wird. Dagegen ist im festen Zustand oder unter anderen Bedingungen, bei denen das Moleköl stark ausgerichtet ist, die dipolare Kopplung sehr stark, und alle NMR-aktiven Kerne sind untereinander durch dipolare Kopplungen verknüpft, ungeachtet der  $r^{-3}$ -Abhängigkeit der Wechselwirkung. Das Ergebnis ist ein Spektrum, das nicht interpretierbar ist. Um Makromoleküle untersuchen zu können, ist daher eine Methode erforderlich, bei der das Moleköl nur schwach ausgerichtet ist. Ein solches experimentelles System wurde von Tjandra und Bax entdeckt, die erkannten, dass dipolare Kopplungen in verdünnten flüssigkristallinen Medien gemessen werden können.<sup>[14]</sup> Wegen der schwachen Ausrichtung innerhalb dieses Mediums entspricht die dipolare Kopplung nur einem Bruchteil der Kopplung in hoch ausgerichteten Systemen (daher auch der Name „dipolare Restkopplung“). Seit den richtungsweisenden Studien von Tjandra und Bax sind inzwischen viele für biologische Systeme geeignete Medien beschrieben worden.<sup>[15-22]</sup> Das Phänomen, dass die Orientierung eines Moleküls in zwei unterschiedlichen Medien im Allgemeinen nicht die gleiche

sein wird, kann genutzt werden, um Probleme durch die oben erwähnte Mehrfachorientierung von Bindungsvektoren zu umgehen. Es kann mathematisch gezeigt werden, dass die simultane Lösung der dipolaren Kopplungsgleichung in zwei unterschiedlich ausrichtenden Medien (d.h. Medien mit unterschiedlichen Orientierungstensoren) zu einer eindeutigen Vektororientierung führt.<sup>[23,24]</sup>

Da RDCs sehr einfach aus den Aufspaltungen in NMR-Spektren abgeleitet werden können, überrascht es nicht, dass man sich in der Folge verstärkt einer Anwendung zur Bestimmung globaler Proteinfaltungen gewidmet hat. Mueller et al. entwickelten eine Methode zur Orientierung von Peptidebenen mithilfe von dipolaren Kopplungen und bestimmten damit die globale Faltung von Maltose bindendem Protein im Komplex mit  $\beta$ -Cyclodextrin. Damit wurden paarweise rmsd-Werte für N- und C-terminierte Domänen von 0.28 nm bzw. 0.31 nm in Bezug auf die Röntgenkristallstruktur erhalten.<sup>[25,26]</sup> Fowler et al.<sup>[27]</sup> nutzten dipolare Restkopplungen ( $N_i\text{-H}_i^N, H_i^N\text{-H}_i^a, H_i^N\text{-H}_{i\pm 1}^a, H_i^N\text{-H}_{i+1}^N$ ) zusammen mit einer kleinen Zahl von Rückgrat-Seitenketten-NOEs, um die Rückgratfaltung des Acyl-Carrier-Proteins mit einem rmsd-Wert von 0.3 nm für die Rückgratatome zu bestimmen.

Hus et al.<sup>[28]</sup> verwendeten weitreichende, in paramagnetischen Systemen zugängliche Restraints in Kombination mit dipolaren Restkopplungen, um die Faltung von Cytochrom c' ohne Anwendung von NOEs zu bestimmen. Dieselbe Arbeitsgruppe bestimmte die globale Faltung von Ubiquitin ausschließlich aus dipolaren Restkopplungen in zwei unabhängigen Tensorsystemen ( $N_i\text{-H}_i^N, C_{i-1}'\text{-N}_i, C_{i-1}'\text{-H}_i^N, C_i^a\text{-C}_i', C^a\text{-H}^a$  und  $C^a\text{-C}^b$ ) mit einem rmsd-Wert für das Rückgrat von 0.1 nm (Reste 1-71) bezüglich der mit konventionellen Methoden bestimmten Struktur in Lösung.<sup>[29]</sup> Hervorragende Ergebnisse wurden außerdem bei der Anwendung von dipolaren Restkopplungen in Kombination mit einem Ersatz von Molekölfragmenten erhalten.<sup>[30-33]</sup> Interessante neuere Entwicklungen betreffen die einstufige Aufklärung von Protein-Unterstrukturen<sup>[34]</sup> durch dipolare Restkopplungen und die simultane Resonanzzuordnung.<sup>[35]</sup>

Aus diesen Entwicklungen wird deutlich, dass durch Verwendung von dipolaren Restkopplungen, entweder allein oder in Kombination mit einer begrenzten Satz von NOEs, die Genauigkeit bei der Bestimmung globaler Faltungen drastisch erhöht werden kann. Erst kürzlich gelang es Giesen et al. ausschließlich durch Verwendung von dipolaren Restkopplungen im Rückgrat ( $N_i\text{-H}_i^N, N_i\text{-C}_{i-1}', H_i^N\text{-C}_{i-1}'$ ) und Amid-Amid-NOEs, die globale Faltung von Ubiquitin mit einem rmsd-Wert von 0.14 nm bezüglich der kristallinen Struktur zu bestimmen (Abbildung 3).<sup>[36]</sup> Insbesondere wurde gezeigt, dass dieser Ansatz mit einer Perdeuterierung<sup>[37]</sup> und einer selektiven Isotopenanreicherung des Rückgrats kompatibel ist<sup>[38,39]</sup> und daher eine optimale Empfindlichkeit für die Strukturaufklärung größerer Proteine bereitstellt. Aufgrund der relativ einfachen Zuordnung von Rückgratresonanzen (im Unterschied zur Zuordnung der Seitenketten signale) bietet sich dieser Ansatz als eine schnelle Methode zur Bestimmung globaler Faltungen an.

Die Effektivität dieser und anderer RDC-Methoden zur Bestimmung globaler Faltungen hängt wahrscheinlich stark von der Topologie ab. Bei Proteinen mit einem hohen Anteil



**Abbildung 3.** Stereoansicht der globalen Faltung von menschlichem Ubiquitin, bestimmt aus dipolaren Restkopplungen des Rückgrats und weitreichenden Amid-Amid-NOEs (schwarz) und Vergleich mit der Struktur im Kristall (grau).<sup>[36]</sup>

an  $\alpha$ -Helices dürften weitreichende Amid-NOE-Restraints nur begrenzt erhältlich sein. Weitreichende NOEs sind im Allgemeinen aber entscheidend für eine korrekte Bestimmung der Faltung, da sie Informationen über die Translationsposition liefern, die in RDCs nicht enthalten sind. Bereits eine kleine Zahl solcher NOEs kann jedoch ausreichend sein: So erhielten Prestegard et al.<sup>[27]</sup> die globale Faltung des Acyl-Carrier-Proteins aus *E. coli*, indem sie RDC-Messungen in Kombination mit einem Rückgrat-Rückgrat-NOE und vier Rückgrat-Seitenketten-NOEs einsetzten. In ähnlicher Weise bestimmten sie die globale Faltung des NodF-Proteins aus *Rhizobium leguminosarum* mithilfe von fünf Rückgrat-Rückgrat-NOEs.

Die Einbeziehung von Seitenketten-NOEs kann die Bestimmung einer globalen Faltung drastisch verlangsamen. Da allem Anschein nach nur wenige NOEs benötigt werden, kann analog zu den von Kay et al. beschriebenen Ansätzen<sup>[10,40-43]</sup> (Abschnitt 2.2) die Zuordnung durch sorgfältige Wahl von Isotopenmarkierungsstrategien erheblich vereinfacht werden. Darüber hinaus bieten jüngste Ergebnisse, wonach dipolare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Restkopplungen Abstandsrestraints von bis zu 0.7 nm in Ubiquitin liefern,<sup>[44]</sup> einen alternativen Zugang zu weitreichenden Restraints für die Bestimmung globaler Faltungen.

#### 2.4. Resümee

Die Anwendung von dipolaren Restkopplungen in Kombination mit wenigen NOE-Restraints bietet einen vielversprechenden Zugang zur Aufklärung von Proteinstrukturen bei niedriger bis mittlerer Auflösung. Strukturen dieser Qualität werden für viele Anwendungen in den Structural Genomics und im NMR-basierten Screening völlig ausreichend sein. Um mit dieser Methode hochauflöste Strukturen zu erhalten, wären zusätzliche konformative Restraints notwendig, wodurch sich wiederum der zeitliche Aufwand für die Zuordnung der Resonanzen drastisch erhöhen würde. In dieser Hinsicht besteht beträchtliches Potenzial für die weitere Optimierung von Isotopenmarkierungsstrategien zur Vereinfachung und Automatisierung des Verfahrens.

### 3. Liganden-Screening

#### 3.1. Das Problem

Liganden-Design ist eine ungenaue Kunst. Ein Grund dafür ist, dass unsere Kenntnisse von den Faktoren, die die Affinität und Spezifität von biomolekularen Wechselwirkungen bestimmen, trotz gewaltiger technischer Fortschritte bei der Strukturaufklärung noch stark rudimentär sind. Schon grundlegende thermodynamische Überlegungen verraten uns, dass die Affinität nicht durch die Struktur allein bestimmt wird, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel von Struktur und Dynamik (siehe Abschnitt 5). Zwar eignet sich eine hoch aufgelöste Struktur eines Ligand-Protein-Komplexes zweifelsohne als Denkanstoß beim Liganden-Design, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass auf der Basis dieser Struktur eine effektive Leitsubstanz entworfen werden kann, sehr klein. Ein Lösungsansatz ist die Synthese nicht nur eines, sondern vieler unterschiedlicher Liganden, die sich von einem gemeinsamen Grundgerüst ableiten, z. B. in einer gerichteten kombinatorischen Bibliothek. Dies wiederum erfordert einen geeigneten Screeningassay. Die chemische Verschiebung ist eine äußerst empfindliche Sonde zur Abtastung der chemischen Umgebung und biomolekularen Wechselwirkungen, und eine Reihe von effektiven NMR-Screeningtechniken wurde in den vergangenen Jahren beschrieben. Diese werden im Folgenden kurz umrissen, eine detailliertere Ausführung findet sich in einer Übersicht von Meyer und Peters.<sup>[45]</sup>

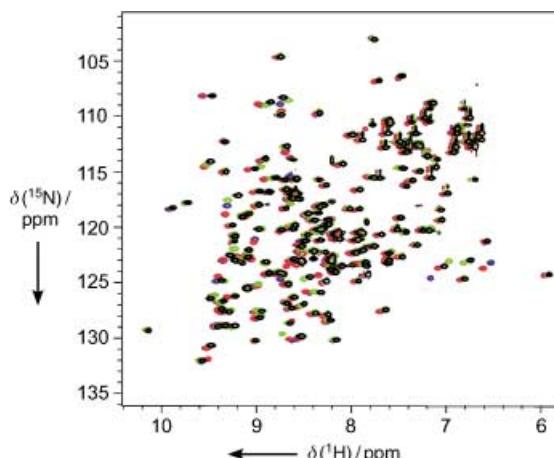
#### 3.2. Messung von Proteinresonanzen

Eine der einfachsten, aber auch effektivsten NMR-Screeningmethoden ist die von Fesik et al. eingeführte zweidimensionale  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektroskopie (HSQC = heteronukleare Einquantenohärenz, „heteronuclear single quantum coherence“).<sup>[46-48]</sup> Das Protein wird  $^{15}\text{N}$ -markiert (eine normalerweise einfache und billige Prozedur), sodass im Spektrum ausschließlich die Proteinresonanzen sichtbar sind und der Ligand (oder mehrere Liganden, bei denen es sich um kleine Moleküle oder Makromoleküle handeln kann) in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt werden kann. Durch Vergleich des HSQC-Spektrums in Gegenwart von Liganden mit einem Referenzspektrum des ligandenfreien Proteins lassen sich anhand von Resonanzverschiebungen zwischen den beiden Spektren Informationen über Bindungsereignisse gewinnen. Eine Anzahl von Liganden, typischerweise zehn, kann in einem Experiment eingesetzt werden. Bei einem Treffer lässt sich der aktive Ligand anschließend durch HSQC-Einzelexperimente ermitteln. Da die chemischen Verschiebungen von Proteinamid-Resonanzen äußerst empfindlich auf die Bindung von Liganden ansprechen, ist die HSQC-Methode eine hoch effektive Methode zur Untersuchung schwach bindender Liganden ( $K_d = 1 \text{ mM}$  oder darunter).

Shuker et al.<sup>[46]</sup> nutzten diesen Ansatz zur Identifizierung und Optimierung affiner Moleküle, indem sie zwei schwach bindende Liganden in angrenzenden Bindungsstellen kova-

lent verknüpften. Um diese Technik anzuwenden, sind natürlich Informationen über die Proteinstruktur erforderlich; beim Fehlen einer Kristallstruktur kann eine NMR-spektroskopisch abgeleitete globale Faltung ausreichend sein (siehe Abschnitt 2).

Abbildung 4 veranschaulicht die hohe Empfindlichkeit der HSQC-Methode. Gezeigt ist eine Überlagerung von  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des  $^{15}\text{N}$ -markierten Hauptharnproteins



**Abbildung 4.** Überlagerte  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Hauptharnprotein der Maus im Komplex mit vier verwandten Liganden. Blau: 2-Methoxypyrazin, rot: 2-Methoxy-3-methylpyrazin, grün: 3-Isopropyl-2-methoxypyrazin, schwarz: 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin.

der Maus („mouse major urinary protein“) im Komplex mit einer Anzahl von verwandten Pyrazinliganden. Bei diesem Beispiel sind sowohl die Resonanzzuordnungen<sup>[49]</sup> als auch die Kristallstrukturen<sup>[50,51]</sup> des Proteins verfügbar, sodass die Aminosäurereste an den Bindungsstellen leicht identifizierbar sind. Durch Messung der Verschiebungsdifferenzen zwischen den Spektren<sup>[52]</sup> lassen sich Informationen über die Position der aliphatischen Seitenketten der Liganden innerhalb der Bindungsstellen erhalten. Die Ergebnisse sind mit Strukturdaten für verwandte Liganden in Einklang.<sup>[51,53]</sup>

Hinsichtlich Einfachheit, Ausführbarkeit und Kosten ist die HSQC-Methode eine attraktive Strategie für das Liganden-Screening, auch wenn sie alles andere als ein Hochdurchsatz-Verfahren ist. Die Methode eignet sich besonders für das Screening von schwach bindenden Liganden, die in konventionellen biochemischen Assays oft nicht erfasst werden. Die Möglichkeit, Änderungen der chemischen Verschiebung als Funktion der Ligandenkonzentration zu messen<sup>[54]</sup> oder die Anwendung von Diffusionsmethoden<sup>[55]</sup> macht die HSQC-Spektroskopie zu einer einfachen Methode zur Messung von Ligandbindungskonstanten.

Eine verwandte Screening-Methode beruht auf der  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Methylgruppen einer Proteinseitenkette. Da eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung bei Screening-Prozeduren angesichts der relativ hohen Proteinmengen im Allgemeinen als viel zu kostspielig gilt, entwickelten Fesik et al. eine raffinierte Methode zur selektiven  $^{13}\text{C}$ -Markierung von Methylgruppen in Seitenketten unter Verwendung von billigem  $^{13}\text{CH}_3\text{I}$ .<sup>[56]</sup> Ein großer Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -

HSQC-Spektren bei gegebener Probenkonzentration erheblich höher aufgelöst sind als  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren. Typischerweise wird eine dreifach höhere Empfindlichkeit für Proteine < 30 kDa erhalten, sodass sich ein  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum z.B. einer 50- $\mu\text{M}$ -Proteinprobe in 10 min aufnehmen lässt. In Kombination mit Deuteriumanreicherung ermöglicht die selektive Methylmarkierung das Screening von Zielproteinen mit mehr als 100 kDa. Durch Implementierung der Kryosonden-Technologie bei mittleren bis hohen Feldern dürfte sich der Einsatzbereich für das NMR-Screening weiter vergrößern lassen. Fernziel ist ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Screening von Proteinen mit natürlicher  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit.

### 3.3. Messung von Ligandresonanzen

Die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methoden sind zwar hoch effektiv, geben aber keine Auskunft darüber, welcher Ligand an das Zielprotein bindet (außer in dem trivialen Fall eines einzigen Liganden- Typs in der Probe), und liefern keine Information über die „aktiven“ chemischen Gruppierungen des Liganden, die mit der Bindungsstelle des Zielproteins wechselwirken. Um solche Informationen zu erhalten, sind NMR-Experimente mit Detektion der Ligandresonanzen erforderlich.

Eine einfache Methode um festzustellen, welcher Ligand aus einer kleinen Gruppe von (typischerweise zehn) Liganden bindet, beruht darauf, die Relaxationseigenschaften oder den Translationsdiffusionskoeffizienten des Liganden im Komplex mit dem Zielprotein mit den Daten des freien Liganden zu vergleichen. Dies gelingt mithilfe einfacher eindimensionaler NMR-Experimente zur Messung von Relaxationszeiten und Diffusionskoeffizienten.<sup>[57]</sup> Eine verwandte Strategie basiert darauf, dass NOEs von Liganden im gebundenen Zustand typischerweise groß und negativ sind, im freien Liganden aber sehr klein.<sup>[58]</sup> Unter den Bedingungen eines schnellen Ligandenaustauschs, d.h. bei relativ schwacher Bindung, können solche Transfer-NOEs (TRNOEs) leicht mit homonuklearen 2D-NMR-Techniken gemessen werden. Insbesondere erfordern diese Strategien keine Isotopenmarkierung, weder des Liganden noch des Proteins. Dies resultiert daraus, dass mit relativ hohen Ligand-Protein-Verhältnissen (typischerweise 15:1) gearbeitet werden kann, wodurch sich die relativ schmalen Ligandresonanzen gut von den breiteren Hintergrund-Proteinresonanzen abheben.

Zur Bestimmung der „aktiven“ Bereiche eines Liganden genügt ein einfaches 1D-NMR-Experiment mit der Sättigungstransfer-Differenz(STD)-NMR-Methode.<sup>[59,60]</sup> Die Methode beruht darauf, dass in großen Komplexen die Protonenmagnetisierung durch einen als Spindiffusion bezeichneten Prozess effizient über das gesamte Molekül (oder die gesamten Moleküle) transferiert wird. Wenn ein Bereich des NMR-Spektrums des Komplexes, der Protein-, aber keine Ligandresonanzen enthält, durch Anlegen eines Radiofrequenzfeldes gesättigt wird (d.h., die Magnetisierung wird gedämpft), dann findet ein effizienter Transfer dieser Sättigung durch das Protein und auch zu Resonanzen des Liganden innerhalb der Proteinbindungsstelle statt. Diese

Technik hat sich als erfolgreiche Methode zur Kartierung der aktiven Bereiche von Liganden bewährt und kann außerdem als einfache Screening-Methode eingesetzt werden.

Die genannten Methoden können bei stark bindenden Liganden scheitern, da in diesem Fall die Austauschphänomene, auf denen diese Verfahren beruhen, nicht auf den geeigneten Zeitskalen stattfinden. Als ein Ausweg kann ein NMR-Reporter-Screening angewendet werden, dessen Prinzip sehr einfach ist: Bei der Aufnahme der Spektren des freien Proteins und des Proteins in Gegenwart von einem oder mehreren Liganden wird ein Reporter-Ligand zugesetzt, der schwach an das Protein bindet. Wenn die Probe einen Liganden enthält, der stärker als der Reporter-Ligand bindet und diesen vom Protein verdrängt, kann das Bindungseignis anhand von Änderungen in der Intensität und Linienbreite des Reporter-Liganden detektiert werden.<sup>[61,62]</sup>

### 3.4. Resümee

Das NMR-Screening ist eine inzwischen gut etablierte Methode beim strukturbasierten Wirkstoff-Design. Ein Bereich, der wahrscheinlich stark von NMR-Methoden profitieren wird, ist die Interactomics-Forschung, d.h. die Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen im Genom. Angesichts der spektakulären Ergebnisse von Wüthrich et al.,<sup>[63]</sup> die die Wechselwirkungen innerhalb des 900-kDa-Komplexes von GroEL-GroES mit TROSY („transverse relaxation optimized spectroscopy“)<sup>[64]</sup> untersuchen konnten, ist davon auszugehen, dass die Molekülgröße kein limitierender Faktor bei künftigen Anwendungen der NMR-Spektroskopie in diesem Bereich sein wird.

## 4. Aufklärung von Komplexstrukturen

### 4.1. Das Problem

Der in Abbildung 1 skizzierte Zyklus der Leitstruktursuche und -optimierung umfasst die Strukturlösung einer Anzahl von Ligand-Protein-Komplexen, und zwar in einem möglichst schnellen Prozess. Somit ist die Röntgenkristallographie wegen der schwierigen Vorhersage des Zeitraums, die eine Kristallisation beansprucht, alles andere als ideal, auch wenn damit hoch aufgelöste Strukturen zugänglich sind. Die hoch auflösende NMR-Spektroskopie bietet sich als eine Alternative an, nicht zuletzt deshalb, weil sich aus einfachen Vorversuchen ableiten lässt, ob die Struktur eines Komplexes aufgeklärt werden kann und welcher ungefähre Zeitraum dafür benötigt wird. Der NMR-Ansatz unterlag ursprünglich einer Anzahl von Einschränkungen, was bald eine Reihe methodischer Verbesserungen nach sich zog – einige sind im Folgenden beschrieben.

### 4.2. NOE-Methoden

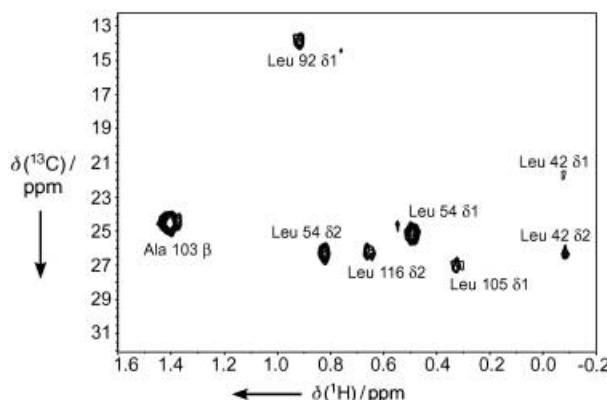
Der naheliegendste Ansatz zur Strukturaufklärung von Ligand-Protein-Komplexen ist die Verwendung von NOE-

Abstandsrestraints – analog zur Aufklärung von Proteinstrukturen. Viele der NOEs sind intermolekularen Ursprungs, und es existiert eine Reihe von Ansätzen, um ihre Identifizierung aus der Unmenge an intramolekularen NOEs des Proteins zu vereinfachen. Im Wesentlichen beruhen diese Methoden darauf, entweder am Protein oder am Liganden eine Isotopenmarkierung einzuführen. Da die Markierung des Proteins mithilfe von rekombinanten DNA-Techniken die weitaus leichtere Variante ist, wurden hierfür die meisten Methoden entwickelt.

Frühe Experimente mit <sup>15</sup>N-angereicherten Proteinen<sup>[65,66]</sup> basierten auf der selektiven Erfassung von NOEs zwischen <sup>15</sup>N- und <sup>14</sup>N-gebundenen Protonen. Auf diese Weise ließen sich sowohl die Protein-Protein- als auch die Ligand-Ligand-NOEs unterdrücken. Die selektive Beobachtung von <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-gebundenen Protonen (Isotopenediting) vor einem Hintergrund mit natürlicher Häufigkeit an <sup>15</sup>N oder <sup>13</sup>C gelingt sehr gut, nicht aber die selektive Beobachtung von <sup>14</sup>N- oder <sup>12</sup>C-gebundenen Protonen vor einem <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-Hintergrund. Das Problem führt daher, dass <sup>15</sup>N- oder <sup>13</sup>C-gebundene Protonen unterdrückt werden, indem man auf die skalare Kopplung zwischen dem Proton und dem Heteroatomkern (<sup>1</sup>J<sub>N,H</sub> oder <sup>1</sup>J<sub>C,H</sub>) zurückgreift. Unter dem Einfluss dieser Kopplung wird die Magnetisierung während der sinusförmigen Evolution mithilfe einer geeigneten Zeitverzögerung herausgemittelt. Die skalaren Kopplungen unterschiedlicher chemischen Gruppen weichen nun aber voneinander ab, sodass eine Verzögerung, die einen bestimmten Protonentyp unterdrückt, auf einen anderen Protonentyp nur teilweise wirkt. Aus diesem Grund litten frühe Isotopenfiltrationsexperimente mit isotopenangereicherten Proteinen unter einem erheblichen Durchbruch der vom Protein abgeleiteten Magnetisierung.

Solche Schwierigkeiten sind inzwischen durch Einführung einer Serie von 3D-NMR-Experimenten weitgehend überwunden.<sup>[67]</sup> Kay et al. wendeten bei diesen Studien eine Verzögerungsperiode mit frequenzmodulierten refokussierten Pulsen an, um ungleiche skalare Kopplungen zu kompensieren. Damit war es möglich, schwache Ligand-Protein-NOEs praktisch ohne störende Proteinresonanzen zu beobachten (Abbildung 5).

Zusätzlich zu der Messung von intermolekularen NOEs können intramolekulare NOEs zur Bestimmung der Ligandenkonformation im gebundenen Zustand genutzt werden. Der einfachste Ansatz für die Messung dieser NOEs ist die Anwendung von Isotopenediting in Kombination mit isotopenangereicherten Liganden.<sup>[68-70]</sup> Von Idealfällen abgesehen, sind der Syntheseaufwand und die Kosten für die Präparation von <sup>13</sup>C-angereicherten Liganden aber untragbar. Als Alternative ermöglicht eine Perdeuterierung des Proteins in Kombination mit homonucleären <sup>1</sup>H-NMR-Methoden die Beobachtung von Interliganden-NOEs.<sup>[71]</sup> Eine Perdeuterierung bietet den Vorteil, dass große Komplexe vermessen werden können, da das Fehlen von nichttauschbaren Protonen im Protein die Transversalrelaxation der Ligandenprotonen signifikant verringert.



**Abbildung 5.** Zweidimensionale Ebene des dreidimensionalen  $^{13}\text{C}$ -Isopten-gefilterten NMR-Spektrums von unmarkiertem 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin im Komplex mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Hauptharnprotein der Maus. Der Schnitt wurde bei der  $^1\text{H}$ -Resonanzfrequenz der Methylprotonen der beiden Isobutylgruppen genommen (die magnetisch äquivalent sind). Kreuzsignale entstehen durch  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOEs zwischen diesen Methylprotonen und den angezeigten Seitenketten der Aminosäurereste innerhalb der Bindungsstelle des Proteins.

#### 4.3. RDC-Methoden

Ungeachtet der technischen Fortschritte, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben wurden, ist es oft unmöglich, ausreichende NOE-Restraints zwischen einem Protein und einem Liganden zu erhalten, um die Komplexstruktur mit einer der besten Kristallstruktur vergleichbaren Auflösung zu bestimmen. Durch Anwendung von RDC-Messungen kann dieses Problem jedoch überwunden werden. Wie in Abschnitt 2 erwähnt, liefern RDC-Restraints Informationen über weitreichende Orientierungen. Es ist daher möglich, die Konformation eines Liganden im gebundenen Zustand ohne Verwendung von Ligand-Protein- und Ligand-Ligand-NOEs zu bestimmen.<sup>[72-74]</sup> In einem typischen Experiment werden Rückgratamid- $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -RDCs im Protein in einem verdünnten flüssigkristallinen Medium gemessen. Die Größe und Richtung des Orientierungstensors werden dann aus diesen RDCs bestimmt, wobei zusätzlich Kristall- oder NMR-Strukturkoordinaten des Proteins herangezogen werden.<sup>[13, 75]</sup> Anschließend werden die RDCs im freien Liganden unter den gleichen Bedingungen gemessen, um die „inhärenten“ RDCs vor der Bindung zu erhalten. Die Liganden-RDCs sind in aller Regel viel kleiner als die Protein-RDCs, da kleine Moleküle einen weitaus niedrigeren Orientierungsgrad aufweisen. In den meisten Fällen wird man die Liganden-RDCs für eine einzelne  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Bindung messen, und bis dato wurden zumeist  $^{13}\text{C}$ -angereicherte Liganden in Kombination mit Isotopenediting eingesetzt, um die Messungen zu vereinfachen. Schließlich wird der Ligand mit dem Protein unter den gleichen Bedingungen vereinigt, und die Ligand-RDCs werden erneut gemessen. Bei schwacher Bindung, d. h. wenn das Protein nicht mit Ligand gesättigt wird, wird der Ligand durch Titration zugegeben, und die RDCs werden bei unterschiedlichen Ligand-Protein-Verhältnissen gemessen. Die effektiven RDC-Werte des Liganden im Komplex werden nach Subtraktion der inhärenten RDCs im freien Liganden

durch Extrapolation auf 100 % gebundenem Ligand erhalten. Da der gebundene Ligand den Orientierungstensor des Proteins im Komplex übernimmt, kann die Orientierung des Liganden in Bezug auf das Protein aus diesen effektiven RDCs bestimmt werden.

Der Ansatz wird dadurch eingeschränkt, dass die Synthese von  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Verbindungen zeitaufwändig und kostspielig sein kann und eine Anwendung in der Leitstruktursuche und -optimierung damit gänzlich ausgeschlossen ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass bei langsamem Austausch (d. h. starker Bindung,  $K_d > 10^{-5} \text{ M}$ ) die Resonanzlinien aufgrund einer effizienten dipolaren  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Relaxation inakzeptabel breit werden. Mithilfe von Kryosonden für Hochfeldspektrometer könnte es aber möglich sein, HSQC-Spektren von schwach orientierten Komplexen mit natürlicher  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit aufzunehmen, sodass RDCs in unmarkierten Liganden im Komplex mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^2\text{H}$ -angereicherten Proteinen gemessen werden können.<sup>[76]</sup>

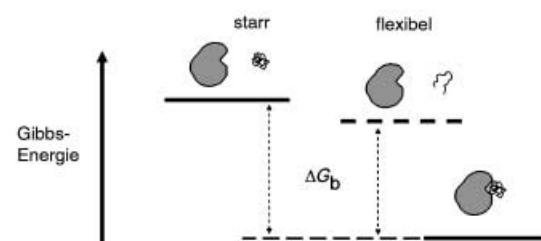
#### 4.4. Resümee

Angesichts des Zeitaufwandes einer röntgenkristallographischen Strukturbestimmung von Ligand-Protein-Komplexen bietet sich die NMR-Spektroskopie als eine hochgradig attraktive Alternative an. Es ist jedoch notwendig, dass die gegenwärtigen Größenbeschränkungen durch die Entwicklung ausgeklügelter Markierungsstrategien überwunden werden, wobei sicher umfangreiche Deuterierungen des Proteins erforderlich sind. Ein besonders vielversprechender Ansatz ist die Analyse von homonucleären  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -RDCs<sup>[77-79]</sup> vor einem perdeuterierten Proteinhintergrund, da  $^{12}\text{C}$ -gebundene Protonen unter diesen Bedingungen auch bei großen Komplexen brauchbare Linienbreiten erzeugen.

### 5. Molekulare Dynamik und Liganden-Design

#### 5.1. Rolle der Dynamik

Eine Kristall- oder NMR-Struktur eines Proteins kann zwar ohne Frage als Denkanstoß in der Leitstruktursuche dienen, allerdings liegt der Schlüssel zum Verständnis der Affinität eines Liganden für seinen Rezeptor in der Dynamik und Thermodynamik der Assoziation, und nicht in einem einfachen statischen Bild. Dies soll anhand einfacher thermodynamischer Betrachtungen erläutert werden (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Thermodynamische Ursachen der unterschiedlichen Affinitäten von starren und flexiblen Liganden.

dung 6): Die Gibbs-Bindungsenergie ( $\Delta G_b$ ) einer Ligand-Protein-Assoziation ist gleich der Differenz der Gibbs-Energien der freien Spezies und des Komplexes. Wegen der Beziehung  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  wird ein flexibler Ligand (höhere Entropie) eine niedrigere Gibbs-Energie haben als ein starrer Ligand. Daher wird die Gibbs-Bindungsenergie eines flexiblen Liganden niedriger sein als die eines starren Liganden. Da die Gibbs-Standardbindungsenergie mit der Affinität durch die Beziehung  $\Delta G_b^\circ = -RT\ln K_a = RT\ln K_d$  verknüpft ist, folgt, dass ein starrer Ligand fester bindet als ein flexibler Ligand, wenn alle übrigen Faktoren gleich sind. Die gleichen Argumente gelten für flexible Seitenketten in den Proteinbindungsstellen.

Aus dem Gesagten folgt, dass wir sowohl über die Dynamik einer Wechselwirkung (die die Entropie bestimmt) als auch über strukturelle Aspekte (die die Enthalpie bestimmen) Informationen erhalten müssen. In einem realen System ist außerdem noch das Lösungsmittel zu berücksichtigen. Mit dem Aufkommen neuer Techniken wie der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) ist es unter idealen Umständen möglich, verlässliche experimentelle Daten für die globalen thermodynamischen Parameter zu erhalten, die eine biomolekulare Assoziation bestimmen. In Tabelle 1 werden mit ITC ermittelte thermodynamische

mit denen Gibbs-Standardbindungsenergien und Bindungsentropien für individuelle Aminosäuren aus NMR-Relaxationsdaten abgeleitet werden können.

### 5.2. Rückgrat-Dynamik

Durch Isotopenanreicherung von Proteinen können heteronukleare  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^2\text{H}$ -Relaxationszeiten gemessen werden (siehe Lit. [84]). Heteroerkerne werden generell Protonen vorgezogen, da diese unter bestimmten Umständen sehr komplexe Relaxationseigenschaften aufweisen. Speziell die vollständige  $^{15}\text{N}$ -Markierung ermöglicht eine einfache Messung von Amid- $^{15}\text{N}$ -Relaxationszeiten, die sich zur Untersuchung der Dynamik von N-H<sup>1</sup>-Bindungsvektoren im Proteinrückgrat heranziehen lassen. Relaxationszeiten können in longitudinale ( $T_1$ ) und transversale Relaxationszeiten ( $T_2$ ) zerlegt werden. Die Reziprokwerte,  $T_1^{-1}$  und  $T_2^{-1}$ , sind ein Maß für die Geschwindigkeit des Magnetisierungszerfalls in Richtung des angelegten Magnetfeldes bzw. in Querrichtung dazu. Ähnlich wie Kernspins durch ein Radiofrequenzfeld bei der Resonanzfrequenz von einem Energieniveau zum nächsten angeregt werden, erfordert die Relaxation von einem höheren Energieniveau zum Grundzustand ein Magnetfeld mit passender Frequenz. Die Felder stammen von den lokalen dynamischen Fluktuationen innerhalb des Moleküls, ausgelöst durch ungerichtete Rotations- und interne Bewegungen. Damit lassen sich durch die Messung von Relaxationszeiten Informationen über die dynamischen Prozesse erhalten, die zur Relaxation führen.

Relaxationszeiten werden üblicherweise mithilfe der modellfreien Lipari-Szabo-Analyse interpretiert,<sup>[85]</sup> so benannt, weil die Relaxationseigenschaften weitgehend unabhängig vom jeweiligen Bewegungsmodell einer bestimmten Dynamik zugeordnet werden können. Der Lipari-Szabo-Formalismus liefert unter anderem das Quadrat des allgemeinen Ordnungsparameters ( $S^2$ ).<sup>[85]</sup> Dieser Parameter beinhaltet den Einheitswert für einen unbeweglichen Bindungsvektor und ist gleich null für eine vollständig isotrope Bewegung. Unter der Annahme wohldefinierter Näherungen zeigten Yang und Kay, dass eine analytische Beziehung zwischen dem  $S^2$ -Wert eines Bindungsvektors und dessen Konformationsentropie existiert.<sup>[81]</sup> So werden z. B. durch Messung von Rückgrat- $^{15}\text{N}$ -Relaxationsparametern eines Proteins mit und ohne Liganden unterschiedliche  $S^2$ -Werte als Folge unterschiedlicher Konformationsentropien erhalten. Daraus können Bindungsentropien einzelner Aminosäurereste ermittelt werden. Auf diese Weise lassen sich Details über die Thermodynamik der Ligandbindung gewinnen, die mit anderen Technik nicht zugänglich sind.

Die Methode wurde in einer Reihe von Studien genutzt, z. B. bei der Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen,<sup>[86]</sup> des Konformationsaustauschs in Calmodulin<sup>[87]</sup> und von Proteinfaltungen.<sup>[81, 88]</sup> Ein aus Sicht des Wirkstoff-Designs interessantes Beispiel für eine Anwendung dieser Methode betrifft die von Stone et al. beschriebene Ligandbindung an das Hauptharnprotein.<sup>[89]</sup> Es wurde eine Zunahme der Konformationsentropie des Proteinrückgrats bei der Bindung von Liganden beobachtet und gefolgt, dass

**Tabelle 1:** Thermodynamische Parameter für die Bindung von Liganden an das Hauptharnprotein der Maus, bestimmt durch isotherme Titrationskalorimetrie.

Ligand	$\Delta H^\circ$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^\circ$ [cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G^\circ$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$K_d$ [μM]
3-Methylpyrazin	-9.99	-16.4	-5.1	185
2-Methoxypyrazin	-10.03	-14.5	-5.7	67
2-Methoxy-3-methylpyrazin	-8.44	-7.2	-6.3	25
3-Isopropyl-2-methoxypyrazin	-9.14	-2.0	-8.53	0.56
3-Isobutyl-2-methoxypyrazin	-11.85	-7.4	-9.65	0.08

Parameter für die Bindung einer Reihe von Pyrazinliganden an das Hauptharnprotein der Maus angegeben. Einige Trends sind zu erkennen: 1) Die Rangfolge der Ligandbindung hängt davon ab, ob wir nur die Enthalpie (d. h. ohne Entropie) oder die Gibbs-Energie (d. h. einschließlich Entropie) betrachten, was erneut die Bedeutung sowohl der Struktur als auch der Dynamik verdeutlicht. 2) Die zu mikro- und nanomolaren Dissoziationskonstanten gehörenden Gibbs-Energien unterscheiden sich um ca. 4 kcal mol<sup>-1</sup>. Der Unterschied zwischen einem „mittelmäßigen“ und einem „guten“ Liganden entspricht damit ungefähr der Energie einer Wasserstoffbrücke. 3) Aus diesen globalen thermodynamischen Parametern geht nicht unmittelbar hervor, warum ein bestimmter Ligand besser bindet als ein anderer. Für die Ligandenoptimierung wäre es von unschätzbarem Wert, solche thermodynamischen Parameter nicht nur für ein globales System, sondern für jeden einzelnen Aminosäurerest zu erhalten. In einigen Publikationen wurden NMR-Methoden beschrieben,<sup>[80-83]</sup>

diese Größe wahrscheinlich mit anderen Gibbs-Bindungsenergiebeiträgen vergleichbar ist und es sich um ein generelles Merkmal bei der Bindung von kleinen Liganden an Makromoleküle handelt. Einfache statische Beschreibungen von Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen geben solche Informationen, die von überragender Bedeutung für die Affinität sein könnten, nicht her.

### 5.3. Seitenketten-Dynamik

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Techniken können ebenso bei Dynamikstudien von Proteinseitenketten angewendet werden. Als zu untersuchende Kerne kommen bevorzugt  $^{13}\text{C}$  und  $^2\text{H}$  in Frage. Im Prinzip bieten  $^{13}\text{C}$ -Messungen eine höhere Empfindlichkeit,<sup>[90]</sup> wie aber bei Muhandiram et al. ausführlich diskutiert ist,<sup>[91]</sup> sind  $^2\text{H}$ -Methoden unter dem Aspekt einer einfacheren Interpretation oft vorzuziehen. Allerdings unterliegen  $^2\text{H}$ -Methoden Einschränkungen hinsichtlich der Molekülmasse.<sup>[92]</sup> Die meisten Seitenkettenstudien konzentrierten sich bislang auf die Dynamik von Methylgruppen. Aus technischen Gründen arbeitet man in  $^{13}\text{C}$ - und  $^2\text{H}$ -Relaxationsstudien bevorzugt mit  $^{13}\text{CHD}_2$ - bzw.  $^{13}\text{CH}_2\text{D}$ -Isotopologen der Methylgruppe, was anspruchsvolle Anreicherungsstrategien erfordert. Eine partielle Isotopenanreicherung mit  $^2\text{H}$  scheint die effektivste Strategie zu sein, um die für  $^2\text{H}$ -Relaxationsstudien relevanten Isotopologen zu erhalten. Die Methode beruht auf einer Überexpression in *E. coli* durch Verwendung von vollständig  $^{13}\text{C}$ - und 50 %  $^2\text{H}$ -angereicherter Glucose als der einzigen Kohlenstoffquelle.<sup>[91]</sup> Torchia et al. beschrieben die Proteinüberexpression in *E. coli* bei Verwendung von  $^{13}\text{C}^2\text{H}$ -angereicherten Pyruvaten als einzige Kohlenstoffquelle.<sup>[92,93]</sup> Diese Methode liefert Proteinproben mit hohen Gehalten an  $\text{CH}_2\text{D}$ - und  $\text{CHD}_2$ -Methylisotopologen von Ala, Val, Leu und Ile, die sowohl für  $^2\text{H}$ - als auch für  $^{13}\text{C}$ -Relaxationsmessungen geeignet sind. Mit diesem Ansatz konnten vergleichende  $^2\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Messungen der Ordnungsparameter der Methylrotationsachsen an derselben Probe ausgeführt werden.<sup>[92]</sup>

Die genannten Methoden wurden in einer Reihe von Studien zur Seitenkettendynamik angewendet. Untersucht wurden die Entropie des Rotameraustauschs in Proteinen,<sup>[94]</sup> die Korrelation von Dynamik und lokaler Struktur<sup>[95]</sup> und die Änderung der Seitenkettenentropie bei der Bildung eines Calmodulin-Peptid-Komplexes.<sup>[96]</sup> Letztgenannte Arbeit, die von Cavanagh und Akke im Detail diskutiert wurde,<sup>[97]</sup> ist möglicherweise von großer Relevanz für das strukturbasierte Wirkstoff-Design. Insbesondere wurde ein getrenntes Ansprechverhalten von Rückgrat- und Seitenketten bei der Ligandbindung beobachtet: Die Bewegungscharakteristik des Rückgrats ändert sich nur geringfügig, wohingegen sowohl Zu- als auch Abnahme der Entropie der Seitenketten beobachtet wird. Speziell Seitenketten, die sich in einiger Entfernung von der Bindungsstelle befinden, erhöhen ihre Entropie bei der Bindung und gleichen damit den entropischen Aufwand aus, den Seitenketten in der Bindungsstelle bei der Ligandbindung beisteuern.

### 5.4. Resümee

Quantitative Untersuchungen der Rückgrat- und Seitenkettenentropie von Proteinen durch NMR-Relaxationsmessungen befinden sich noch in einem frühen Stadium, bisherige Resultate sind aber äußerst vielversprechend. Es scheint möglich, vernünftige Werte für die Differenz von Rückgrat- und Seitenkettenentropien bei der Ligandbindung zu erhalten, die mit anderweitig gemessenen globalen thermodynamischen Daten in Einklang sind. In dieser Hinsicht können NMR-Techniken möglicherweise das fehlende Teil des thermodynamischen Puzzles liefern, das die Bindung von Liganden charakterisiert. Die Zahl solcher Studien reicht bislang nicht aus, um sich zu einem klaren Bild zu fügen, aber in Anbetracht der Bedeutung der Entropie – oder genauer der Enthalpie-Entropie-Kompensation in biologischen Erkennungsphänomenen<sup>[98–100]</sup> – werden weitere Untersuchungen sicher folgen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Vor zwei Jahrzehnten hat man die NMR-Spektroskopie noch als eine Technik für „kleine Moleküle“ angesehen. Seit damals hat sich eine rasante Entwicklung ergeben: Die Strukturaufklärung von Proteinen mit 30–40 kDa wird gegenwärtig zur Routine, und mit dem Aufkommen stärkerer Magnetfelder, der Kryosonden-Technik und den Fortschritten bei Isotopenmarkierungsstrategien ist es sehr wahrscheinlich, dass die Molekülmasse bald nicht mehr der limitierende Faktor sein wird. Als eine Methode, die sich gleichermaßen zur Strukturbestimmung, zum Liganden-Screening und für Dynamikstudien eignet, überrascht es vielleicht, dass die NMR-Spektroskopie im Bereich der Wirkstoffsuche nicht bereits eine viel weitere Verbreitung gefunden hat. Viele der hier vorgestellten Methoden sind indes noch sehr neu, sodass es naturgemäß einige Zeit dauern wird, bis sie von der pharmazeutischen Industrie validiert und akzeptiert sind. Von den beschriebenen Anwendungen ist die Bestimmung der Entropiebeiträge individueller Aminosäuren, die an einer biomolekularen Wechselwirkung beteiligt sind, vielleicht die faszinierendste. Anders als die Proteinkristallographie, die sehr gut parallel zur NMR-Spektroskopie für Strukturbestimmungen und (in zunehmendem Maße) für ein Liganden-Screening eingesetzt werden kann, sind allein NMR-Methoden in der Lage, hochauflöste Informationen zur *Dynamik* einer Wechselwirkung zu liefern. Ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Affinität ist der Beitrag des Lösungsmittels; hier versprechen Fortschritte bei magnetischen Kernrelaxationsdispersionsmessungen näheren Aufschluss.<sup>[101]</sup>

*Ich bedanke mich für die finanzielle Unterstützung durch den Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) und den Wellcome Trust.*

Eingegangen am 7. Februar 2003 [A581]  
Übersetzt von Dr. Andrea Drögemüller, Mannheim

- [1] J. H. Prestegard, H. Valafar, J. Glushka, F. Tian, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8677.
- [2] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 93.
- [3] G. M. Clore, A. Gronenborn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 564.
- [4] A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*, 351.
- [5] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Protein Chem.* **1994**, *13*, 441.
- [6] A. Bax, S. Grzesiek, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 131.
- [7] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Science* **1991**, *252*, 1390.
- [8] M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 211.
- [9] T. K. Mal, S. J. Matthews, H. Kovacs, I. D. Campbell, J. Boyd, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 259.
- [10] K. H. Gardner, M. K. Rosen, L. E. Kay, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1389.
- [11] G. M. Clore, M. R. Starich, C. A. Bewley, M. L. Cai, J. Kuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6513.
- [12] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 216.
- [13] J. A. Losonczi, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334.
- [14] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111.
- [15] J. A. Losonczi, J. H. Prestegard, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 447.
- [16] M. Ottiger, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 361.
- [17] R. S. Prosser, J. A. Losonczi, I. V. Shlyanovskaya, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11010.
- [18] H. Wang, M. Eberstadt, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 443.
- [19] M. Ottiger, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 187.
- [20] K. Fleming, D. Gray, S. Prasannan, S. Matthews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5224.
- [21] M. Rückert, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7793.
- [22] G. M. Clore, M. R. Starich, A. M. Gronenborn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10571.
- [23] B. E. Ramirez, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9106.
- [24] H. M. Al-Hashimi, H. Valafar, M. Terrell, E. R. Zartler, M. K. Eidsness, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 402.
- [25] G. A. Mueller, W. Y. Choy, D. W. Yang, J. D. Forman-Kay, R. A. Venters, L. E. Kay, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 197.
- [26] G. A. Mueller, W. Y. Choy, N. R. Skrynnikov, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 183.
- [27] C. A. Fowler, F. Tian, H. M. Al-Hashimi, J. H. Prestegard, *J. Mol. Biol.* **2000**, *304*, 447.
- [28] J.-C. Hus, D. Marion, M. Blackledge, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 927.
- [29] J.-C. Hus, D. Marion, M. Blackledge, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1541.
- [30] P. M. Bowers, C. E. M. Strauss, D. Baker, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 311.
- [31] F. Delaglio, G. Kontaxis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2142.
- [32] M. Andrec, P. Du, R. M. Levy, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 335.
- [33] C. A. Rohl, D. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2723.
- [34] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9490.
- [35] F. Tian, H. Valafar, J. H. Prestegard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11791.
- [36] A. W. Giesen, S. W. Homans, J. M. Brown, *J. Biomol. NMR* **2003**, *25*, 63.
- [37] S. Grzesiek, J. Anglister, H. Ren, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4369.
- [38] P. E. Coughlin, F. E. Anderson, E. J. Oliver, J. M. Brown, S. W. Homans, S. Pollak, J. W. Lustbader, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11871.
- [39] A. W. Giesen, L. C. Bae, C. L. Barrett, J. A. Chyba, M. M. Chaykovsky, M. C. Cheng, J. H. Murray, E. J. Oliver, S. M. Sullivan, J. M. Brown, F. W. Dahlquist, S. W. Homans, *J. Biomol. NMR* **2001**, *19*, 255.
- [40] M. K. Rosen, K. H. Gardner, R. C. Willis, W. E. Parris, T. Pawson, L. E. Kay, *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 627.
- [41] K. H. Gardner, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7599.
- [42] N. K. Goto, K. H. Gardner, G. A. Mueller, R. C. Willis, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 369.
- [43] N. K. Goto, L. E. Kay, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 585.
- [44] Z. R. Wu, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9672.
- [45] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864.
- [46] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531.
- [47] P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Q. Rev. Biophys.* **1999**, *32*, 211.
- [48] P. J. Hajduk, T. Gerfin, J. M. Boehlen, M. Haberli, D. Marek, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2315.
- [49] F. Abbate, L. Franzoni, F. Lohr, C. Lucke, E. Ferrari, R. T. Sorbi, H. Ruterjans, A. Spini, *J. Biomol. NMR* **1999**, *15*, 187.
- [50] Z. Böcskei, C. R. Groom, D. R. Flower, C. E. Wright, S. E. V. Phillips, A. Cavaggioni, J. B. C. Findlay, A. C. T. North, *Nature* **1992**, *360*, 186.
- [51] D. E. Timm, L. J. Baker, H. Mueller, L. Zidek, M. V. Novotny, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 997.
- [52] A. Medek, P. J. Hajduk, J. Mack, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1241.
- [53] L. Zidek, M. J. Stone, S. M. Lato, M. D. Pagel, Z. S. Miao, A. D. Ellington, M. V. Novotny, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9850.
- [54] C. Dalvit, P. Floersheim, M. G. M. Zurini, A. Widmer, *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 23.
- [55] J. Fejzo, C. A. Lepre, J. W. Peng, G. W. Bemis, Ajay, M. A. Murcko, J. M. Moore, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 755.
- [56] P. J. Hajduk, D. J. Augeri, J. Mack, R. Mendoza, J. G. Yang, S. F. Betz, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7898.
- [57] P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257.
- [58] B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 705.
- [59] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784.
- [60] H. Takahashi, T. Nakanishi, K. Kami, Y. Arata, I. Shimada, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 220.
- [61] W. Jahnke, P. Floersheim, C. Ostermeier, X. C. Zhang, R. Hemmig, K. Hurth, D. P. Uzunov, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3570; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3420.
- [62] A. H. Siriwardena, F. Tian, S. Noble, J. H. Prestegard, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3604; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3454.
- [63] J. Flaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, K. Wüthrich, *Nature* **2002**, *418*, 207.
- [64] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366.
- [65] G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 500.
- [66] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 586.
- [67] C. Zwahlen, P. Legault, S. J. F. Vincent, J. Greenblatt, R. Konrat, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6711.
- [68] A. M. Petros, R. T. Gampe, G. Gemmecker, P. Neri, T. F. Holzman, R. Edalji, J. Hochlowski, M. Jackson, J. McAlpine, J. R. Luly, T. Pilotmatias, S. Pratt, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2925.
- [69] A. M. Petros, G. Gemmecker, P. Neri, E. T. Olejniczak, D. Nettesheim, R. X. Xu, E. G. Gubbins, H. Smith, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2467.
- [70] D. G. Low, M. A. Probert, G. Embleton, K. Seshadri, R. A. Field, S. W. Homans, J. Windust, P. J. Davis, *Glycobiology* **1997**, *7*, 373.

- [71] M. Pellecchia, D. Meininger, Q. Dong, E. Chang, R. Jack, D. S. Sem, *J. Biomol. NMR* **2002**, 22, 165.
- [72] H. Shimizu, A. Donohue-Rolfe, S. W. Homans, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5815.
- [73] P. J. Bolon, H. M. Al-Hashimi, J. H. Prestegard, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 107.
- [74] H. M. Al-Hashimi, P. J. Bolon, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 153.
- [75] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3791.
- [76] E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, H. Wang, M. L. Cai, D. G. Nettlesheim, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9249.
- [77] F. Tian, P. J. Bolon, J. H. Prestegard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7712.
- [78] P. J. Bolon, J. H. Prestegard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9366.
- [79] W. Peti, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3975.
- [80] Z. G. Li, S. Raychaudhuri, A. J. Wand, *Protein Sci.* **1996**, 5, 2647.
- [81] D. W. Yang, L. E. Kay, *J. Mol. Biol.* **1996**, 263, 369.
- [82] D. Yang, Y.-K. Mok, J. D. Forman-Kay, N. Farrow, L. E. Kay, *J. Mol. Biol.* **1997**, 272, 790.
- [83] M. Akke, R. Brüschweiler, A. G. Palmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9832.
- [84] A. G. Palmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, 30, 129.
- [85] G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4546.
- [86] C. Bracken, P. A. Carr, J. Cavanagh, A. G. Palmer, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2133.
- [87] J. Evenas, S. Forsen, A. Malmendal, M. Akke, *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 603.
- [88] J. O. Wrabl, D. Shortle, T. B. Woolf, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, 38, 123.
- [89] L. Zidek, M. V. Novotny, M. J. Stone, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 1118.
- [90] A. L. Lee, P. F. Flynn, A. J. Wand, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2891.
- [91] D. R. Muhandiram, T. Yamazaki, B. D. Sykes, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11536.
- [92] R. Ishima, A. P. Petkova, J. M. Louis, D. A. Torchia, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6164.
- [93] R. Ishima, J. M. Louis, D. A. Torchia, *J. Biomol. NMR* **2001**, 21, 167.
- [94] D. M. LeMaster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1726.
- [95] A. Mittermaier, L. E. Kay, J. D. Forman-Kay, *J. Biomol. NMR* **1999**, 13, 181.
- [96] A. L. Lee, S. A. Kinnear, A. J. Wand, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 72.
- [97] J. Cavanagh, M. Akke, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 11.
- [98] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 709.
- [99] D. H. Williams, D. P. O'Brien, B. Bardsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 737.
- [100] C. T. Calderone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6262.
- [101] V. P. Denisov, K. Venu, J. Peters, H. D. Horlein, B. Halle, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 9380.