

Zerlegung des hydrophoben Effekts auf molekularer Ebene: Die Rolle von Wasser, Enthalpie und Entropie bei der Ligandenbindung an Thermolysin**

Adam Biela, Nader N. Nasief, Michael Betz, Andreas Heine, David Hangauer* und Gerhard Klebe*

Professor Jack D. Dunitz zum 90. Geburtstag gewidmet

Der hydrophobe Effekt ist weitläufig bekannt als die treibende Kraft bei der spontanen Assoziation von Molekülen mit ausgedehnten lipophilen Oberflächen in wässriger Lösung. Dieser Effekt geht einher mit der Verdrängung von Wassermolekülen aus dem sich bildenden hydrophoben Grenzflächenkontakt^[1,2] und liefert gewöhnlich die Erklärung für zahlreiche in der Natur beobachtete Phänomene, an denen hydrophobe Spezies beteiligt sind. So erklärt er, warum sich ein Öl/Wasser-Gemisch spontan in seine einzelnen Phasen auf trennt, warum lösliche Proteine bei der Faltung einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Außenseite bilden,^[3,4] warum Membranbestandteile in Form von Doppelmembranen und Micellen assoziieren, warum Membranproteine nur in Membransegmenten vorliegen und warum das wechselseitige Vergraben von hydrophoben Molekülteilen bei der Protein-Ligand-Wechselwirkung eine derart zentrale Rolle spielt.^[5] Vor allem das zuletzt genannte Beispiel liefert die Basis für eine in der medizinischen Chemie weitverbreitete Strategie zur Verbesserung der Protein-Ligand-Wechselwirkung, indem eine Optimierung der hydrophoben Ligandoberfläche vorgenommen wird, um ein günstigeres Vergraben der hydrophoben Struktur im Zielprotein ermöglichen zu können. In allen diesen Fällen wird der hydrophobe Effekt als die treibende Kraft für die Assoziation angesehen. Auf der molekularen Ebene wird dieses Phänomen auf die


Verdrängung von Wassermolekülen zurückgeführt, die sich im ungebundenen Zustand im Bereich der hydrophoben Flächen ansammeln. Thermodynamisch betrachtet, werden entropische Effekte mit der Verdrängung von Wassermolekülen in Zusammenhang gebracht. Das entropische Profil einer Bindung ist gekennzeichnet durch Änderungen von Ordnungsparametern und dynamischen Eigenschaften der Wassermoleküle, die sich, abhängig vom Aufenthaltsort der Wassermoleküle, deutlich unterscheiden. Es wird angenommen, dass während der hydrophoben Bindung in die umgebende flüssige Phase freigesetzte Wassermoleküle deutlich mehr Freiheitsgrade besitzen als Wassermoleküle, die sich vor der Bindung in hydrophoben Taschen befinden und dort aufgrund der fehlenden Interaktionspartner eher „gefangen“ als gebunden zu sein scheinen. Neue Studien auf diesem Gebiet haben jedoch gezeigt, dass die treibenden Kräfte für die hydrophobe Wechselwirkung sowohl enthalpischer wie auch entropischer Natur sein können. Einfache, seit Jahren weit verbreitete Annahmen (z.B. Korrelationen mit vergraben Oberflächenbeiträgen) im Hinblick auf den hydrophoben Effekt reichen nicht mehr aus, um die unterschiedlichen Beobachtungen zufriedenstellend beschreiben zu können.^[6–12] Auch im Computer-basierten Wirkstoffdesign wird die Bedeutung einzelner Wassermoleküle für die Bindung immer stärker in den Fokus gerückt. Werkzeuge wie WaterMap oder Szipmap^[13,14] versuchen, Wasserstrukturen für das Wirkstoffdesign nutzbar zu machen. Eine Abschätzung der Eigenschaften einzelner Wassermoleküle hinsichtlich Enthalpie und Entropie wird mit diesen Programmen vorgenommen.

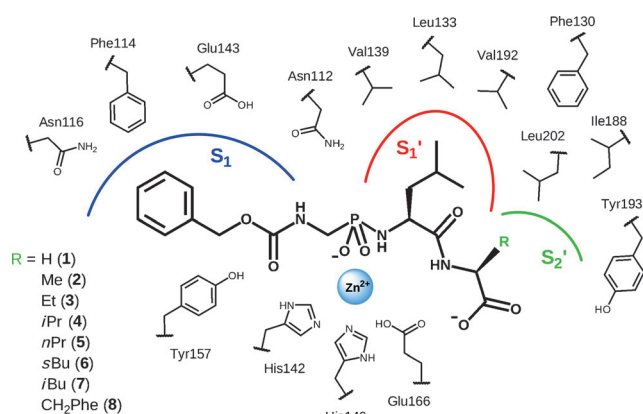
Um ein tieferes Verständnis für die vielen Facetten des hydrophoben Effekts auf molekularer Ebene zu gewinnen und im Besonderen seine Auswirkung auf die Protein-Ligand-Bindung zu erkunden, haben wir eine systematische Studie mit Thermolysin (TLN) als Modellprotein konzipiert.^[6] Diese thermostabile bakterielle Zinkmetalloprotease aus dem Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* ist mit drei vorwiegend hydrophoben Spezifitätstaschen ausgestattet (Schema 1). Trotz der überraschenden Sequenzunterschiede innerhalb der Proteine dieser Klasse gilt TLN aufgrund seiner dann doch hoch-konservierten „active-site“-Struktur als Prototyp für die gesamte Klasse dieser Enzyme.^[15] Potente TLN-Inhibitoren sind oftmals als Übergangszustandsanaloga entworfen worden.^[16–18] Es diente zudem als Referenz für die Entwicklung von Arzneistoffen gegen andere Metalloprote-

[*] Dr. A. Biela, M. Betz, Dr. A. Heine, Prof. Dr. G. Klebe
Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: klebe@mail.uni-marburg.de

N. N. Nasief, Prof. Dr. D. Hangauer
Department of Chemistry, University at Buffalo
The State University of New York
Buffalo, NY 14260 (USA)
E-Mail: hangauer@buffalo.edu

[**] G.K. dankt der EU für einen ERC Advanced Grant (DrugProfilBind 268145). Weiterhin danken wir der Arbeitsgruppe am Helmholtz-Zentrum Berlin, BESSY II für die Strahlzeit und die gewährte Unterstützung bei der Datensammlung. Wir danken dem HZB für finanzielle Unterstützung bei den Reisekosten.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentellen Details zu Kristallisation und zum Tränken der Kristalle mit den Liganden, Datensammlung und Prozessierung, Kristallstrukturbestimmung und Verfeinerung, kinetischem Assay, ITC und zur Synthese der Liganden 1–8) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208561> zu finden.



Schema 1. Schematische Ansicht der Bindungstasche des TLN und das Substitutionsmuster der untersuchten Liganden 1–8.

asen^[19–23] und hat sich als Modellprotein zum Validieren neuartiger Ideen^[24,25] und neuer methodischer Konzepte^[26] bewährt. TLN ist eines der ersten kristallographisch aufgeklärten Metalloproteasen^[27,28] und besitzt in seinem Zentrum ein katalytisch aktives Zink-Ion, das durch His142, His146 und Glu166 koordiniert wird. Die benachbarte S_1 -Tasche zeigt keine Spezifität und bindet bevorzugt hydrophobe Liganden. Im Gegensatz zur S_1 -Tasche, ist die gegenüberliegende S_1' -Tasche eine tiefe wohldefinierte Kavität, die ebenfalls vornehmlich hydrophobe Reste aufnimmt (z. B. die Seitenketten von Valin, Leucin oder Phenylalanin) und mit ihren Eigenschaften die Substratspezifität vorgibt.^[29] Die in unmittelbarer Nachbarschaft zur S_1' -Tasche liegende S_2' -Tasche ist in ihrer Eigenschaft hydrophob, eher flach und erinnert in ihrer Form an eine Schale. Die Tasche liegt in ihrer flachen Ausgestaltung an der Oberfläche des Proteins und ist damit leicht erreichbar für Wassermoleküle aus der umgebenden Flüssigphase. Trotz der offenkundigen Unterschiede zwischen der S_1' - und der S_2' -Tasche in Form, Lokalisation und Umgebung, ist es beiden Taschen möglich, ähnliche Molekülgruppen zu binden, jedoch mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Bindungsaffinität. Innerhalb einer Ligandenserie verstärken hydrophobe Modifikationen am P_1' -Rest (Gly \rightarrow Leu) des Liganden die inhibitorische Potenz für die S_1' -Tasche um das 800-fache, während die gleichen Modifikationen für S_2' lediglich eine 50-fache Verbesserung der Affinität mit sich bringen.^[6] Zudem kommt hinzu, dass eine stärker werdende hydrophobe Interaktion zur S_1' -Tasche eine höhere Enthalpie nach sich zieht. Dies ist unerwartet und aufgrund fehlender Entropie-Effekte nicht mit der derzeit akzeptierten Vorstellung über den hydrophoben Effekt vereinbar.^[6] Das günstige enthalpische Signal, das bei der Bindung von Liganden mit zunehmend hydrophoberer Oberfläche innerhalb einer homogenen Serie beobachtet wurde, wird auf eine „minderwertige Solvation“ der adressierten Tasche zurückgeführt. Der Begriff „minderwertige Solvation“ bezieht sich dabei nicht auf eine wasserfreie Tasche im ungebundenen Zustand, sondern reflektiert höchstwahrscheinlich das Vorhandensein von zahlreichen hochgradig mobilen Wassermolekülen, die über mehrere Positionen verstreut und damit kaum fassbar bei kristallographischen Auswertungen sind. Die Wasser-

situation ist dagegen völlig anders in der S_2' -Tasche. Basierend auf hoch aufgelösten Kristallstrukturen ist angrenzend an diese Tasche ein klar definiertes, komplexes Netzwerk von Wassermolekülen entdeckt worden, das einen dominierenden Einfluss auf die Bindungsparameter der vergrabenen Liganden ausübt.^[30,31]

Homans et al.^[7,8] haben von einer ähnlichen Enthalpie-getriebenen hydrophoben Wechselwirkung berichtet, deren Ursache sie ebenfalls auf eine suboptimale Solvation der Proteinbindetasche zurückführen. Für die Desolvation einer suboptimal solvatisierten Proteinbindetasche wird nicht so viel Enthalpie benötigt, sodass sich im Großen und Ganzen die thermodynamische Signatur der Bindung hin zu einer überwiegend Enthalpie-getriebenen freien Gibbs-Enthalpie verlagert. Auch Snyder et al.^[9] haben von einem enthalpisch getriebenen thermodynamischen Profil für eine hydrophobe Interaktion berichtet. Hier wurde die Bindung von heterocyclischen aromatischen Sulfonamiden, die systematisch mit größer werdenden hydrophoben Molekülresten ausgestattet wurden, an die Carboanhydrase untersucht. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Liganden wurden durch Änderungen in der Anzahl und Organisation von geordneten Wassermolekülen in der Bindetasche erklärt. Eine Untersuchung über die Verdrängung von geordneten Wassermolekülen aus der $S_{3/4}$ -Tasche von Thrombin durch zunehmend hydrophobere P_3 -Substituenten einer peptidomimetischen Ligandenserie führte dagegen zu dem erwarteten entropischen Signal.^[10] Auch im Bereich der Wirt-Gast-Komplexchemie finden sich zahlreiche Beispiele für Bindungsprozesse, die entweder eine Verbesserung der Enthalpie oder der Entropie aufzeigen.^[11,12] Diese Studien deuten darauf hin, dass die thermodynamische Signatur einer hydrophoben Wechselwirkung besonders von Änderungen in der Wasserstruktur bestimmt wird und damit vom Ergebnis der Reorganisation der Wassermoleküle während des Bindungsprozesses abhängig ist.

Die S_1' - und S_2' -Taschen sind zwar stark verschieden hinsichtlich der beobachteten Solvationseigenschaften, jedoch können die Taschen durchaus chemisch ähnliche Bindungspartner aufnehmen. Dies veranlasste uns, eine gleichartige peptidomimetische Ligandenserie zu entwickeln, die durch eine Reihe von schrittweisen hydrophoben Modifikationen in der P_2' -Seitenkette gekennzeichnet ist. Hochaufgelöste Kristallstrukturen der gebildeten Protein-Ligand-Komplexe bilden die Grundlage, um die Änderungen in der Wasserstruktur nachzuvollziehen, die durch die Interaktion mit dem P_2' -Rest herbeigeführt werden. Thermodynamische Daten wurden mithilfe der isothermischen Titrationskalorimetrie (ITC) aufgenommen, um einerseits die kristallographischen Beobachtungen aus thermodynamischem Blickwinkel zu erklären und um andererseits die treibenden Kräfte bei der Bindung von Liganden in die S_2' -Tasche von TLN aufzuklären.

Kristallstrukturen von acht TLN-Inhibitoren, die alle ein Cbz-Gly-(PO₂)[−]-L-Leu-L-X-Gerüst (Cbz = Carboxybenzyl, X = Gly **1**, Ala **2**, Et-Gly **3**, Val **4**, nPr-Gly **5**, Ile **6**, Leu **7**, Phe **8**; siehe Schema 1) gemeinsam haben, wurden im Komplex mit TLN mit hoher Auflösung (1.28–1.66 Å) aufgeklärt. Kristallstrukturen mit den Liganden **1**, **2** und **7** wurden bereits in früheren Arbeiten bestimmt.^[6,30] Die kristallographischen

Daten für TLN-7 wurden neu verfeinert, wobei der besseren Vergleichbarkeit willen dasselbe Protokoll für alle untersuchten Liganden angewendet wurde. Da der Bindungsmodus der Gerüststruktur bereits im Detail beschrieben wurde,^[30] werden hier in kurzer Form lediglich die zentralen Aspekte des Bindungsmodus der Gerüststruktur angesprochen. Besonders im Fokus stehen dagegen neue bis dato nicht beschriebene Strukturmerkmale.

Die Elektronendichte für das Molekülgerüst ist für alle untersuchten Inhibitoren gut definiert (stellvertretend für die Serie ist Inhibitor **3** in Abbildung S1 gezeigt, Hintergrundinformationen). Es sind keine signifikanten Änderungen im Bindungsmodus der Liganden festgestellt worden (Abbildung S2). Die Cbz-Gruppe bindet in die unspezifische S_1 -Tasche und das zentrale Phosphonamid koordiniert einzähnig mit einem seiner Sauerstoffatome das Zink-Ion (2.0 Å), während das andere Sauerstoffatom eine Wasserstoffbrücke zu OE1 von Glu143 bildet. Der P_1' -Leucyl-Rest und die strukturell modifizierten P_2' -Seitenreste des Liganden interagieren jeweils mit der hydrophoben Umgebung der S_1' - und S_2' -Taschen (weitere Details siehe Hintergrundinformationen).

Die Hauptunterschiede zwischen den Komplexen lagen bei der Ausgestaltung des Wassernetzwerkes in der Nachbarschaft zur S_2' -Tasche. Das Netzwerk wird gestört und moduliert durch die Größe des P_2' -Substituenten. Leider konnten nicht alle Komplexe mit derselben Auflösung bestimmt werden. So zeigt der Komplex mit dem Valin-Derivat **4** eine geringfügige Unordnung im Bereich dieser kritischen Region. Für das verwandte *n*-Propylglycyl **5** lässt sich aufgrund der Reste elektronendichte eine mögliche Unordnung nicht völlig ausschließen, dennoch haben wir uns entschieden, die finale Dichte durch eine einzige Seitenkettenorientierung zu beschreiben. Die kristallographisch zuverlässige Beschreibung von Wassermolekülen wird mit zunehmender Distanz von der Proteinoberfläche oder von polaren funktionellen Gruppen deutlich erschwert, da in diesen Fällen die lokale Unordnung der Wassermoleküle immer bedeutender wird. Dies gilt im Besonderen bei der Analyse von zusammenhängend verknüpften Ketten von Wassermolekülen. Daher wurden die Streueigenschaften der kritischen Wassermoleküle zudem sorgfältig über die Differenzelektronendichte ($F_o - F_c$) inspiziert, um Genauigkeit und Zuverlässigkeit der beobachteten Solvation der S_2' -Tasche zu garantieren. Besonders die stark miteinander korrelierten *B*-Werte und Besetzungen wurden mit allerhöchster Sorgfalt begutachtet. Diese Einschränkungen machen einen simplen Vergleich der absoluten Anzahl der Wassermoleküle zwischen den jeweiligen Ligandkomplexen sehr schwierig, besonders wenn alle aufgenommenen und freigesetzten Wassermoleküle aufsummiert werden, um feststellen zu können, welche Bilanz an Wassermolekülen am Ende die Bindung kennzeichnet. Die Distanzen variieren entlang des Wassernetzwerkes und könnten durchaus mit der Stärke der gebildeten Wasserstoffbrücke korrelieren. Doch wird die räumliche Genauigkeit der einzelnen Wasserpositionen von verschiedenen Faktoren beeinflusst, z.B. von einer gewissen Restmobilität, von Unordnungseffekten oder Teilbesetzungen, die allesamt die Genauigkeit der Wasserpositionen limitieren.

Daher wird in dieser Arbeit von einer detaillierten Analyse der unterschiedlichen Längen von Wasserstoffbrücken abgesehen.

Die Solvatationseigenschaften sind im Bereich der Cbz-Carbonyl- und der negativ geladenen terminalen Carboxylat-Gruppe praktisch in allen Komplexen identisch (Abbildung S2, rechts, unterer Teil). Ein Netzwerk aus mindestens sieben wechselseitig verbundenen Wassermolekülen vermittelt die Interaktion zwischen diesen funktionellen Ligandgruppen und Asp226, Asn227 und Asn112. In zwei Komplexen deuten sich Wassermoleküle aus der zweiten Solvationsschicht an (TLN-4, TLN-5).

Ein komplexeres Bild offenbart sich bei der Analyse des Wassernetzwerkes im Bereich der P_2' -Substituenten, deren Reste innerhalb der Serie systematisch anwachsen und somit ab einer gewissen Größe eine Störung des lokalen Wassernetzwerkes herbeiführen (Abbildung S2, rechts, unterer Teil). Die Kristallstrukturen von TLN-1 und TLN-2 wurden in einer früheren Studie verglichen.^[30] Das Glycin-Derivat **1** ist über zwei Wassermoleküle mit der Carbonylgruppe in der Hauptkette von Asn111 verbrückt. Beide Wassermoleküle werden dagegen beim TLN-2-Komplex aufgrund sterischer Konflikte durch die angefügte Methylgruppe im Alanin-Derivat **2** verdrängt (Abbildung 1 a, eingekreist in Hellblau). Demgegenüber nimmt der TLN-2-Komplex als Kompensation der beiden verdrängten Wassermoleküle zwei neue (Abbildung 1 b, eingekreist in Gelb und Grün) bei der Ligandenbindung auf, die ausgeprägte Van-der-Waals-Kontakte mit der terminalen Alanin-Methylgruppe zeigen. Zudem ist im TLN-2-Komplex eine durchgehend verbundene Wasserkette erkennbar, die sich von der Carboxylat-Gruppe des Liganden bis zu Asn111(C=O) erstreckt. Überraschenderweise ist dieses Wassernetzwerk im TLN-1-Komplex aufgebrochen und nicht als geschlossenes Netzwerk identifizierbar (Abbildung 1 a und b).

Ein Vergleich der Wassernetzwerke in TLN-2 und -3 (Abbildung 1 b,c) zeigt nahezu identische Solvatationsmuster, während diese in TLN-4 und -5 (Abbildung 1 d,e) voneinander abweichen und am unteren linken Rand der Tasche unterbrochen werden. Trotzdem besitzen das Valyl-4- und das *n*-Propyl-5-Derivat sehr ähnlich ausgeprägte Wassernetzwerke. Die Isopropyl-Seitenkette ist in TLN-4 in mindestens zwei Konformationen sichtbar. Diese partielle Unordnung überführt auch den benachbarten Leu202-Rest in einen ungeordneten Zustand, dessen Isobutyl-Seitenkette zwei verschiedene Konformationen mit jeweils 55% und 45% Besetzung annimmt (Abbildung S4). Beide Konformationen korrelieren miteinander aufgrund der sterischen Beeinträchtigung. Bei der Betrachtung der aufgenommenen Wassermoleküle in TLN-2 und -3 verglichen mit TLN-1, zeigen auch die Komplexe mit **4** und **5** ein Wassermolekül, das in einer sehr markanten Position oberhalb der Carboxylat-Gruppe positioniert ist (Abbildung 1 d,e, eingekreist in Grün).

Die Komplexstruktur mit dem Ile-Derivat **6** zeigt wiederum ein durchgehend verbundenes Wassernetzwerk, welches die terminale hydrophobe Gruppe, vergleichbar wie in TLN-2 und -3, ringförmig umhüllt. Das Wassernetzwerk muss jedoch im Vergleich zu TLN-2 einen größeren Bogen um die voluminösere Butyl-Gruppe herum einschlagen, um eine

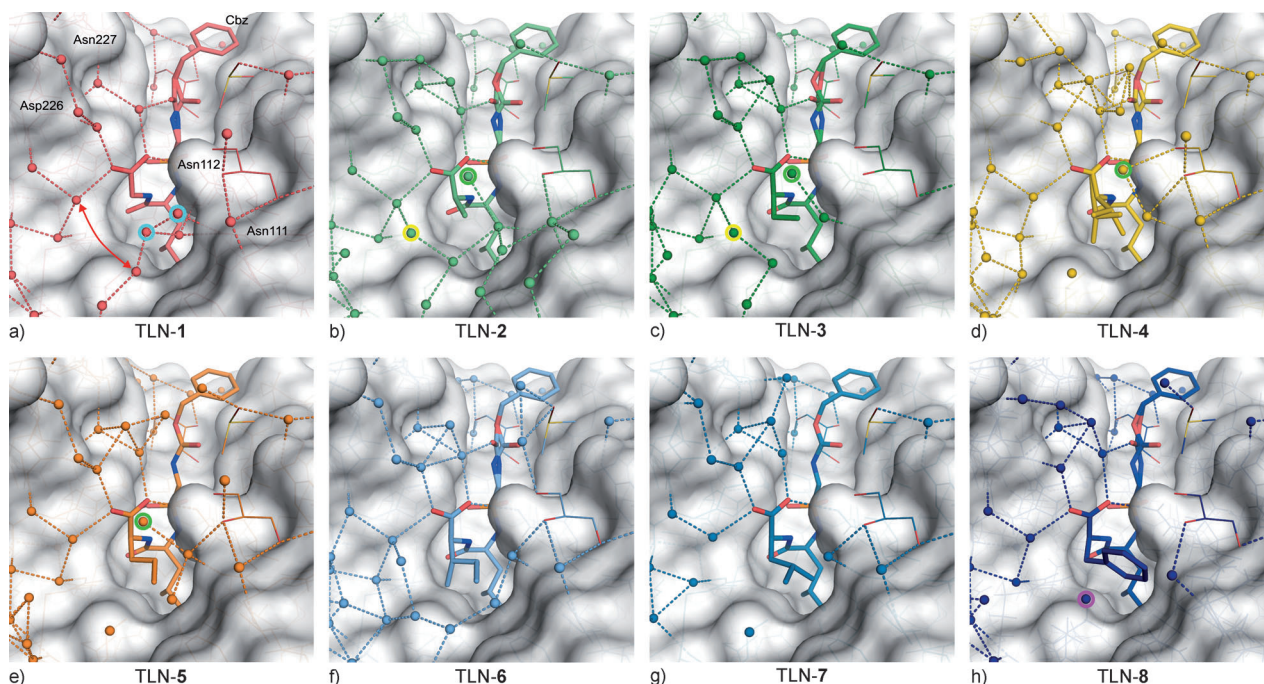


Abbildung 1. Darstellung der Bindungsmodi der Liganden 1–8. Jeder Komplex ist mit einem anderen Farbcode gezeigt, Heteroatome in Atomtypischer Farbcodierung, Wassermoleküle als Kugeln mit derselben Farbe wie die jeweilige Proteinstruktur. In TLN-1 sind zwei Wassermoleküle (eingekreist in Hellblau) vorhanden, die in den anderen Strukturen aufgrund sterischer Konflikte mit dem räumlich wachsenden P_2' -Substituenten verdrängt werden. TLN-1 zeigt einen Bruch im durchgehend verknüpften Wassernetzwerk (roter Pfeil). Diese Lücke wird in TLN-2 und -3 durch die Aufnahme eines zusätzlichen Wassermoleküls (eingekreist in Gelb) geschlossen. Dieses neue Wassermolekül wird in seiner Position durch günstige Van-der-Waals-Kontakte mit der P_2' -Methyl- und P_2' -Ethyl-Gruppe in 2 und 3 stabilisiert. Hinzu kommen Wasserstoffbrücken mit den umgebenden Wassermolekülen. Ähnliche Van-der-Waals-Kontakte sorgen dafür, dass das der Carboxylat-Gruppe aufsitzende Wassermolekül „capping water“ (eingekreist in Grün) eine sehr günstige Interaktionsumgebung in den Komplexen mit 2, 3, 4 und 5 erfährt. In den Komplexen 6, 7 und 8 wird dieses Wassermolekül verdrängt, während in 8 ein neues Wassermolekül in der Nähe der Phenyl-Gruppe des P_2' -Substituenten hinzukommt (eingekreist in Violett).

durchgehende Kette zu bilden. Die bereits in einer früheren Publikation veröffentlichte Struktur TLN-7 (PDB-Code 3FWD,^[6] jetzt 4H57) ist im Zuge dieser Studie erneut verfeinert worden, um aus Gründen der Vergleichbarkeit dasselbe Verfeinerungsprotokoll und -programm anzuwenden. Obwohl das beobachtete Netzwerk in TLN-7 nicht derart komplett ist wie bei TLN-6, sind beide Wassernetzwerke durchaus ähnlich (Abbildung 1g). In beiden Komplexen ist das für TLN-2, -3, -4 und -5 typische, auf der Carboxylat-Gruppe sitzende Wasser nicht erkennbar (Abbildung 1b–e, eingekreist in Grün). In den Kristallstrukturen mit 2, 3, 4 und 5 liegt die kürzeste Distanz zwischen dem markant aufsitzenden Wasser und den jeweiligen Alkyl-Seitenketten bei 3.80–3.85 Å. In TLN-4 weicht die Position des Wassermoleküls aufgrund der verzweigten und teils ungeordneten Valyl-Gruppe des Liganden ein wenig davon ab (Abbildung S4a). Berücksichtigt man die durchschnittliche Position des als „capping water“ bezeichneten Wassers in diesen Komplexen, wäre die hypothetische Distanz zu den deutlich sperrigeren Butyl-Seitenketten in TLN-6 und -7 um ca. 0.3 Å kürzer. Diese Distanz wäre aber zu kurz und sterisch so ungünstig, dass in Folge das „capping water“ in TLN-6 und -7 verdrängt wird. Der mit einem terminalen Phenyl-Rest ausgestattete TLN-8-Komplex zeigt die niedrigste Anzahl von geordneten Wassermolekülen in der Nähe der S_2' -Tasche. Fast alle Wassermoleküle, die in anderen Komplexen nahe dem unteren

Rand der S_2' -Tasche beobachtet wurden, scheinen hier entweder verdrängt oder nicht ausreichend geordnet zu sein. Dies korreliert höchstwahrscheinlich mit dem gestiegenen sterischen Raumbedarf der Phenyl-Gruppe, die die S_2' -Tasche sehr ausgiebig auszufüllen vermag. Dennoch ist es bemerkenswert, dass gerade ein Wassermolekül, welches in TLN-2 und -3 (Abbildung 1h, eingekreist in Violett) eine Position in der Nähe des Liganden besetzt, auch in TLN-8 auf dieser charakteristischen Position zu finden ist. Diese Position ist definitiv nicht besetzt in TLN-6 und -7, während in TLN-8 dieses dort platzierte Wassermolekül eine stabilisierende Interaktion (3.2 Å) mit dem π -Elektronensystem des benachbarten Phenylrings des Liganden bildet (Abbildung S5). Interessanterweise fehlt auch in TLN-8 das charakteristische, der Carboxylat-Gruppe aufsitzende Wassermolekül („capping water“), höchstwahrscheinlich wieder aufgrund von sterisch ungünstigen Wechselwirkungen mit dem terminalen P_2' -Substituenten.

Der Einfluss des räumlich sperrigen Phenyl-Restes in TLN-8 wirkt sich auch auf das benachbarte Proteinmolekül aus. Es interagiert mit der Hauptketten-Carbonylgruppe von Asn111, die dadurch in eine andere Position gedrängt wird und in Folge zu einer zweiten Konformation gezwungen wird (Abbildung S5). Diese Anpassung seitens des Proteins geht mit einem partiellen Planaritätsverlust der Peptidbindung zwischen Asn111 und Asn112 einher. Diese drastische Ver-

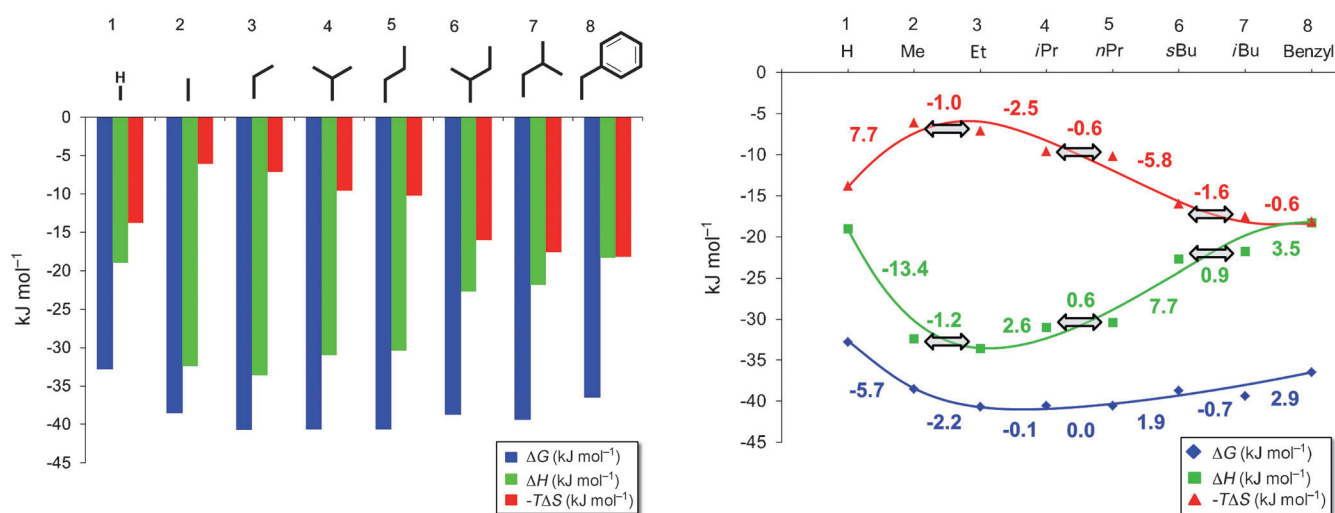


Abbildung 2. Mit ITC aufgenommene thermodynamische Daten für ΔG (blau), ΔH (grün) und $-T\Delta S$ (rot). Die Titrations wurden in HEPES-Puffer aufgenommen. Die Ergebnisse beinhalten keine Korrektur der überlagerten Glu143-Protonierung und der Verdrängung des Abbauprodukts Lys-Val. Rechts: Um die relativen Unterschiede zu verdeutlichen, sind die thermodynamischen Daten in einer anderen Art zusammengestellt worden. Die angezeigten Werte geben die relativen Unterschiede zwischen den benachbarten Liganden wieder. Die Enthalpie-Entropie-Kompensation ist hierbei die Ursache, weshalb lediglich kleine Änderungen in der Bindungsenergie beobachtet werden und etappenweise Änderungen für nahe verwandte Paare zu Tage kommen.

zerrung in der Geometrie der Peptidbindung ist in den anderen Komplexstrukturen nicht zu beobachten (ω -Winkel weicht um 10.4° und -17.3° von einer planaren Struktur ab, weitere Details Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Das Carbonyl-Sauerstoffatom weicht somit in zwei verschiedene Richtungen aus, um genügend Raum für die große Phenyl-Seitenkette von **8** zu schaffen.

Veränderungen in den thermodynamischen Bindungsparametern wurden für die gesamte Inhibitorserie mit isothermischer Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt. Es konnten keine absoluten thermodynamischen Werte für die Inhibitorbindung vermessen werden, da die Bindung der Inhibitoren von der Verdrängung eines TLN-typischen Abbauprodukts überlagert wird. Das Abbauprodukt Lys-Val ist das Resultat einer Autoprotolysereaktion bei hohen TLN-Konzentrationen. In dieser Hinsicht besitzen alle gemessenen thermodynamischen Daten einen konstanten Beitrag, der aus der Verdrängung von Lys-Val resultiert. Dieser konstante Beitrag der Dipeptidverdrängung entfällt jedoch bei ausschließlicher Betrachtung der relativen Unterschiede. Inhibitionskonstanten wurden auch für alle Inhibitoren **1–8** mit einem Enzym-Assay bestimmt. Die im Enzym-Assay gemessenen Änderungen in der freien Bindungsenergie sind mit ähnlicher relativer Abstufung wie bei den ITC-Daten beobachtbar, nur liegt ein konstanter Versatz vor (siehe Tabelle S3). Daher bestätigen die kinetisch bestimmten Inhibitionsdaten die Resultate der ITC-Experimente.

Darüber hinaus verweist eine beobachtete Pufferabhängigkeit der aufgenommenen ITC-Ergebnisse, dass alle Komplexe ein Proton bei der Bildung der Protein-Ligand-Komplexe aufnehmen. Die Daten verdeutlichen, dass das dem katalytischen Zink-Ion benachbarte Glu143 seinen Protonierungszustand während der Inhibitorbindung ändert (siehe Hintergrundinformationen). Da dieser Rest nicht direkt an

der Bindung des P_2' -Restes beteiligt ist, wird die Thermodynamik für alle Komplexe in gleicher Weise beeinflusst. Somit spielt auch dieser Beitrag bei der nachfolgenden Interpretation keine Rolle, da die Ergebnisse der Inhibitorbindung stets relativ zueinander betrachtet werden.

Abbildung 2 verdeutlicht, dass abgesehen von TLN-**1** die Bindung immer stärker entropisch wird, je größer der angefügte hydrophobe P_2' -Substituent gewählt wird.^[32] Gleichzeitig wird eine signifikante Enthalpie-Entropie-Kompensation beobachtet, die dazu führt, dass die Veränderungen in der freien Bindungsenthalpie viel kleiner ausfallen als die gemessenen enthalpischen und entropischen Veränderungen es vermuten lassen. Ein bemerkenswerter relativer Gewinn in der Affinität ($\Delta\Delta G_{1/2} = -5.7 \text{ kJ mol}^{-1}$) wird erzielt, wenn Struktur **1** mit **2** verglichen wird. Dieser Gewinn ist hauptsächlich auf eine Verbesserung in der Enthalpie ($\Delta\Delta H_{1/2} = -13.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) zurückzuführen und wird teils kompensiert durch ein, verglichen mit **1**, kleineres entropisches Signal von **2** ($-T\Delta\Delta S_{1/2} = 7.7 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Tabelle S5). Die freie Bindungsenthalpie verbessert sich innerhalb der Serie von **1** bis **5**, wobei **3**, **4** und **5** innerhalb der experimentellen Genauigkeit vergleichbare Werte zeigen. Die Liganden **6**, **7** und **8** verlieren dagegen leicht an Affinität (Abbildung 2).

Bei der genauen Betrachtung von besonders nahe verwandten Ligandpaaren wurden einige systematische Änderungen augenfällig. Die einzelnen Ligandpaare **2/3** ($\Delta\Delta H_{2/3} = -1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta\Delta S_{2/3} = -1.0 \text{ kJ mol}^{-1}$), **4/5** ($\Delta\Delta H_{4/5} = -0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta\Delta S_{4/5} = 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) und **6/7** ($\Delta\Delta H_{6/7} = 0.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta\Delta S_{6/7} = -1.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) zeigen untereinander kaum Änderungen in den Bindungsparametern, während die Änderungen in den Bindungseigenschaften beim Übergang von **3** nach **4** ($\Delta\Delta H_{3/4} = 2.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta\Delta S_{3/4} = -2.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) und von **5** nach **6** ($\Delta\Delta H_{5/6} = 7.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-T\Delta\Delta S_{5/6} = -5.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) um einiges deutlicher ausfallen.

Das Phenyl-Derivat weicht vom Paar **6/7** ab und zeigt eher ein thermodynamisches Profil mit ausgeglichenen enthalpischen und entropischen Beiträgen.

In dieser Studie wurden peptidomimetische Übergangszustandsanaloge vorgestellt, deren terminale hydrophobe Substitutionen schrittweise vergrößert wurden, um die hydrophobe S_2' -Tasche von TLN besser ausfüllen zu können. Diese offene schalenförmige Tasche ist aus der umgebenden Wasserphase frei zugänglich und kann Substituenten bis zu einer Größe von einem Benzyl-Rest unterbringen. Die Tasche kann durch den Benzyl-Rest bestmöglich ausgefüllt werden. Der Rest verschafft sich sogar selbst Platz auf der Proteinseite, indem es eine Carbonylgruppe der Hauptkette aus seiner ursprünglichen Position aufgrund sterischer Wechselwirkungen zur Seite schiebt. Dieser Carbonyl-Sauerstoff ist somit gezwungen, sich in zwei verschiedene Richtungen zu orientieren. Die beiden alternativen Konformationen scheinen aufgrund des Planaritätsverlusts jedoch energetisch ungünstig zu sein.

Auch wenn die hydrophobe Oberfläche innerhalb der Serie vom Wasserstoff in Gly zum Benzyl-Rest im Phe-Derivat kontinuierlich um ca. 130 \AA^2 gestiegen ist, lässt sich lediglich eine Verbesserung in der Bindungsenergie um -3.7 kJ mol^{-1} beobachten. Dies ist verschwindend gering, wenn man sich im Zuge dessen die bloße Dehydratationsenergie von geschätzt -2 bis -3 kJ mol^{-1} pro vergrabener Methyl-Gruppe^[33] vor Augen führt. Unter alleiniger Betrachtung der hydrophoben Oberflächensituation hätten wir für diesen hydrophoben Effekt einen viel größeren Wert in der freien Bindungsenthalpie erwartet. Interessanterweise wird die höchste Affinität für den Ethyl- (**3**), Isopropyl- (**4**) oder *n*-Propyl-Substituenten (**5**) beobachtet, obwohl hinsichtlich der Größe der Substituenten die Tasche noch nicht im vollen Umfang besetzt wird. Dies verdeutlicht aufs Neue, dass hier das alleinige Betrachten der vergrabenen hydrophoben Oberflächen zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führen kann. Die Kristallstruktur von **8** offenbart ungünstige Konformationen von Asn111, die ebenfalls zu dem beobachteten Abfall in der Bindungsaffinität für diesen Liganden beitragen. Besonders hervorzuheben ist der Trend in der Enthalpie-Entropie-Kompensation, der sich am stärksten auswirkt auf den potentesten Liganden. Die Änderungen sind nicht gleichförmig innerhalb der Serie, eher zeigen die strukturell verwandten Paare **2/3**, **4/5** und **6/7** sehr ähnliche thermodynamische Profile (Abbildung 2). Dies bestätigt für jedes dieser Paare die beobachteten strukturellen Ähnlichkeiten im Solvationmuster der jeweiligen Komplexe.

Der Bindungsmodus der Gerüststruktur bleibt praktisch für **1–8** unverändert. Auch das Solvationsmuster nahe der Cbz- und der terminalen Carboxylat-Gruppe des Liganden zeigt keine relevanten Unterschiede innerhalb der Serie (Abbildung S2, rechter oberer Teil). Die Wasserstruktur ist aus mindestens sieben konservierten Wassermolekülen aufgebaut und vermittelt über ein komplexes Netzwerk zwischen dem Liganden und den funktionellen Gruppen des Proteins. Zudem sind keine Unterschiede in den Kontakten sowohl zum Glycerol wie auch zum DMSO erkennbar. Beide Moleküle stellen Bestandteile des Cryo-Puffers dar und sind beim Tränken der Kristalle mit den Liganden diffundiert. Die

wirklichen Änderungen finden in der Nähe der hydrophoben und stetig größer werdenden P_2' -Substituenten statt (Abbildung S2 rechts, unterer Teil). Hier ist abhängig von der Substitution das Netzwerk aus Wassermolekülen teils stark durcheinander gewirbelt.

Ein vergleichsweise großer Unterschied im thermodynamischen Profil ist durch die Einführung einer Methylgruppe an das Glycin-Derivat **1** erzielt worden. Das Glycin-Derivat hat in Lösung im ungebundenen Zustand vor der eigentlichen Proteinbindung einen größeren Konformationsraum zur Verfügung als das analoge Ala-Derivat. Demzufolge wird TLN-**2** einen kleineren entropischen Verlust während der Bindung hinnehmen müssen als TLN-**1**. Da jedoch das thermodynamische Profil von TLN-**2** in Wahrheit eher einen größeren denn einen kleineren entropischen Verlust anzeigt, müssen konsequenterweise andere Effekte eine wichtige Rolle spielen. Es ist durchaus möglich, dass die Konformationsunterschiede für die entropische Betrachtung nicht so entscheidend sind, da gelöste ungebundene Liganden innerhalb eines Käfigs aus Lösungsmittelmolekülen kaum ihre volle Flexibilität entfalten können. Sie dürften in ihren Freiheitsgraden ähnlich eingeschränkt sein wie im gebundenen Zustand in einer Tasche, die offen ist für das umgebene Lösungsmittel. Wie in unserer vorherigen Studie^[30] auch an den analogen decarboxylierten Derivaten von **1** und **2** eindrucksvoll gezeigt, spielt das Aufbrechen eines durchgehend verknüpften Wassernetzwerks, das die terminale Methylgruppe in TLN-**2** umspannt, eine für die Bindung maßgebliche Rolle (Abbildung 1 a,b). Es ist leicht nachvollziehbar, dass die Methylgruppe neue Interaktionsmöglichkeiten für die neu hinzu gekommenen Wassermoleküle schafft und diese dann durch Van-der-Waals-Kontakte stabilisierend in Position hält. Andererseits werden zwei Wassermoleküle, die in TLN-**1** durch Wasserstoffbrücken mit Asn111(C=O) interagieren (Abbildung 1 a, eingekreist in Hellblau) aufgrund von sterischen Abstoßungen mit der zusätzlichen Methylgruppe aus dem Komplex verdrängt. Das Aufreißen des durchgehend verknüpften Wasserstoffbrückennetzes macht die exotherme Bindung von **1** um einiges ungünstiger, während die Bindung von **2** aufgrund einer stärkeren Fixierung des gesamten Wassernetzwerkes entropisch benachteiligt wird. Demzufolge wird eine insgesamt Enthalpie-getriebene Reaktion beim Vergleich von **1** mit **2** verständlich und kann formal als ein „nicht-klassischer hydrophober Effekt“ bezeichnet werden.

Das Ethyl-Derivat **3** zeigt eine nahezu identische thermodynamische Signatur wie **2**. Die Enthalpie sowie die Entropie werden beim Vergleich mit **2** umso günstiger. Das $\Delta\Delta G$ verbessert sich hier um -2.2 kJ mol^{-1} und spiegelt damit einen Wert wider, der sich im typischen Bereich für eine günstig platzierte Methylgruppe befindet. Dieser gemessene Wert stimmt sehr gut mit der abgeschätzten Desolvationsenergie für eine Methylgruppe überein. Auch in **3** scheint das Ausmaß der konformativen Freiheit eher von untergeordnetem Interesse zu sein. Hinsichtlich des Wassernetzwerkes ist TLN-**3** nahezu identisch mit TLN-**2**. Die Isopropyl- und *n*-Propyl-Derivate **4** und **5** haben zwar vergleichbare thermodynamische Eigenschaften, aber sie haben verschiedene Enthalpie/Entropie-Werte bezogen auf das vorherige Paar **2/**

3. Die verzweigte und starrere Valyl-Seitenkette in TLN-4 ist über zwei Konformationen verteilt und hat zudem über unvorteilhafte sterische Kontakte einen Einfluss auf den Ordnungszustand des gegenüberliegenden Leu202. Das flexiblere P_2 -*n*-Propyl-Gerüst in TLN-5 scheint zwar geordnet zu sein, jedoch kann aus kristallographischer Sicht ein gewisser Grad an Unordnung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zudem sind zwei das Wassernetzwerk in TLN-2 und -3 stützende Wassermoleküle am unteren Ende der Tasche nicht sichtbar und das Gesamtnetzwerk wirkt offenkundig unvollständig in TLN-4 und -5. Dies sollte, vergleichbar zu TLN-1, zu einem enthalpischen Nachteil und einem entropischen Vorteil führen. Beide Aspekte, die Unordnung und die Wasserverdrängung, bevorteilen den entropischen Beitrag von TLN-4 und -5. Dennoch wird in Bezug auf die freie Bindungsenthalpie dieser Vorteil nahezu vollständig kompensiert. Trotzdem ist es bemerkenswert festzustellen, dass TLN-4 und -5 nicht nur ein ähnliches thermodynamisches Profil sondern auch eine verblüffende signifikante Ähnlichkeit der lokalen Wasserstruktur miteinander gemeinsam haben. Der hydrophobe Effekt, der auf die Unterschiede von 2/3 zu 4/5 zurückgeht, kann als „klassischer Entropie-getriebener hydrophober Effekt“ angesehen werden.

Alle vier Komplexe TLN-2, -3, -4 und -5 weisen ein Wassermolekül an einer Position auf, die der Carboxylat-Gruppe des Liganden aufsitzt. Sie alle haben ein um ca. 10 kJ mol^{-1} stärkeres enthalpisches Signal als die Komplexe TLN-1, -6, -7 und -8, die alle kein Wassermolekül an dieser Stelle aufweisen. Seine räumliche Position sollte aus elektrostatischen Gründen energetisch vorteilhaft sein. Die Untersuchung der Häufigkeit solcher Carboxylat-Wasser-Kontakte in Proteinstrukturen war Teil einer Studie von Paulini et al.^[34] und zudem konnte eine klare Präferenz für diese Geometrie bei einer Zusammenstellung von Carboxylat-Wasser-Kontakten mittels IsoStar^[35] gefunden werden.

TLN-6 und -7 vermögen ihre *sec*-Butyl- und Isobutyl-Gruppen in einer geordneten Weise in die S_2' -Taschen zu platzieren. Erneut erfahren beide Komplexe sehr ähnliche Enthalpie/Entropie-Profile mit einem starken enthalpischen Nachteil und einem entropischen Vorteil im Vergleich zu den Komplexen des Paares 4/5. Hinsichtlich des Solvatationszustands werden ähnliche Netzwerke beobachtet, die sich um die terminalen hydrophoben Seitenketten des Liganden herumwickeln und sich entlang des Rands der S_2' -Tasche orientieren. Im Vergleich zu TLN-2 und -3, haben in TLN-6 zwei Wassermoleküle ihre Position derart nach außen verlagert, dass dadurch ein erweitertes Wassernetzwerk ermöglicht wird. Das „capping water“ über der Carboxylat-Gruppe ist nicht länger sichtbar, da augenscheinlich sterische Abstoßungen mit dem deutlich raumerfüllenderen Butyl-Rest dies nicht zulassen. Offensichtlich ist die Freisetzung dieses speziellen Wassermoleküls einer der Gründe, weshalb die Enthalpie in diesem Fall verliert und die Entropie gewinnt. Alles in allem wäre dies dem „klassischen hydrophoben Effekt“ zuzuordnen.

Als letzter Inhibitor in der Reihe verliert das Benzyl-Derivat 8 2.9 kJ mol^{-1} an $\Delta\Delta G$ verglichen mit 7. Dieser Preis wird durchweg in Enthalpie beglichen und steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der räumlichen Kollision des

Phenyl-Restes mit der Carbonylgruppe der Hauptkette von Asn111. Auch in diesem Komplex wird das „capping water“ aus der Position über der Carboxylat-Gruppe verdrängt. Die Wasserstruktur scheint sich dabei zum unteren Ende der S_2' -Tasche auszudünnen. Dennoch kommt ein Wassermolekül, das schon in TLN-2 und -3 populiert war, in der Nähe des Liganden neu hinzu (Abbildung S5a). Dieses Wassermolekül wird höchstwahrscheinlich an seiner kritischen Position dadurch stabilisiert, dass es senkrecht auf dem terminalen aromatischen Ring des Phenyl-Rests interagiert (Abbildung 1h, eingekreist in Violett). Verglichen mit TLN-6 und -7 büßt der hydrophobe Effekt in TLN-8 vorwiegend an Enthalpie ein. Zudem nimmt TLN-8 durch den nach außen gerichteten Phenylrest ein neues Wassermolekül auf.

Die beschriebenen strukturellen Eigenschaften in der Nähe der S_2' -Tasche zeigen, dass einfache auf vergrabene Ligand- und Proteinoberflächen getrimmte Modelle^[36,37] für die Beschreibung von Desolvationseffekten von in der Größe unterschiedlichen Liganden bei weitem nicht ausreichen, um die beobachteten thermodynamischen Unterschiede nachvollziehbar erklären zu können. Überraschenderweise spielen Unterschiede in den Konformationseigenschaften der P_2 -Seitenkette eine untergeordnete Rolle. Die Anzahl rotierbarer Bindungen variiert zwar in Abhängigkeit von der Größe der Substituenten, aber eine messbare Auswirkung auf die Bindung blieb jedoch aus. Der Ligand mit seiner gebundenen Seitenkette bildet zusammen mit dem Protein die neu geformte Komplexoberfläche. Wassermoleküle lagern sich entlang dieser neuen Oberfläche an und arrangieren sich entsprechend ihrer stark strukturprägenden Eigenschaften. Sie vermögen sogar die Bindungsgeometrie des Liganden in einer Art anzupassen, dass ein bestmöglicher Kompromiss zwischen der Güte des Wassernetzwerkes und des Bindungsmodus ermöglicht wird. In der Summe beschreiben all diese Beiträge, ausgehend von der separaten Solvation beider Bindungspartner im ungebundenen Zustand bis zur Solvation des gebildeten Komplexes, quantitativ die beobachteten thermodynamischen Profile. Da TLN ein sehr starres Proteinmolekül darstellt, sind Einflüsse aufgrund von Änderungen der Restmobilität von Proteinresten oder gar induzierte Anpassungen auf Proteinseite, abgesehen von TLN-8, nicht relevant. Auch wenn unsere Diskussion nur auf qualitative Korrelationen hinzielt, ist es bemerkenswert, dass Komplexe mit Seitenketten vergleichbarer Größe und vergleichbarer Anzahl rotierbarer Bindungen eine sehr ähnliche thermodynamische Signatur aufweisen.

Die vorgestellte Serie beschreibt und erklärt im Detail inwieweit sich Änderungen in der ersten Solvationsschicht in der Umgebung einer Bindetasche auf die Bindungsaffinität auswirken. Es ist gezeigt worden, dass Wassernetzwerke sich durchaus modulierend auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen auswirken. Ein Steigern der hydrophoben Eigenschaften angefügter funktioneller Gruppen innerhalb einer hydrophoben Tasche ist seit jeher mit dem hydrophoben Effekt in Verbindung gebracht worden. Dieser Effekt geht entweder mit einer enthalpischen oder entropischen Signatur einher.^[6,7,11,12] Kristallstrukturanalysen zusammen mit ITC-Daten der untersuchten Komplexe unterstreichen, dass beide Faktoren, sowohl Enthalpie wie auch Entropie, zum hydrophoben

Effekt beitragen und dass viele strukturelle Detailphänomene die endgültige Signatur der Bindung bestimmen. Wenn beispielsweise ein durchgehend verknüpftes Wassernetzwerk wie in TLN-1 geschehen unterbrochen wird, resultiert daraus im relativen Vergleich zu TLN-2 ein entropischer Gewinn, während enthalpisch der Ligand verliert.^[26] Der Verlust von Wasserstoffbrücken beim Aufreißen des Wassernetzwerks erlaubt dem Gesamtsystem mehr Freiheitsgrade und die Energie verteilt sich auf mehr Freiheitsgrade. Die Verdrängung von geordneten Wassermolekülen kann entropisch günstig sein. Andererseits kann die Freisetzung von bereits weitgehend ungeordneten Wassermolekülen ein vorwiegend enthalpisches Signal liefern.^[6–9] Wenn Teile des Liganden Taschen besetzen, die frei zugänglich und exponiert sind für das umgebene Wasser, dann können sogar neue Bindungsareale für zusätzliche Wassermoleküle ausgebildet werden. In unserer Studie wurden Bindestellen für das „capping water“ und das dem Phenylring zentral aufsitzende Wassermolekül geschaffen. Besonders das „capping water“ liefert einen signifikanten Beitrag. Den vier Komplexen TLN-1, -6, -7 und -8 fehlt dieses Wassermolekül aufgrund von sterischen Konflikten, und sie verlieren alle an Bindungsenergie vorwiegend aus enthalpischen Gründen. Dieser enthalpische Verlust wird teilweise kompensiert durch einen günstigen entropischen Term, da in diesen Komplexen der für das Einfangen des Wassermoleküls üblicherweise zu zahlende entropische Preis ausbleibt. All diese Phänomene leisten ihren eigenen Beitrag auf molekularer Ebene. Die Überlagerung all dieser Beobachtungen zeigt sich schließlich am Ende als der „hydrophobe Effekt“. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass jedoch keine allgemeingültige Regel aufzustellen ist, die vorhersagen könnte, wann sich der hydrophobe Effekt vorwiegend mit entropischer bzw. enthalpischer Signatur offenbart. Kleine strukturelle Änderungen in den Bindungseigenschaften der Wassermoleküle auf molekularer Ebene bestimmen letztendlich darüber, ob eine hydrophobe Bindung enthalpisch oder entropisch getrieben ist.

Zugegebenermaßen geht diese Studie an die Grenzen der heute möglichen experimentellen Genauigkeit in der Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen. Die Interpretation der Differenzelektronendichte hinsichtlich der Anwesenheit von Wassermolekülen ist äußerst kritisch und hängt stark von der Auflösung und von Ordnungsphänomenen ab. In der vorgestellten Studie zeigen jedoch alle acht Kristallstrukturen nahezu ähnliche und untereinander konsistente Wassermuster. Dies unterstreicht die Zuverlässigkeit der Methode und gibt Vertrauen beim Abschätzen der Relevanz der Daten. Unsere Strukturdaten beziehen sich auf die Analyse von Kristallen, die beim Schockgefrieren ein Abbild der Verhältnisse bei Raumtemperatur konservieren.^[38] Die thermodynamischen Daten wurden dagegen in Lösung aufgenommen. Trotz der Unterschiedlichkeit in der Methodik ist durchaus ein sehr schlüssiges und konsistentes Bild entstanden. Überraschende paarweise auftretende systematische Änderungen in den thermodynamischen Daten lassen sich für Komplexe mit verwandten Liganden beobachten. Die thermodynamischen Eigenschaften korrelieren sehr überzeugend mit den strukturellen Änderungen. Die vorliegende Arbeit liefert zwar kleine, aber dafür sehr wichtige Details. Com-

putermethoden versuchen stets, molekulare Eigenschaften auf atomarer Ebene zu simulieren, und dabei sind sie massiv auf die Summation vieler kleiner Details angewiesen.^[39] Jedoch werden die hier aufgedeckten Phänomene für gewöhnlich in Computersimulationen nicht als relevant eingestuft, vermutlich da man ihre Relevanz für Protein-Ligand-Wechselwirkung, für Struktur-Aktivitäts-Beziehung und für das rationale Wirkstoffdesign im Allgemeinen nicht wirklich zuverlässig abzuschätzen weiß. Die hier vorgestellte Studie liefert aber wichtige Einblicke in die Bedeutung mit der diese Details den Bindungsprozess beeinflussen. Eine Berücksichtigung dieser Details in Computersimulationen wird diese nicht notwendigerweise einfacher machen, aber es wird ihnen zuverlässiger gelingen, die Bindungsaffinität und andere Aspekte der molekularen Erkennung besser abzuschätzen.

Experimentelles

Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Protein Data Bank mit den folgenden Zugangs-codes deponiert: TLN-3-Komplex 3T87; TLN-4-Komplex 3T8H; TLN-5-Komplex 3T8C; TLN-6-Komplex 3T8D; TLN-8-Komplex 4D9W. TLN-1 und TLN-2 wurden in einer früheren Arbeit als 3T8G und 3T74 veröffentlicht. TLN-7 (4H57) wurde erneut verfeinert. Die neu deponierten Koordinaten haben die früheren Verfeinerungsergebnisse ersetzt.

Eingegangen am 24. Oktober 2012

Online veröffentlicht am 2. Januar 2013

Stichwörter: Enthalpie-Entropie-Kompensation · Hydrophober Effekt · Kristallstrukturanalyse · Protein-Ligand-Wechselwirkungen · Wassersolvatation

- [1] „hydrophobic interaction:“ M. Nic, J. Jirat, B. Kosata, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (Online ed.), **2006**, DOI: 10.1351/goldbook.H02907.
- [2] D. Chandler, *Nature* **2005**, 437, 640–647.
- [3] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **1959**, 14, 1–63.
- [4] M. Charton, B. I. Charton, *J. Theor. Biol.* **1982**, 99, 629–644.
- [5] G. M. Whitesides, V. M. Krishnamurthy, *Q. Rev. Biophys.* **2005**, 38, 385–395.
- [6] L. Englert, A. Biela, M. Zayed, A. Heine, D. Hangauer, G. Klebe, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2010**, 1800, 1192–1202.
- [7] R. J. Bingham, J. B. Findlay, S. Y. Hsieh, A. P. Kalverda, A. Kjellberg, C. Perazzolo, S. E. Phillips, K. Seshadri, C. H. Trinh, W. B. Turnbull, G. Bodenhausen, S. W. Homans, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1675–1681.
- [8] S. W. Homans, *Drug Discovery Today* **2007**, 12, 534–539.
- [9] P. W. Snyder, J. Mecnovic, D. T. Moustakas, S. W. Thomas, 3rd, M. Harder, E. T. Mack, M. R. Lockett, A. Heroux, W. Sherman, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 17889–17894.
- [10] A. Biela, F. Sielaff, F. Terwesten, A. Heine, T. Steinmetzer, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 6094–6110.
- [11] D. B. Smithrud, T. B. Wyman, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5420–5426.
- [12] K. J. Breslauer, D. P. Remeta, W. Y. Chou, R. Ferrante, J. Curry, D. Zauczkowski, J. G. Snyder, L. A. Marky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8922–8926.
- [13] T. Young, R. Abel, B. Kim, B. J. Berne, R. A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 808–813.

- [14] J. M. Word, M. T. Geballe, A. Nicholls, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2010**, 240 (Meeting Abstract 280-Comp).
- [15] J. T. Bukrinsky, M. J. Bjerrum, A. Kadziola, *Biochemistry* **1998**, 37, 16555–16564.
- [16] H. M. Holden, D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1987**, 26, 8542–8553.
- [17] D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, B. W. Matthews, *Eur. J. Biochem.* **1986**, 157, 261–268.
- [18] P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Biochemistry* **1983**, 22, 4618–4624.
- [19] M. Selkti, A. Tomas, J. F. Gaucher, T. Prange, M. C. Fournie-Zaluski, H. Chen, B. P. Roques, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2003**, 59, 1200–1205.
- [20] J. F. Gaucher, M. Selkti, G. Tiraboschi, T. Prange, B. P. Roques, A. Tomas, M. C. Fournie-Zaluski, *Biochemistry* **1999**, 38, 12569–12576.
- [21] T. Takeuchi, A. Bottcher, C. M. Quezada, T. J. Meade, H. B. Gray, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 815–819.
- [22] K. J. Lee, D. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 323–326.
- [23] D. G. Hangauer, A. F. Monzingo, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1984**, 23, 5730–5741.
- [24] A. C. English, C. R. Groom, R. E. Hubbard, *Protein Eng.* **2001**, 14, 47–59.
- [25] J. Behnen, H. Koster, G. Neudert, T. Craan, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2012**, 7, 248–261.
- [26] L. Englert, K. Silber, H. Steuber, S. Brass, B. Over, H. D. Gerber, A. Heine, W. E. Diederich, G. Klebe, *ChemMedChem* **2010**, 5, 930–940.
- [27] B. W. Matthews, L. H. Weaver, W. R. Kester, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 8030–8044.
- [28] M. A. Holmes, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 623–639.
- [29] K. Morihara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 26, 656–661.
- [30] A. Biela, M. Betz, A. Heine, G. Klebe, *ChemMedChem* **2012**, 7, 1423–1434.
- [31] N. N. Nasief, H. Tan, J. Kong, D. G. Hangauer, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8283–8302.
- [32] N. N. Nasief, A. Biela, G. Klebe, D. Hangauer in *242nd ACS National Meeting & Exposition*, Denver, CO, United States, **2011**.
- [33] C. S. Leung, S. S. Leung, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4489–4500.
- [34] R. Paulini, K. Müller, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1820–1839; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1788–1805.
- [35] I. J. Bruno, J. C. Cole, J. P. Lommerse, R. S. Rowland, R. Taylor, M. L. Verdonk, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 525–537.
- [36] M. H. Abraham, G. S. Whiting, R. Fuchs, E. J. Chambers, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 291–300.
- [37] W. L. Jorgensen, J. P. Ulmschneider, J. Tirado-Rives, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 16264–16270.
- [38] M. Nakasako, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2004**, 359, 1191–1204.
- [39] D. J. Huggins, W. Sherman, B. Tidor, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 1424–1444.