

Institut für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München

# **Modellierung helikaler Transmembranproteine**

Kay-Eberhard Gottschalk

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Horst Kessler
2. apl. Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
3. apl. Prof. Dr. Luis Moroder

Die Dissertation wurde am 26.08.2002 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.10.2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1998 bis August 2002 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in Garching unter der Leitung von Prof. Dr. Kessler durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Kessler danken für die interessanten Themenstellungen, die Freiheit bei der Bearbeitung der Themen, Interesse an meiner Arbeit und uneingeschränkte Unterstützung in allen Belangen.

Mein weiterer Dank gilt:

- meiner Familie, ohne deren Unterstützung weder das Studium noch die Erstellung dieser Arbeit möglich gewesen wären,
- David Voigtländer für die schöne Zusammenarbeit während des Studiums,
- Shimon Schuldiner, Sonja Steiner-Mordoch, Hagit Yerushalmi und Misha Soskine für die Kooperationsbereitschaft, viele Diskussionen und die Gastfreundschaft in Israel
- Meinen Arbeitskreiskollegen, hier besonders Monika Goede, Eckart Planker, Christian Roelz und Georg Voll.

---

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Ziel und Aufbau der Arbeit .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Vorhersage von Proteinstrukturen .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Überblick.....	7
1.2.2. Potentialfunktionen .....	7
1.2.3. Berechnung der molekularen Dynamik .....	10
<b>1.3. Zellmembran .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Lipiddoppelschicht.....	11
1.3.2. Membranproteine .....	12
1.3.3. Faltung von helikalen Transmembranproteinen .....	13
1.3.4. Assoziation von Helices.....	15
1.3.5. Globale Suche von Helix-Helix Wechselwirkungen .....	16
<b>2. SIGNALTRANSDUKTION DES <math>\alpha_{11B}\beta_3</math> INTEGRINS. ....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Biologischer Hintergrund.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Funktion und Struktur der Integrine .....	18
2.1.2 Funktion der Transmembrandomänen .....	20
2.1.3 Modelle für Signaltransduktion .....	21
<b>2.2 Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Ergebnisse der globalen Absuche des Konformationsraumes .....	22
2.2.2 Die Konformation mit niedriger Ligandenbindungsaffinität .....	26
2.2.3 Die Konformation mit hoher Ligandenbindungsaffinität .....	31
2.2.5 Die konformationelle Änderung während der Signaltransduktion .....	35
2.2.6 Modell der Signaltransduktion mit drei Zuständen .....	36
2.2.7 Einfluss der intrazellulären Domäne auf die Signaltransduktion .....	40
<b>2.4 Zusammenfassung.....</b>	<b>41</b>

---

<b>3 DOCKING STUDIEN AN INTEGRIN <math>\alpha_V\beta_3</math></b> .....	<b>42</b>
3.1 Einleitung.....	42
3.2 Ergebnisse und Diskussion.....	44
3.3 Vergleich mit Röntgenstruktur. ....	45
3.4 Vom Liganden-basierten zum Protein-basierten rationalen Design.....	46
3.5. Die Spezifität der Interaktion .....	48
3.6 Neue Aspekte der Signaltransduktion .....	50
<b>4. MODELLIERUNG EINES 4-HELIX BÜNDELS DURCH SYSTEMATISCHES ABSUCHEN DES KONFORMATIONSRRAUMES VON HELIXPAAREN.</b> .....	<b>53</b>
4.1 Einleitung.....	53
4.2 Methode .....	53
4.3 Ergebnisse.....	55
4.4 Diskussion .....	56
<b>5. MODELLIERUNG EINES 4-HELIX-BÜNDELS MIT HILFE EINER ZUFALLSBIBLIOTHEK VON KONFORMATIONEN.</b> .....	<b>57</b>
5.1. Einleitung.....	57
5.2. Methode .....	57
5.3. Optimierung einer Teilstruktur der Oxidoreduktase .....	61
5.3.1 Generierung der Startstrukturen.....	61
5.3.2 Erzeugung der Strukturbibliothek.....	62
5.4 Ergebnisse.....	62
5.4.1 Die Struktur mit der niedrigsten Gesamt-Wechselwirkungsenergie. ....	62

---

5.4.2 Die Struktur mit der niedrigsten Helix-Helix Wechselwirkungsenergie pro Helix.....	63
5.4.3 Abhängigkeit der Rotationswinkelverteilung von der Wechselwirkungsenergie .....	64
5.4.4. Auswertung der Parameterverteilungen.....	66
<b>5.5 Diskussion der Methode .....</b>	<b>69</b>
<b>6. MODELLIERUNG DES MULTIDRUG TRANSPORTERS EMRE .....</b>	<b>71</b>
<b>6.1 Biologischer Hintergrund.....</b>	<b>71</b>
<b>6.2 Methode .....</b>	<b>73</b>
<b>6.3 Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
6.3.1 Monomer.....	75
6.3.2 Dimer .....	76
<b>6.4 Diskussion .....</b>	<b>79</b>
<b>7. HELIX-HELIX WECHSELWIRKUNGEN IN EINEM POLYTOPEN PROTEIN.....</b>	<b>80</b>
<b>7.1 Einleitung.....</b>	<b>80</b>
<b>7.2 Rotation und Lateraltranslation.....</b>	<b>83</b>
<b>7.3 Vertikaltranslation und Lateraltranslation.....</b>	<b>84</b>
<b>7.4 Translation und Kippwinkel.....</b>	<b>85</b>
<b>7.5 Relativer Beitrag der nicht-bindenden Energien.....</b>	<b>86</b>
<b>7.6 Fernwirkung der Kräfte.....</b>	<b>90</b>
<b>7.7 Diskussion .....</b>	<b>92</b>

---

<b>8. MODELLIERUNG VON TRANSMEMBRANPROTEINEN MIT HILFE VON STRUKTURDATEN NIEDRIGER AUFLÖSUNG .....</b>	<b>93</b>
<b>8.1 Einleitung.....</b>	<b>93</b>
<b>8.2. Methode .....</b>	<b>94</b>
<b>8.3. Ergebnisse.....</b>	<b>95</b>
8.3.1 Betrachtung der niedrigsten Energie.....	95
8.3.2 Betrachtung der Energieverteilungen .....	97
<b>8.4 Diskussion .....</b>	<b>97</b>
<b>9. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>99</b>
<b>10. RECHENMETHODEN .....</b>	<b>101</b>
<b>10.1 Globale Suche des Konformationsraumes der Integrine .....</b>	<b>101</b>
<b>10.2 Docking Studien an Integrin <math>\alpha_v\beta_3</math>.....</b>	<b>102</b>
10.2.1 Homologie Modelling .....	102
10.2.2 Docking des Inhibitors.....	103
<b>10.3. Modellierung des 4-Helixbündels der Cytochrome C Oxidase durch Aufteilung in Helixpaare. ....</b>	<b>103</b>
<b>10.4 Erstellung einer Zufallsbibliothek von Konformationen eines Helixbündels .....</b>	<b>103</b>
<b>10.5 Dimerisierung von EmrE .....</b>	<b>104</b>
<b>10.6 Helix-Helix-Wechselwirkungen in Bakteriorhodopsin .....</b>	<b>105</b>
<b>10.7 Modellierung transmembraner Proteine mit Strukturdaten niedriger Auflösung.....</b>	<b>105</b>
<b>11. LITERATUR.....</b>	<b>106</b>



---

## **1 Einleitung**

### **1.1 Ziel und Aufbau der Arbeit**

Membranproteine bilden eine wichtige Klasse von Proteinen, deren Struktur und Dynamik noch wenig verstanden ist. Experimentelle Schwierigkeiten verhindern oft, hochaufgelöste Strukturen von Transmembran (TM) - Proteinen zu erhalten. Ziel dieser Arbeit ist es, Verfahren zu entwickeln und anzuwenden, welche die Strukturvorhersage von Transmembranproteinen mit Hilfe von Computermethoden ermöglichen.

Die Arbeit gliedert sich dabei in mehrere Kapitel mit steigender Komplexität. Zuerst wird ein Helix-Dimer betrachtet und mit Hilfe einer bekannten Methode, der systematischen Absuche des Konformationsraumes eines Helix-Dimers, die Signaltransduktion eines Integrin-Subtypes berechnet. Daraufhin wird versucht, dieselbe Methode auf ein Vier-Helix-Bündel anzuwenden, um dann eine neue, geeignetere Methode vorzustellen. Diese Methode wird auf den Transporter EmrE angewendet. Weiterhin wurde untersucht, inwieweit Helix-Helix Wechselwirkungen die Konformation polytooper TM-Proteinen bestimmen. Diese Erkenntnis wurde genutzt, um mit Hilfe von Strukturdaten niedriger Auflösung die Konformationen komplexer TM-Proteine zu berechnen.

Jedes Kapitel dieser Arbeit enthält eine eigene Einleitung, Vorstellung der Methode und Diskussion, so dass jedes Kapitel, wenn auch auf das vorhergehende aufbauend, für sich steht und einzeln verständlich ist. Rechentechnische Details sind in einem eigenen Kapitel am Ende der Arbeit zusammengefasst.

---

## 1.2. Vorhersage von Proteinstrukturen

### 1.2.1. Überblick

Seit über 30 Jahren wird versucht, die Struktur eines Proteins anhand der Aminosäuresequenz vorherzusagen. Die grundlegende Idee ist, dass die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch die Sequenz festgelegt ist, wobei die endgültige Struktur des Proteins das Minimum der freien Energie repräsentiert. Darüber hinaus ist bekannt, dass Hilfssubstanzen (Chaperone) häufig eine Rolle bei der Proteinfaltung spielen und eventuelle Fehlfaltungen korrigieren. Die Aminosäuresequenz zusammen mit dem umgebenden Medium enthält also alle Informationen für die dreidimensionale Struktur.<sup>[1]</sup>

Es sollte daher prinzipiell möglich sein, an Hand einer gegebenen Aminosäuresequenz die Proteinstruktur vorherzusagen. Die Vieldimensionalität des Systems verhindert jedoch, *ab-initio*-Rechnungen an Proteinen durchzuführen. Auch vereinfachte Methoden wie *molecular dynamics* Simulationen scheitern sowohl an der hohen Komplexität der Problemstellung als auch an experimentellen Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der benötigten Parameter. Die erfolgreichsten Methoden zur Vorhersage von Proteinstrukturen sind deshalb "*knowledge based*". Sie beruhen auf einer Kombination von Statistik, empirischen Regeln und theoretischen Modellen.<sup>[2-4]</sup>

Diesen Modellen ist gemeinsam, dass die Energie des Systems durch Potentialfunktionen beschrieben werden muss.

### 1.2.2. Potentialfunktionen

Der direkte Weg zu einer das System beschreibenden Energie wäre, das quantenmechanische Problem für das betrachtete System näherungsweise, z.B. in der Born-Oppenheimer Näherung zu lösen. Durch die Komplexität der biologischen Makromoleküle ist dies jedoch nicht möglich. Deswegen werden empirische Potentialfunktionen zu Hilfe genommen.

Die empirischen Potentialfunktionen teilen die Gesamtenergie des Systems in einzelne Terme auf, die typischerweise nichtbindende und bindende Wechselwirkungen beschreiben. Die Gewichtung dieser Terme wird empirisch und

theoretisch bestimmt. Als Kraftfeld wird die Gewichtung und mathematische Beschreibung dieser Terme bezeichnet. Verschiedene Kraftfelder haben unterschiedliche Gewichtungen und beschreiben die Systeme jeweils anders.<sup>[5, 6]</sup> Im Folgenden werden die Terme eines typischen Kraftfeldes (CHARMM)<sup>[7]</sup> dargestellt.

### 1.2.2.1. Nichtbindende Wechselwirkungen

Die nichtbindenden Wechselwirkungen der Atome in einem Protein setzen sich aus einem van-der-Waals Term und einem elektrostatischen Term zusammen.

Der van-der-Waals Term wird meist durch ein Lennard-Jones Potential beschrieben:

$$(1.1) \quad V_{\text{van-der-Waals}} = \sum_{\substack{\text{nicht-gebundene} \\ i,j\text{-Paare}}} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right]$$

Der elektrostatische Term hat die Form:

$$(1.2) \quad V_{\text{elektrostatisch}} = \sum_{\substack{\text{nicht-gebundenen} \\ i,j\text{-Paare}}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r}$$

Hierbei sind  $r$  der Abstand der Atompaare,  $\epsilon_{ij}$  die Tiefe des Potentialtopfes,  $\sigma_{ij}$  der Lennard-Jones Durchmesser der Atome,  $q_i$  die Ladung der Atome und  $\epsilon$  die dielektrische Konstante des umgebenden Mediums.

Für intramolekulare Wechselwirkungen werden nur Atome, die mehr als drei Bindungen voneinander entfernt sind, berücksichtigt.

### 1.2.2.2 Bindende Wechselwirkungen

Bindungen werden meist durch ein einfaches harmonisches Potential modelliert. Besonders für einfache Moleküle werden aber auch komplexere Funktionen wie die Morse-Funktion gewählt.

Die harmonische Näherung ist bei Proteinen angemessen, da die Bewegungen in Proteinen bei definierter Temperatur stattfinden und sich Bindungslängen und –winkel nahe des Gleichgewichtswertes befinden.

Der Term für Bindungswechselwirkungen ist:

$$(1.3) \quad V_{\text{Bindung}} = \sum_{\substack{\text{gebundene} \\ \text{Atompaare}}} \frac{1}{2} K_b (b - b_0)^2$$

Hier sind  $b$  die Bindungslänge,  $K_b$  die Kraftkonstante und  $b_0$  der Gleichgewichtsabstand der gebundenen Atompaare.

Zur hinreichenden Beschreibung der Bindungswinkel ist im allgemeinen ein einfaches harmonisches Potential ausreichend:

$$(1.4) \quad V_{\text{Winkel}} = \sum_{\text{Bindungswinkel}} \frac{1}{2} K_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

Hierbei sind  $\theta$  der Bindungswinkel zwischen den den Winkel bestimmenden Atomen,  $K_\theta$  die Kraftkonstante und  $\theta_0$  der Gleichgewichtswert des betrachteten Winkels.

Behinderte Rotation um Einfachbindungen oder Bindungen mit Doppelbindungsanteil können mit den bisher besprochenen Termen nicht gut beschrieben werden, so dass es in der Regel nötig ist, explizit ein Torsionswinkelpotential mit angepasster Rotationssymmetrie und Energiebarriere einzuführen. Gewöhnlich wird dafür eine nach dem ersten Term abgebrochene Kosinus-Reihenentwicklung gewählt. Die Summe über alle Dihedralwinkel in einem großen System ist dann:

$$(1.5) \quad V_{\text{Torsion}} = \sum_{\text{Dihedralwinkel}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)]$$

$\phi$  ist der Dihedralwinkel,  $K_\phi$  seine Kraftkonstante,  $n$  seine Multiplizität und  $\delta$  die Phase.

Eine typische Potentialfunktion ergibt sich als Summe aus den oben erwähnten Termen mit freien Parametern  $\omega_i$ :

$$(1.6) \quad V_{\text{total}} = \omega_B V_{\text{Bindung}} + \omega_W V_{\text{Winkel}} + \omega_{\text{vdw}} V_{\text{vdw}} + \omega_e V_{\text{elektrostat}} + \omega_T V_{\text{Torsion}}$$

Die Parameter  $\omega_i$  werden durch Vergleich von Messwerten und theoretischen Vorhersagen optimiert. Verschiedene Kraftfelder unterscheiden sich in den Parametern  $\omega_i$  und in der mathematischen Beschreibung der Kraftterme  $V_i$ .

Je nach Problemstellung können weitere Terme wie z.B. Kopplungen, *NMR-restraints* o.ä. eingeführt werden. Wasserstoffbrückenbindungen sind meist implizit in diesem Ansatz enthalten.<sup>[8,9]</sup>

### 1.2.3. Berechnung der molekularen Dynamik

In einer MD- (*molecular dynamics*) Simulation werden die klassischen Newton'schen Bewegungsgleichungen für das betrachtete System mit Vorgabe gewisser Anfangsbedingungen numerisch integriert. Man erhält dabei die Atompositionen und Geschwindigkeiten der Teilchen als eine Funktion der Zeit.<sup>[7]</sup>

$$(1.7) \quad m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = -\nabla_i [U(r_1, r_2, \dots, r_N)]$$

$$i = 1, N$$

#### Anfangsbedingungen:

$$(1.8) \quad r_i(t=0) = x_i^0 \text{ (Ort)}$$

$$(1.9) \quad \frac{d}{dt} r_i(t=0) = v_i^0 \text{ (Geschwindigkeit)}$$

In Gleichung 1.7 stehen  $m_i$  für die Masse und  $r_i$  für die Position eines Teilchens.  $U(r_1, r_2, \dots, r_N)$  ist die Potentialenergie des Systems. Sie ist abhängig von der Position der  $N$  Teilchen. In Gleichung 1.8 ist  $x_i^0$  die Position zur Zeit null und in Gleichung 1.9  $v_i^0$  die Geschwindigkeit zur Zeit null.

Für die Simulation von Biopolymeren, wie z.B. Proteinen, muss eine realitätsnahe Anfangsposition der einzelnen Atome vorgegeben werden (Anfangsbedingung Gleichung 1.8). Dies kann erfolgen durch Vorgabe einer Kristall- oder NMR-Struktur des gleichen oder eines homologen Proteins. Den Atomen werden dann Anfangsgeschwindigkeiten (Anfangsbedingung Gleichung 1.9) durch eine Maxwell-Verteilung bei gewählten Temperaturen zugeordnet. Normalerweise liegt die Anfangstemperatur nahe 0 K und wird langsam durch Neuordnung der Geschwindigkeiten auf den Wert gebracht, bei dem das System simuliert werden soll. Dieser Aufheizvorgang wird als *simulated annealing* bezeichnet.<sup>[7, 10]</sup>

### 1.3. Zellmembran

Da sich die vorliegende Arbeit vorwiegend mit transmembranen (TM) Proteinen beschäftigt, werden hier kurz die Eigenschaften des umgebenden Mediums, der Membran, vorgestellt.

#### 1.3.1. Lipiddoppelschicht

Die grundlegende Struktur einer Zellmembran wird am besten durch eine Lipiddoppelschicht beschrieben.

Lipide sind Substanzen biologischen Ursprungs, die in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser jedoch nur sehr schlecht löslich sind. Der Hauptbestandteil der Lipidfraktion sind die sogenannten Glykophospholipide. Glykophospholipide sind amphiphile Moleküle mit einem polaren, phosphoryliertem Kopf und unpolaren, aliphatischen Ketten.

Eine weitere häufig vertretene Gruppe von Membranlipiden sind die Sphingolipide. Sphingolipide sind Derivate der C<sub>18</sub> Aminoalkohole Sphingosin, Dihydrosphingosin und ihrer C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>19</sub> und C<sub>20</sub> Homologen.

Eine wichtige Eigenschaft der Zellmembran ist die Tatsache, dass sie für geladene Moleküle nahezu undurchdringbar ist. Zellmembranen sind zweidimensionale Flüssigkeiten. Oberhalb einer bestimmten Temperatur können die Lipidmoleküle innerhalb einer Schicht frei diffundieren, wobei sie normalerweise nicht in die gegenüberliegende Lipidschicht wechseln.<sup>[11]</sup>

### 1.3.2. Membranproteine

Ungefähr 50% der Masse der meisten natürlichen Membranen besteht aus Proteinen. Der Massenanteil an Proteinen variiert je nach Funktion der Membran erheblich.

Membranproteine werden anhand der Festigkeit ihrer Bindung an die Membran klassifiziert:

Integrale Proteine sind durch hydrophobe Kräfte fest an die Membran gebunden und können nur durch Zerstörung der Membran von dieser getrennt werden. Sie durchdringen die Membran.

Periphere Proteine können durch relativ milde Vorgehensweise von der Membran getrennt werden. Die Membran bleibt hierbei intakt. Sie sind nur mit der Oberfläche der Membran assoziiert.

Im Folgenden werden integrale Proteine näher behandelt.

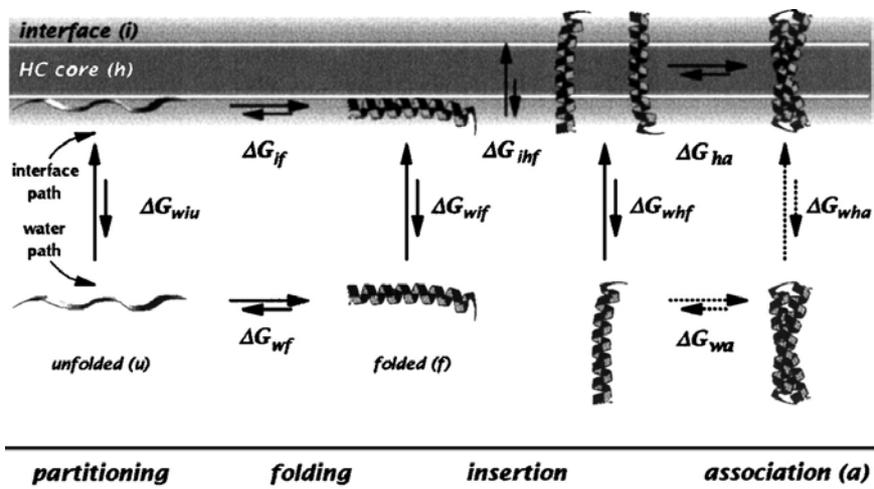
Membranproteine haben eine amphipatische Struktur. Sie haben polare Oberflächen, die mit wässriger Lösung oder den polaren Kopfgruppen der Doppelschicht wechselwirken, und unpolare Regionen, die mit den aliphatischen Ketten in Kontakt treten. Einige der integralen Membranproteine finden sich nur auf einer Seite der Membran, während andere, die sogenannten Transmembran (TM)-Proteine, die Membran durchspannen. Es gibt zwei verschiedene Arten von Transmembranproteinen, die sich in ihrer Sekundärstruktur unterscheiden: helikale TM-Proteine und aus Faltblättern bestehende  $\beta$ -barrels. Beide Faltungen erlauben ein Absättigen der polaren Rückgradamino- oder -carboxylgruppen. Im Weiteren beschränkt sich diese Arbeit auf helikale TM-Proteine.

Membranproteine spielen eine wesentliche Rolle für dynamische Prozesse der Membran. Zu den Aufgaben dieser Proteine gehören die Signaltransduktion durch die Zellmembran, der Stofftransport und die Regulierung der Zellfusion.<sup>[11]</sup>

### 1.3.3. Faltung von helikalen Transmembranproteinen

Die Modellierung von Transmembranproteinen setzt ein fundiertes Verständnis ihres Faltungsweges voraus. Das Verständnis der Faltung kann zu Vereinfachung der Berechnungen und zu einer Reduzierung der Freiheitsgrade führen.

Man kann die Faltung von helikalen TM Proteinen in einem 4-stufigen thermodynamischen Model beschreiben (Abb. 1.1).<sup>[12]</sup>

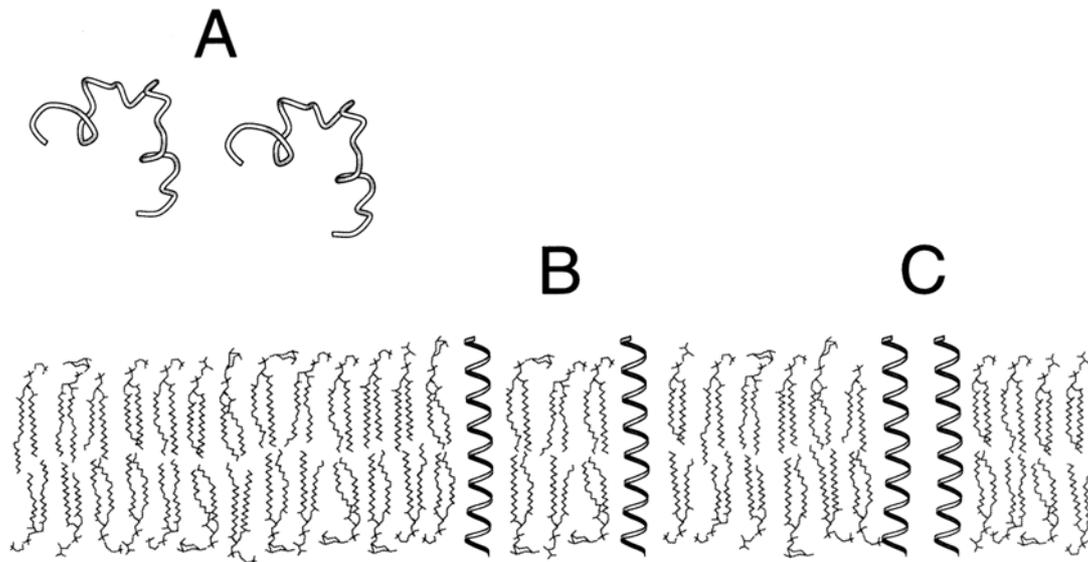


**Abbildung 1.1:** 4-Stufen Mechanismus der Faltung eines transmembranen Proteins: Im ersten Schritt findet eine Partitionierung des hydrophoben Peptides zwischen Wasser- und Membranphase statt. Daraufhin faltet sich das Peptid in eine Helix und wird insertiert. Im letzten Schritt assoziieren verschiedene Helices in der Membran. Abbildung aus <sup>[12]</sup>

Der erste Schritt besteht aus der Partitionierung der hydrophoben Peptide zwischen wässriger und organischer Phase (Membran). Hierbei liegt das Gleichgewicht auf der Seite der organischen Phase. Zur Absättigung der polaren Carbonyl- und Aminogruppen wird eine Helix gebildet. Diese Helix insertiert dann in die Membran. Im letzten Schritt assoziieren verschiedene Helices eines polytopen Membranproteins, um die finale, gepackte Struktur zu ergeben.

Der konzeptionelle Vorteil dieser Betrachtungsweise für das Modelling liegt darin, dass nur der letzte Schritt, die Assoziation verschiedener Helices zum gepackten Protein, nachvollzogen werden muss. Dies drückt sich im Zwei-Stufen Modell von Popot und Engelman aus.<sup>[13]</sup> In der ersten Stufe führt die Einführung des

hydrophoben Proteinsegments in die Membran zu stabilen Transmembranhelices. Diese verhalten sich wie autonome Faltungseinheiten, die aus energetischen Gründen weder die Lipiddoppelschicht verlassen, noch sich entfalten können. Die zweite Phase des Modells besteht aus der lateralen Assoziation dieser Helices. Spezifische Wechselwirkungen zwischen den Helices sind verantwortlich für die resultierenden tertiären und quartären Strukturen (Abb. 1.2).



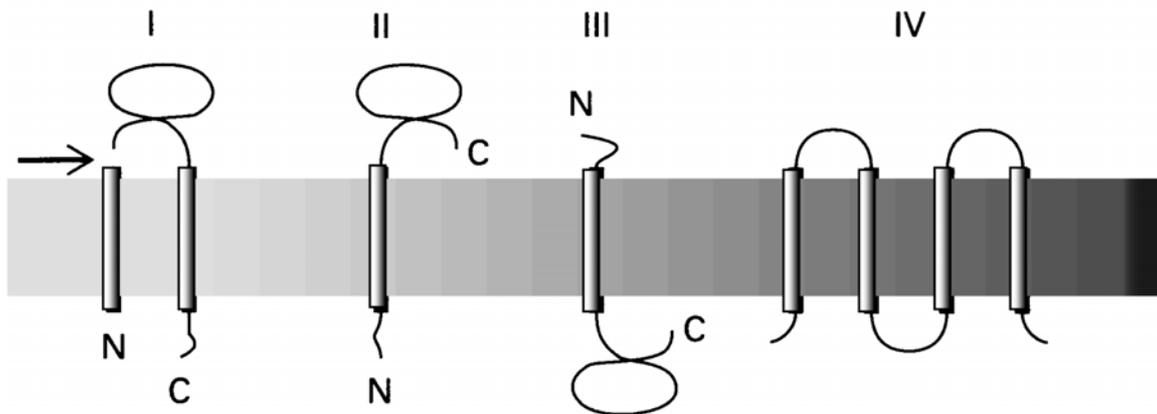
**Abbildung 1.2:** Mögliche Zustände des hydrophoben Teils eines Transmembranproteins

Das wassergelöste, nicht gefaltete Molekül (A) wird als  $\alpha$ -Helix in die Membran eingeföhrt (B). Anschließend werden höhergeordnete ternäre Strukturen gebildet (C).<sup>[13]</sup>

Faktoren, die die Bildung der Komplexe steuern, sind Wasserstoff-Brückenbindungen, Ionenpaare sowie Packungsunterschiede, die sowohl Lipid/ Protein- als auch Protein/ Protein- Kontakte beinhalten. Auch Einflüsse von außerhalb der Membran spielen eine Rolle bei der Assoziation der Transmembransegmente.<sup>[13,</sup>

<sup>14]</sup> Die möglichen Wechselwirkungen sind durch die Membranumgebung und topologischen Gegebenheiten der Polypeptide beschränkt. Die topologische Disposition wird durch den biologischen Einbau bestimmt.<sup>[15, 16]</sup> Klasse I Proteine haben am N-Terminus ein Signal-Peptid, das abgespalten wird. So wird ein neuer N-Terminus an der nicht-zytoplasmatischen Seite der Membran geschaffen (Abb. 1.3). Klasse II und III Proteine haben ein hydrophobes Signal-Peptid am N-Terminus, welches nicht abgespaltet wird. Die beiden Klassen haben unterschiedliche

Polaritäten. Klasse IV schließt alle Proteine mit mehr als einem Transmembransegment ein.<sup>[17, 18]</sup>



**Abbildung 1.3: Topologie integraler Membranproteine** Klasse I Proteine haben am N-Terminus ein Signal-Peptid, das abgespalten wird (Pfeil). So wird ein neuer N-Terminus an der nicht-zytoplasmatischen Seite der Membran geschaffen.

Klasse II und III Proteine haben nur ein einziges hydrophobes Signal-Peptid am N-Terminus, welches nicht abgespalten wird. Die beiden Klassen haben unterschiedliche Polaritäten. Klasse IV schließt alle Proteine mit mehr als einem Transmembransegment ein

Durch die Anisotropie der Membran-Umgebung und die Beschränkung auf Helices wird die Anzahl der Freiheitsgrade erheblich eingeschränkt, das Modelling also vereinfacht.

#### 1.3.4 Assoziation von Helices

Energetisch kann die Assoziation der Helices wie folgt beschrieben werden (Gl. 1.10).<sup>[12]</sup>

$$(1.10) \quad \Delta G_{\text{ha}} = \Delta G_{\text{H-H}} + \Delta G_{\text{H-L}} + \Delta G_{\text{L-L}} + \Delta G_{\text{H-Cofaktor}}$$

$\Delta G_{\text{ha}}$  ist die Änderung der freien Energie durch Helix-Assoziierung,  $\Delta G_{\text{H-H}}$  der Beitrag zu dieser Energieänderung, der von Helix-Helix Wechselwirkungen stammt,  $\Delta G_{\text{H-L}}$  der Beitrag, der von Helix-Lipid Wechselwirkungen stammt,  $\Delta G_{\text{L-L}}$  der Beitrag der Lipid-Lipid Wechselwirkungen und schließlich optional  $\Delta G_{\text{H-cofaktor}}$ , ein Term, der

die Wechselwirkung zwischen TM Helices und Cofaktoren wie dem Retinal beim Bakteriorhodopsin beschreibt.

Durch Messungen von  $\Delta G$  – Werten der Assoziation verschiedener Mutanten von Glykophorin A (GpA) in unterschiedlichen Detergentien konnte gezeigt werden, dass die Helix-Helix Wechselwirkungen tatsächlich von den Helix-Lipid Wechselwirkungen separiert werden können.<sup>[19]</sup> Das bedeutet, dass für Modellierungstudien die Membran nicht unbedingt berücksichtigt werden muss. Dies gilt nicht für Loop-Strukturen, die in der Lipid-Wasser Grenzschicht liegen und im starken Maße von der spezifischen Umgebung geprägt werden.

### 1.3.5. Globale Suche von Helix-Helix Wechselwirkungen

Ein systematisches Absuchen des Konformationsraumes zweier Helices hat sich als wertvolles Hilfsmittel zur Strukturvorhersage von transmembranen Dimeren herausgestellt. Mit Hilfe dieses Verfahren konnte die Struktur des homo-dimeren

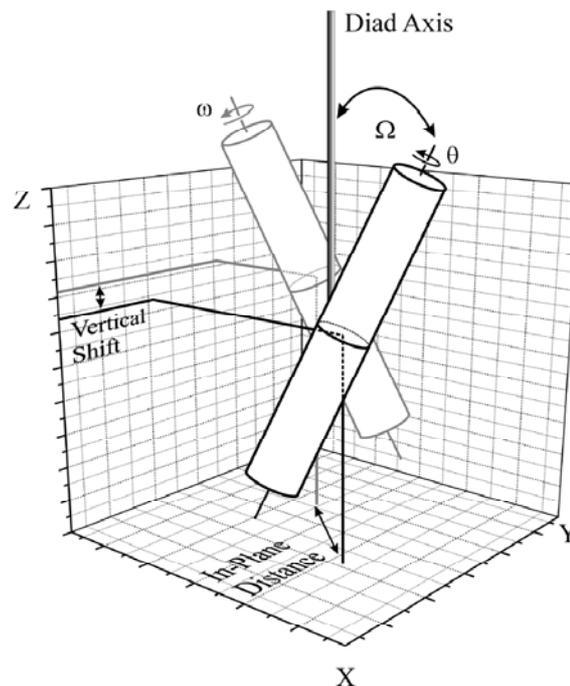


Abbildung 1.4: Die Freiheitsgrade eines Helix-Dimers.

Während des Absuchens des Konformationsraumes werden  $\omega$  und  $\theta$  in  $45^\circ$  Schritten von  $0^\circ$  bis  $360^\circ$  inkrementiert. Es werden zwei verschiedene  $\Omega$ -Werte ( $25^\circ$  und  $-25^\circ$ ) vorgegeben. Während der Simulation werden alle Freiheitsgrade freigegeben. Nur der maximale Abstand zwischen den geometrischen Zentren der Helices wird auf  $10.4 \text{ \AA}$  begrenzt.

---

Transmembranprotein Glykophorin A (GpA) richtig vorhergesagt werden.<sup>[20]</sup> Es werden die strukturellen Parameter eines Helix-Dimers systematisch verändert.

Die Freiheitsgrade eines Helix-Dimers sind in Abbildung 1.4 dargestellt. Durch systematisches Verändern von  $\omega$  und  $\theta$  werden verschiedene Strukturen erzeugt, die als Startstrukturen für *simulated annealing/molecular dynamics* (SA/MD) dienen. Wenn von verschiedenen Startstrukturen sehr ähnliche Endstrukturen generiert werden, sind diese Endstrukturen in einem lokalen Minimum. Durch Ungenauigkeiten der Kraftfelder, Vernachlässigung der Membranumgebung und die hohe Anzahl der Freiheitsgrade werden bei einer solchen Konformationsraum-Suche keine eindeutigen Lösungen gefunden, d.h. mehr als eine Struktur mit ähnlichen Wechselwirkungsenergien wird gefunden. Daher kann die Energie nicht alleine als Unterscheidungskriterium dienen.<sup>[20-22]</sup> Es werden entweder experimentelle Daten oder andere Wege benötigt, um die verschiedenen Endstrukturen voneinander zu unterscheiden und die native Struktur herauszufiltern. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine parallele Suche von homologen Sequenzen dazu dienen kann, bei allen Sequenzen konservierte Strukturen zu finden. Diese konservierten Strukturen entsprechen der nativen Struktur.<sup>[23]</sup>

## 2. Signaltransduktion des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrins.

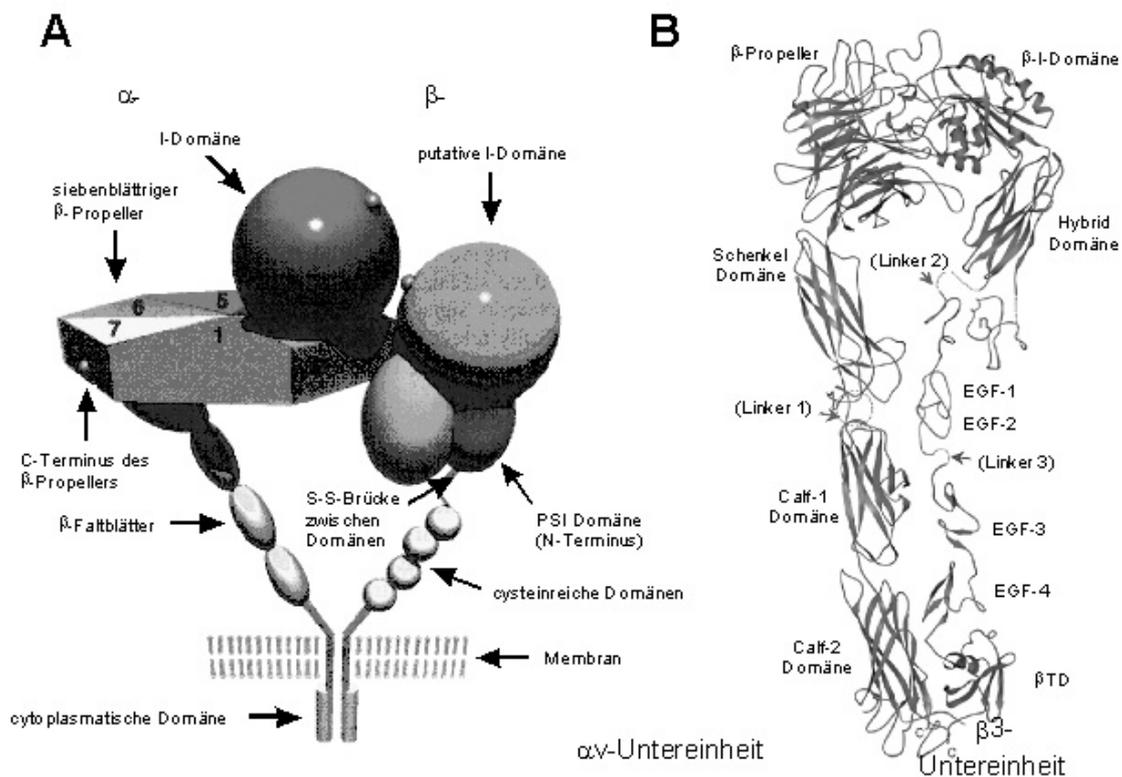
### 2.1 Biologischer Hintergrund

#### 2.1.1 Funktion und Struktur der Integrine

Signal-Transduktion durch die Zellwand lässt die Zelle mit ihrer Umgebung kommunizieren. Die Transduktion wird durch transmembrane Rezeptoren vermittelt und beinhaltet meist eine konformationelle Änderung des Rezeptormoleküls. Die genaue Natur der konformationellen Änderungen ist im Wesentlichen unbekannt.<sup>[24]</sup> Eine Familie dieser transmembranen Rezeptoren sind die Integrine. Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Zell-Matrix Adhäsion und der Signaltransduktion durch die Zellmembran. Sie bilden nicht-kovalent gebundene Heterodimere bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Abbildung 2.1). Jedes Monomer besteht aus einer großen, extrazellulären Domäne, einer transmembranen Helix und einer kleinen intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist in weitere Subdomänen unterteilt. Bei einigen Subtypen hat die  $\alpha$ - Untereinheit weiterhin eine I (oder *inserted*) –Domäne.<sup>[25]</sup>

Durch zwei Mechanismen, genannt *inside-out* und *outside-in* Signalweg, können zelluläre Ereignisse die Affinität von Integrinen zu Liganden regeln. Im Fall des *inside-out* Signalwegs kontrollieren intrazelluläre Proteine die Affinität des Integrins zu extrazellulären Liganden. Nach Anbindung der intrazellulären Proteine an das Integrin kommt es zu einer konformationellen Änderung des Integrins, welche die relative Orientierung der Integrin-Untereinheiten zueinander ändert. Die strukturelle Änderung wird durch die Membran nach außen weitergeleitet. Dieses Signal steigert die Affinität des Integrins für extrazelluläre Liganden.<sup>[25-29]</sup>

Im Fall des *outside-in* Signalweges bilden sich nach Anbindung extrazellulärer Liganden Cluster von mehreren Integrinen. Die Anhäufung von Integrinen auf der Zelloberfläche führt zu einer Reihe intrazellulärer Ereignisse wie zum Beispiel Anbindung der Integrine an das Zytoskelett, zur Migration oder zur Veränderung der Zellform.<sup>[30-32]</sup>



**Abbildung 2.1:** A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine. Die  $\alpha$ -Untereinheit enthält einen sieben-blättrigen  $\beta$ -Propeller und meist eine I-Domäne, die auch für die  $\beta$ -Untereinheit postuliert wird. B) Angepasste Röntgenstruktur des extrazellulären Teils von  $\alpha_v\beta_3$  mit 4 Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit und 8 Domänen der  $\beta$ -Untereinheit.

Die Bedeutung der extra- und der intrazellulären Domänen für Signalweiterleitung und Ligandenbindung ist in vielen Studien demonstriert worden.<sup>[33-36]</sup>

Die transmembranen Integrindomänen jedoch sind nicht in einem ähnlichem Ausmaß untersucht worden.

Die Struktur der intrazellulären Domäne von  $\alpha_{11b}$  ist mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gelöst worden.<sup>[37, 38]</sup> Durch Röntgenstrukturanalyse ist die Struktur der I-Domäne von Integrin  $\alpha_2\beta_1$  alleine und im Komplex mit einer Kollagen-Triple-Helix aufgeklärt worden.<sup>[28]</sup> Die strukturellen Änderungen beim Bindungsvorgang geben einen Hinweis auf Affinitätsregulierung und Signal-Transduktion. Auch die Strukturen der extrazellulären Domänen von  $\alpha_v\beta_3$  sind mit und ohne Ligand bekannt (Abbildung 2.1).<sup>[39, 40]</sup> Durch Fehlen der Transmembransegmente wurde hier

allerdings eine Struktur eingenommen, die im Gegensatz zu EM Aufnahmen steht: die linearen Abschnitte unterhalb des  $\beta$ -Propellers der  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta$ I-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit sind in der Röntgenstruktur geknickt, bei den EM Bildern hingegen gestreckt.

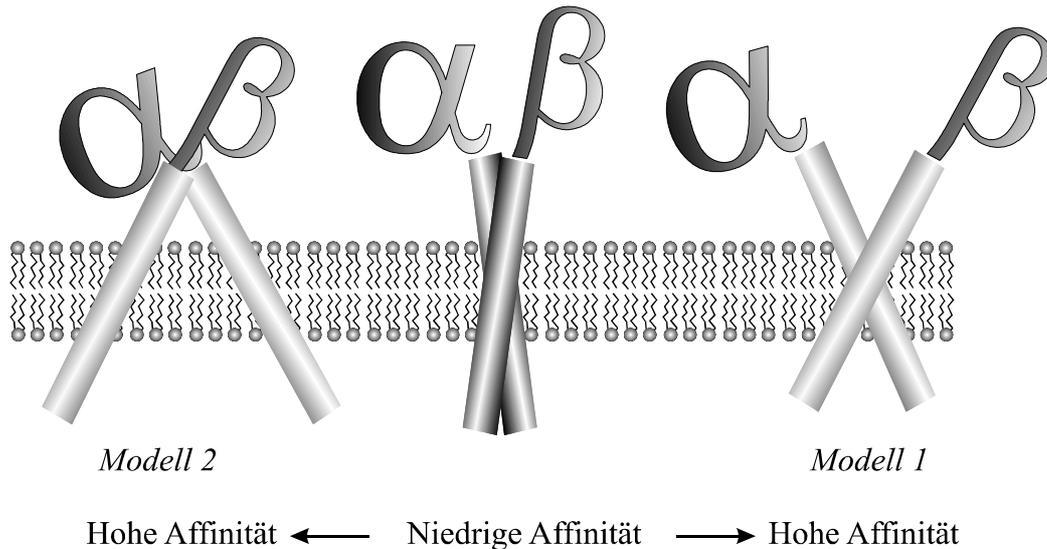
### 2.1.2 Funktion der Transmembrandomänen

Es wird angenommen, dass die transmembrane (TM) Domäne wichtig für die Integrin-Dimerisierung und die nachfolgende Signalweiterleitung ist. Obwohl bekannt ist, dass Integrine auch ohne TM Domäne dimerisieren können, ist die Effizienz der Dimerisierung herabgesetzt.<sup>[41]</sup> Eine rekombinante, lösliche Form von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ohne TM Domäne nimmt eine aktive, liganden-bindende Konformation ein, während der Grundzustand des Wildtyp-Proteins niedrige Ligandenbindungsaffinität aufweist.<sup>[42]</sup> Zwei Modell-Konstrukte konnten keine Wechselwirkungen zwischen den intrazellulären Abschnitten nahe der Membran direkt durch NMR nachweisen.<sup>[43, 44]</sup> In der einen Studie ist die Transmembrandomäne durch ein lösliches Helixpaar ersetzt worden, das bekanntermaßen eine *coiled-coil* Struktur einnimmt. Es konnten weder Sekundär- noch Tertiärstrukturelemente gefunden werden.<sup>[43]</sup> Eine andere NMR-Studie hingegen untersuchte nur die zytoplasmatische Domäne von  $\alpha_{IIb}$  in Assoziation mit einer die Membran nachahmenden Mizelle und konnte die Struktur dieses Peptides als helikal aufklären. Der strukturinduzierende Effekt der Membran scheint also wichtig zu sein.<sup>[38]</sup> Allerdings konnte Dodecylphosphocholin (DPC) als ein Membranmimetikum keine Wechselwirkungen induzieren.<sup>[44]</sup> Es ist wahrscheinlich, dass DPC die Interaktion zwischen den transmembranen Helices unterbindet. Durch *protein engineering* Studien am gesamten Integrin wurde gezeigt, dass die intrazellulären Proteinabschnitte nahe der Membran als *coiled-coil* Helixpaar interagieren und das Integrin inaktivieren.<sup>[45]</sup> Weiterhin wurde nachgewiesen, dass sich nahe der Membran eine Salzbrücke ausbildet, die das Integrin im inaktiven Zustand blockiert.<sup>[46]</sup> Die räumliche Nähe der Seitenketten der Salzbrücke impliziert ebenfalls eine räumliche Nähe der transmembranen Helices. Auch mit Massenspektroskopie, Terbium Luminiszenz und Oberflächen Plasmonen Resonanz wurden Wechselwirkungen zwischen den zytosolischen Abschnitten nahe den TM Domänen gezeigt.<sup>[47-49]</sup> Darüber hinaus sind verschiedene Krankheiten mit

Mutationen in TM Bereichen verknüpft.<sup>[50]</sup> Die Summe dieser Daten deutet auf eine aktive Rolle der TM Domänen bei der Dimerisierung und Signaltransduktion hin.

### 2.1.3 Modelle für Signaltransduktion

Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurden zwei Modelle für die Integrin-vermittelte Signaltransduktion vorgeschlagen (Abbildung 2.2).<sup>[26, 51, 52]</sup>



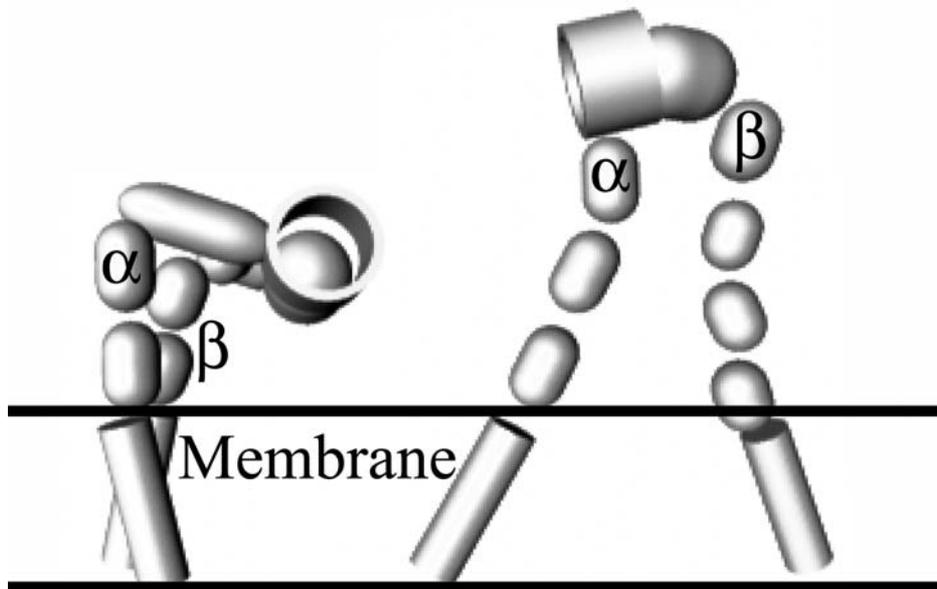
**Abbildung 2.2: Modelle für Signaltransduktion.**

Während in *Modell 1* die TM Abschnitte assoziiert bleiben, ist in *Modell 2* der Drehpunkt näher an den Integrin Kopfgruppen und die TM Regionen werden getrennt. Durch die hohe Viskosität der Membran ist *Modell 2* kinetisch benachteiligt. In *Modell 1* kann darüber hinaus der konformationelle Übergang durch verstärkte Wechselwirkungen zwischen den Helices im aktiven Zustand erleichtert werden.

Die Modelle stimmen darin überein, dass eine scherenartige Bewegung die Integrine aktiviert, wobei sowohl die membrannahen intra- als auch extrazellulären Abschnitte räumlich voneinander getrennt werden. Die Modelle unterscheiden sich jedoch in der Position des Drehpunktes der Bewegung: während *Modell 1* die Angel in den TM Abschnitt positioniert, platziert *Modell 2* das Gelenk näher an den Kopfgruppen der Integrine. In *Modell 2* werden dadurch die TM Regionen räumlich voneinander getrennt. Durch die hohe Viskosität der Membran ist dies kinetisch benachteiligt. Außerdem basiert *Modell 2* auf Studien, bei denen die Aktivierung nicht durch Ligandenzugabe, sondern durch Weglassen einer TM Helix erreicht wurde. Es waren

also wichtige strukturelle Einschränkungen nicht vorhanden, was möglicherweise die biologische Aussagekraft des Modells einschränkt. Daher erscheint *Modell 1* als das wahrscheinlichere.

Modell 2 wurde auf Grund der Kristallstruktur noch weiter verfeinert und kombiniert nun eine scherenartige mit einer klappmesserartigen Bewegung (Abb. 2.3).<sup>[53]</sup>



*Abb. 2.3: Kombination aus klappmesser-artiger und scherenartiger Bewegung als Modell für Signaltransduktion.*

Dieses Modell wurde aus einer Kombination der Daten der Röntgenstruktur, NMR-Untersuchungen und EM-Bildern entwickelt. Es ist nicht im Einklang mit EM-Bildern, die eine Separierung der Kopfgruppen beschreiben.

## 2.2 Ergebnisse

### 2.2.1 Ergebnisse der globalen Absuche des Konformationsraumes

Für den experimentell gut untersuchten Integrin-Subtyp  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist es möglich, an Hand der biochemischen und –physikalischen Untersuchungen die theoretischen Vorhersagen zur konformationellen Änderung zu untermauern. Daher wird im Folgenden auf diesen Subtyp im Besonderen eingegangen.

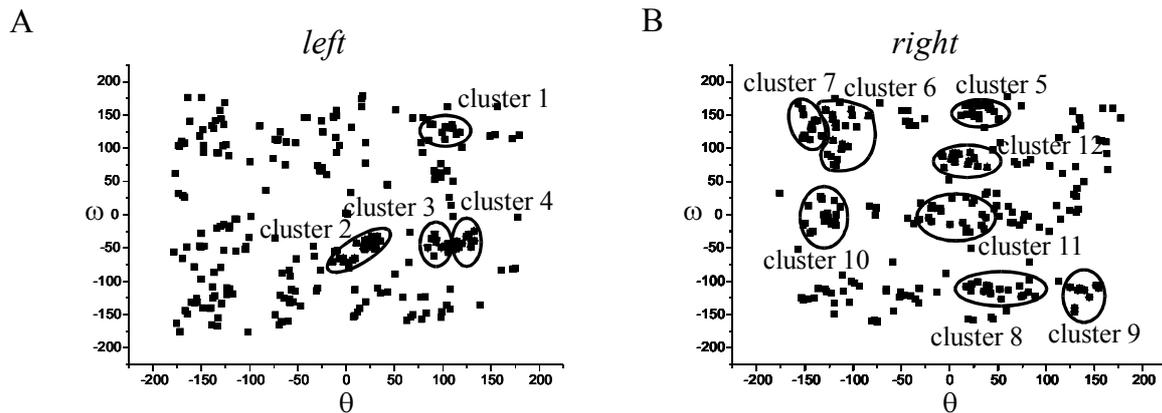


Abbildung 2.4: Verteilung der  $\omega$  und  $\theta$  Werte für das  $\alpha IIb\beta 3$  Integrin nach SA/MD:

A: Die Verteilung der Rotationswinkel (für Definition siehe Abbildung 1.3) mit einem linkshändigen Kreuzungswinkel. Es werden vier Regionen gefunden, in denen sich sehr ähnliche Strukturen befinden. Diese Regionen sind eingekreist. Die geometrischen Parameter eines jeden solchen Clusters wurden gemittelt. Im Text bezieht sich der Term ‚Cluster‘ auf die gemittelte Struktur.

B: Die Verteilung der Rotationswinkel mit einem rechtshändigen Kreuzungswinkel. Es werden acht Regionen gefunden, in denen sich sehr ähnliche Strukturen befinden.

TABELLE 2.1:

Assoziierung von Integrin Untereinheiten.

Mit X gekennzeichnete Kombinationen wurden untersucht.

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	<b>X</b>						
$\alpha 2$	X						
$\alpha 3$	X						
$\alpha 4$						X	
$\alpha 5$	X						
$\alpha 6$	X						
$\alpha 7$	X						
$\alpha D$		X					
$\alpha L$		X					
$\alpha M$		X					
$\alpha V$	X		X	X	X		X
$\alpha IIb$			X				

TABELLE 2.2:

*Minimaler RMSD in Å von Clustern anderer Subtypen zu  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .*

Darüber hinaus sind der mittlere RMSD für jedes Cluster sowie der Kreuzungswinkel für den jeweiligen Cluster von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\alpha_1\beta_1$	1.1	1.5	2.4	1.7	1.8	1.8	0.8	3.0	2.8	0.9	2.8	0.7
$\alpha_L\beta_2$	2.7	1.4	2.9	2.9	1.0	2.2	3.2	2.6	2.4	2.9	1.8	0.7
$\alpha_M\beta_2$	2.3	1.0	2.9	2.9	0.9	2.6	0.6	2.1	3.2	2.9	1.4	2.1
$\alpha_V\beta_3$	3.1	0.7	2.2	2.2	2.0	1.4	1.0	3.1	2.7	2.1	1.5	0.6
$\alpha_4\beta_7$	2.3	0.9	2.7	2.6	1.9	2.2	3.0	2.8	2.4	1.2	2.5	0.9
$\alpha_V\beta_8$	2.5	1.8	2.8	2.7	2.4	1.5	2.0	2.3	2.1	2.3	2.8	2.8
$\alpha_2\beta_1$	3.6	1.6	3.0	3.0	0.8	1.7	1.5	2.3	3.2	2.3	2.9	1.3
$\alpha_3\beta_1$	3.1	1.6	1.5	1.0	3.0	2.1	0.8	2.8	2.4	2.7	1.6	2.4
$\alpha_5\beta_1$	2.0	4.0	4.0	3.3	0.8	2.0	1.0	2.4	3.1	2.6	1.9	1.6
$\alpha_6\beta_1$	3.5	0.8	2.5	2.6	3.1	2.1	1.9	3.2	2.5	1.1	1.2	2.5
$\alpha_7\beta_1$	3.1	1.6	2.5	2.3	0.8	1.8	1.9	2.2	2.7	1.8	2.2	1.7
$\alpha_d\beta_2$	3.0	0.8	2.6	2.4	3.0	1.7	2.7	3.0	1.7	1.8	2.4	2.7
$\alpha_v\beta_1$	3.2	1.2	2.6	2.1	0.8	2.9	3.0	2.5	2.9	0.7	1.7	1.6
$\alpha_v\beta_5$	3.0	2.1	1.7	1.1	3.2	2.9	2.9	3.2	2.5	0.8	1.4	2.5
$\alpha_v\beta_6$	3.1	2.5	2.7	2.5	2.0	1.6	1.8	2.9	3.3	2.1	1.3	1.3
<b>Mittlerer RMSD</b>	<b>2.8</b>	<b>1.6</b>	<b>2.6</b>	<b>2.3</b>	<b>1.8</b>	<b>2.0</b>	<b>1.9</b>	<b>2.7</b>	<b>2.7</b>	<b>1.9</b>	<b>2.0</b>	<b>1.7</b>
$\Omega$ ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) (in Grad)	23.2	18.7	19.3	22.2	-28.6	-23.8	-12.3	-27.9	-19.8	-21.8	-14.6	-24.3

Es zeigt sich, dass bei  $\alpha_{IIb}\beta_3$  es Regionen gibt, in denen eine Häufung von gerechneten Strukturen auftreten (Abb. 2.4). Innerhalb dieser Häufungen sind die Abweichungen in den geometrischen Parametern klein, obwohl sie von unterschiedlichen Startstrukturen erhalten wurden. Es handelt sich also um strukturelle Vorzugseinstellungen. Wie in Kapitel 10.1 beschrieben, können die Häufungen zu Clustern zusammengefasst werden. Weil die Energie allein zur Validierung, welcher der Cluster der richtigen Struktur am ehesten entspricht, nicht ausreicht, wird ein weiteres Kriterium benutzt:

Da die Klasse der Integrin evolutionär, und damit auch strukturell und funktionell eng miteinander verwandt sind, sollten sich bei allen Integrinen die Cluster wiederfinden, die der gemeinsamen Struktur entsprechen, denn nur so ist der Erhalt der Funktion in den sequenziellen Varianten zu erklären. Daher wurden eine Reihe von weiteren Integrinen (Tabelle 2.1) der gleichen Rechnung unterworfen wie  $\alpha_{IIb}\beta_3$  unterworfen und dann untersucht, welcher der bei  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gefundenen Cluster in allen Integrin Subtypen erhalten sind. Diese sollten dann den realen Strukturen weitestgehend entsprechen.

---

In Tabelle 2.2 und Abb. 2.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei in Abb. 2.5 der RMSD als Abszisse dient. Je schmaler und je weiter links der Schwerpunkt der Verteilung liegt, desto wahrscheinlicher entspricht der errechnete Cluster einer wahren Struktur. Das hier beschriebene Verfahren benutzt also die Erkenntnis, dass bei der Evolution der Selektivität und der Vielfalt verschiedener Mitglieder einer Protein-Familie das strukturelle Prinzip, auf das die Funktion der Familie beruht, erhalten bleibt.

Sieben der zwölf Cluster haben einen mittleren RMSD von  $\leq 2 \text{ \AA}$  (Tabelle 2.2). Diese wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe beinhaltet alle Cluster mit einem Kreuzungswinkel von  $\Omega > 17.5^\circ$  als Kandidaten für die Konformation mit hoher Affinität zu extrazellulären Liganden, die andere alle Cluster mit einem Kreuzungswinkel  $\Omega < 17.5^\circ$  als Kandidaten für eine Konformation mit niedriger Affinität. Die Verteilungen der RMSD ist in Abbildung 2.5 gezeigt. Obwohl Cluster 2 den niedrigsten mittleren RMSD von  $1.6 \text{ \AA}$  aufweist, ist dieser Cluster nicht in allen Subtypen konserviert.  $\alpha_5\beta_1$  kann keine ähnliche Struktur bilden, die Ähnlichste hat einen RMSD von  $4.0 \text{ \AA}$ , ist also weit entfernt von der  $\alpha_{Ib}\beta_3$ -Struktur. Cluster 12 hingegen weist einen ähnlich niedrigen RMSD von  $1.7 \text{ \AA}$  auf und zeigt einen höchsten RMSD von  $2.8 \text{ \AA}$  zu  $\alpha_v\beta_8$ . Cluster 12 kann also von allen untersuchten Subtypen in ähnlicher Form angenommen werden und ist damit das höchst-konservierte Cluster.

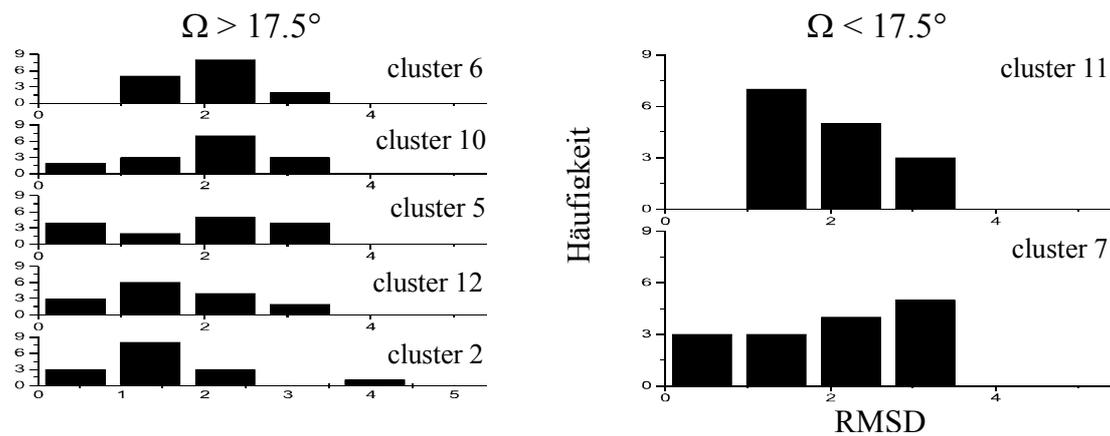


Abbildung 2.5: Histogramm von RMSD von  $\alpha_{IIB}\beta_3$  Clustern zu Clustern anderer Subtypen

Die Verteilung der RMSD- Werte von Clustern mit einem mittlerem RMSD  $\leq 2 \text{ \AA}$  ist gezeigt mit großen (links) und kleinen (rechts) Kreuzungswinkeln. Bei den großen Kreuzungswinkeln kann gesehen werden, dass Cluster 2, obwohl er den niedrigsten mittleren RMSD hat, nicht bei allen Subtypen konserviert ist. Cluster 12 hat eine sehr ähnliche Verteilung, ist aber insgesamt besser konserviert. Die anderen Cluster sind deutlich schlechter konserviert. Bei den kleinen Kreuzungswinkeln scheint Cluster 11 trotz höherem mittleren RMSD besser konserviert.

Cluster 5 hat zu höheren Werten hin verschobene RMSD, Cluster 6 und Cluster 10 sind deutlich weniger konserviert als Cluster 12.

Nur zwei Cluster mit einem Kreuzungswinkel von  $\Omega < 17.5^\circ$  werden gefunden. Beide, Cluster 7 und Cluster 11, sind zu einem ähnlichem Grad konserviert. Allerdings scheint Cluster 11, bei dem kein Subtyp hat einen RMSD über  $3.0 \text{ \AA}$  aufweist, höher konserviert, während Cluster 7 einen RMSD von  $\geq 3 \text{ \AA}$  bei drei Subtypen aufweist. Insgesamt haben also Cluster 11 und Cluster 12 die höchste Wahrscheinlichkeit, der Realität zu entsprechen. Im folgenden werden nun weitere biochemische und biophysikalische Argumente zur Validierung der Konformationen herangezogen.

### 2.2.2 Die Konformation mit niedriger Ligandenbindungsaffinität

Um die experimentellen Ergebnisse, die zu Integrinen vorliegen, mit dem Computermodell zu vergleichen, müssen noch gewisse Annahmen über die Struktur der membran-benachbarten Regionen von  $\alpha_{IIB}\beta_3$  vorgenommen werden.

Die Domänen, die die Kopfgruppen mit dem TM Segment verbinden, können auf Grund elektronenmikroskopischer Daten als linear angesehen werden.<sup>[25, 26]</sup> Auch in einer kürzlich veröffentlichten Röntgenstruktur der extrazellulären Domänen von  $\alpha_v\beta_3$  sind diese Abschnitte linear, wenn auch relativ zu den Kopfgruppen abgewinkelt.<sup>[39, 40]</sup> Diese Konformation stimmt allerdings nicht mit elektronenmikroskopischen Bildern überein. Auch sind die Kontakte in den abgewinkelten Regionen untypisch für native Protein-Protein Kontaktflächen.<sup>[39]</sup> Es gilt daher als wahrscheinlich, dass es sich bei dem Winkel um einen Kristall-Artefakt handelt.

Die Struktur der zytosolischen Domäne von  $\alpha_{IIb}$  ist in zwei Studien durch NMR gelöst worden. Einmal wurde die Struktur in 45% Trifluorethanol (TFE) gelöst,<sup>[37]</sup> in der anderen Studie myristyliert in Wasser mit DPC-Mizellen.<sup>[38]</sup> Während beide Strukturen darin übereinstimmen, dass der membran-proximale Teil helikal ist, konnte nur bei der Studie mit dem Membranmimetikum DPC auch die Struktur des nicht-helikalen Schwanzes eindeutig aufgeklärt werden. Außerdem wurden bei dieser Studie nicht nur die Struktur des Wildtypes, sondern auch einer konstitutiv aktiven Mutante gelöst, so dass strukturelle Aussagen über mögliche Aktivierungsmechanismen gemacht werden können. Im Folgenden wird daher nur mit dieser NMR-Struktur gearbeitet.

Eine Vorhersage der Sekundärstruktur von  $\beta_3$  (Abb. 2.6) zeigt, dass sich auch bei dieser Untereinheit die transmembrane Helix ins Zytosol fortsetzt. Dies steht im Einklang mit NMR Studien, die für diesen Bereich eine Helix-Propensität festgestellt haben.<sup>[43]</sup> Es können also sowohl die extrazellulären als auch die intrazellulären Abschnitte als ungefähr lineare Verlängerung der TM Helices gesehen werden.

In der Konformation, die eine niedrige Ligandenbindungsaffinität aufweist, müssen spezifische Wechselwirkungen zwischen den intrazellulären, membran-nahen Abschnitten erfolgen. Es wurde gezeigt, dass die intrazellulären Abschnitte als *coiled-coil* Helices interagieren.<sup>[45]</sup> Außerdem muss sich eine Salzbrücke zwischen 723D von  $\beta_3$  und 995R von  $\alpha_{IIb}$  bilden können.<sup>[46]</sup> Desweiteren sollte die NMR-Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit den Komplex mit der  $\beta$ -Untereinheit stabilisieren und nicht zu repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten führen.

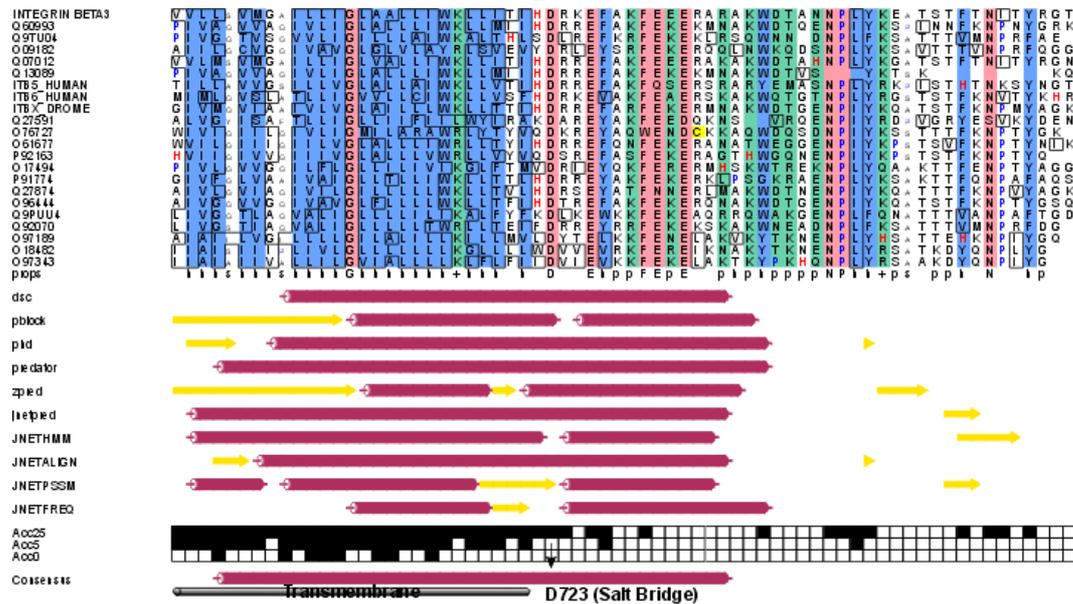
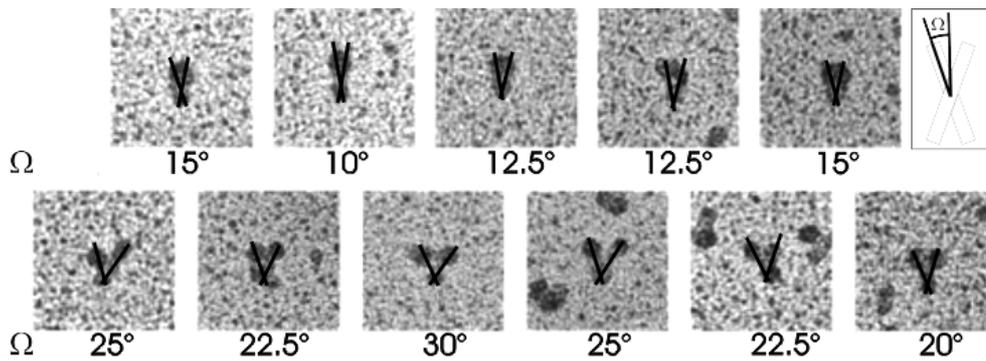


Abb. 2.6: Sekundärstruktur-Vorhersage für b3

Die Sekundärstruktur der zytosolischen Domäne von b3 wurde mit jpred vorhergesagt. Es zeigt sich, dass diese Domäne in Übereinstimmung mit NMR-Studien zu einem Grossteil helikal ist.

Der Kreuzungswinkel sollte nach den elektronenmikroskopischen Studien kleiner als  $15^\circ$  sein (Abb. 2.7).<sup>[26]</sup> Dies ist der Fall für Cluster 7 und Cluster 11. Allerdings kann sich die nachgewiesene Salzbrücke nur bei Cluster 11 ausbilden. Die NMR-Struktur von  $\alpha_{IIb}$  verknüpft mit der TM Helix von  $\alpha_{IIb}$  und die ins Zytosol als Helix verlängerte  $\beta$ -Untereinheit mit der von Cluster 11 vorgegebenen relativen Orientierung dienten als Startstrukturen von 50 MD Simulationen. Die fünf Strukturen mit bester van-der-Waals Wechselwirkung wurden gemittelt und dann minimiert. Es bildet sich eine *coiled-coil* Struktur der beiden Helices. Kontakte bestehen entlang der gesamten Länge beider Helices. Es ist mit *protein engineering* Studien gezeigt worden, dass die intrazellulären Domänen tatsächlich als *coiled-coil* wechselwirken.<sup>[45]</sup> Weitere Kontakte bilden sich zwischen dem nicht-helikalen Abschnitt von  $\alpha_{IIb}$  und der zytosolischen Helix von  $\beta 3$ . Der RMSD der gemittelten Struktur zu den fünf Einzelstrukturen ist ca.  $1 \text{ \AA}$ , was auf eine gut definierte Struktur hinweist.

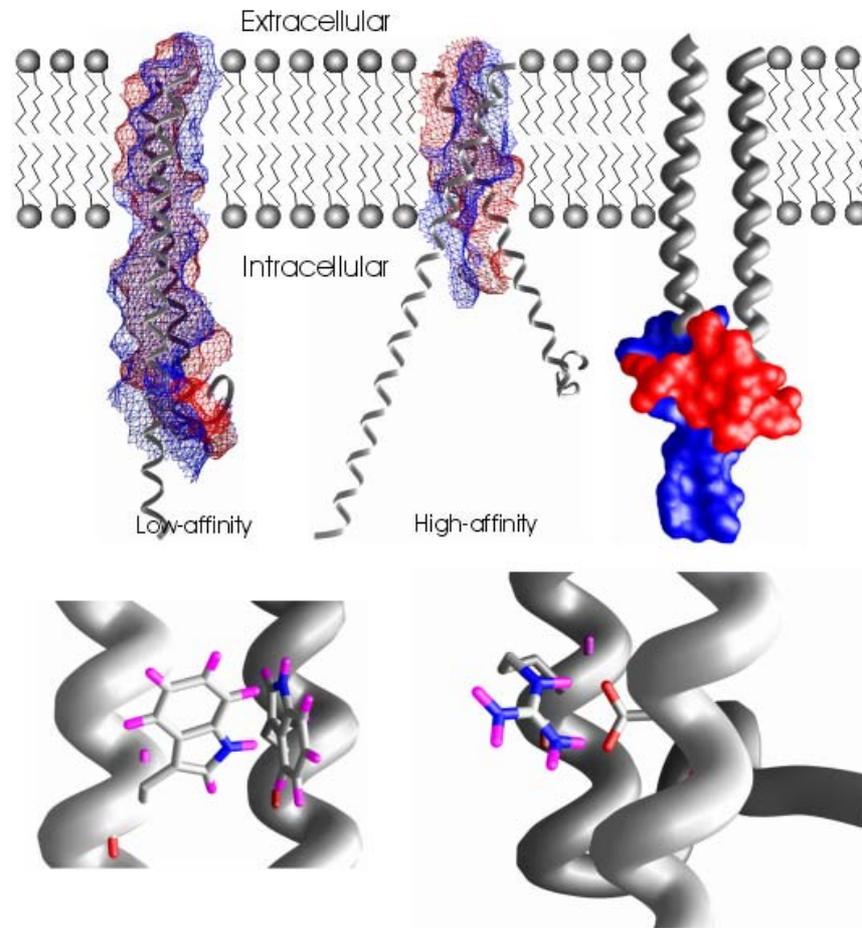


**Abb.2.7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aIIBb3 mit und ohne Ligand**

Nach Zugabe von Ligand (unten) nimmt der Kreuzungswinkel zwischen den Untereinheiten zu und die Kopfgruppen separieren sich. Eine ungefähre Abschätzung der Kreuzungswinkels für die Konformationen vor und nach Ligandenzugabe kann vorgenommen werden.<sup>[26]</sup>

Das so gerechnete Modell ist auch in Übereinstimmung mit weiteren experimentellen Daten für das Dimer in der geschlossenen Konformation; mit Terbium-Luminiszenz-Spektroskopie und elektro-spray-ionisierter Massenspektroskopie wurde gezeigt, dass die Kontaktstellen des nicht-helikalen Abschnittes von  $\alpha_{Ib}$  und der Helix von  $\beta_3$  zwischen  $\beta_3(737)$  und  $\beta_3(763)$  liegen (Abb. 2.8). Dies wird von dem Modell richtig wiedergegeben. *Quench*-Experimente mit Tryptophan Emissions- Spektren zeigten, dass mindestens eines der Tryptophane  $\alpha_{Ib}(1019)$ ,  $\beta_3(741)$  oder  $\beta_3(765)$  mit der anderen Untereinheit in Wechselwirkung tritt. In dem Modell interagieren zwei dieser Tryptophane miteinander (Abb. 2.9). Die durch Mutationsstudien nachgewiesene Salzbrücke kann sich in der Modellkonformation ausbilden. Ein kleiner Kreuzungswinkel zwischen den Helices sorgt dafür, dass die LIBS (*ligand induced binding sites*) in den zytoplasmatischen Domänen verdeckt sind und dass die extrazellulären *stalk* Regionen sich nahe sind.

Der kleine Kreuzungswinkel, biochemische Studien und die Konservierung der Struktur bei verschiedenen Integrin-Subtypen deuten darauf hin, dass Cluster 11 die Konformation des Integrins im Zustand niedriger Affinität beschreibt.



**Abb.2.9: Übereinstimmung des Modells mit experimentellen Daten.**

**Oben:** Die wechselwirkenden Oberflächen der Domänen sind gezeigt (links). Es wurde nachgewiesen, dass die intrazellulären Domänen als *coiled-coil* miteinander wechselwirken. Auch wurden Wechselwirkungen zwischen den oben rechts dargestellten Proteinabschnitten gezeigt.

**Unten:** Fluoreszenz-Löschung zeigte, dass zumindest eines der Trp mit der anderen Untereinheit interagiert (links). Eine in der geschlossenen Form vorliegende Salzbrücke (rechts) blockiert eine Umwandlung der Konformationen.

---

### 2.2.3 Die Konformation mit hoher Ligandenbindungsaffinität

Eine Analyse der elektronenmikroskopischen Bilder zeigt, dass nach Ligandenbindung der Kreuzungswinkel zwischen den Helices deutlich größer als  $20^\circ$  ist (Abb. 2.8). Dies ist der Fall für Cluster 12 ( $\omega = -23.3^\circ$ ) und Cluster 5 ( $\omega = -28.5^\circ$ ), nicht jedoch für Cluster 2 ( $\omega = 18.7^\circ$ ). Mit einem RMSD der Rückgrad-Atome von nur 1.7 Å sind sich Cluster 5 und Cluster 12 ähnlich. Es haben also zwei hochkonservierte cluster eine ähnliche Struktur, wobei cluster 12 höher konserviert ist als cluster 5. Die Winkeldifferenz zwischen der Konformation mit niedriger Ligandenbindungsaffinität und der jeweiligen anderen Konformation beträgt  $8^\circ$  für cluster 12 und nur  $4^\circ$  Grad für Cluster 2, wenn man die absoluten Winkelwerte betrachtet. Eine Differenz von  $8^\circ$  reflektiert den in den EM Bildern beobachteten Unterschied besser als eine Winkeldifferenz von  $4^\circ$ . Darüber hinaus zeigt eine nähere Betrachtung von Cluster 12, dass dieser Cluster eine GpA-ähnliche Struktur hat.<sup>[54]</sup> Der Unterschied der Rückgradatome beträgt nur 1.3 Å. Diese strukturelle Ähnlichkeit spiegelt sich in einer gewissen Sequenzhomologie wieder. Vor allem das zentrale Dimerisierungsmotiv GxxxG ist konserviert (Abb. 2.10).

**α-Untereinheiten (swissprot Zugangscode; z.B. :it:integrin;a2:alpha-2;\_bovin;organismus:ita2\_bovin)**

```

Dimerization motif          GxxxG
transmembraner Teil
XXXXXXXXXX
ita2_bovin      ---TGVIIGSVIAGIILLLLALVALLWKLGFYKRYEKMAKNPD-----ETDETTE
ita2_human     ---PTGVIIGSVIAGIILLLLALVALLWKLGFYKRYEKMTKNPD-----ETDETTE
ita2_mouse     ---TGVIIGSVIAGIILLLLALVALLWKLGFYKRYKKMGQNPD-----EMDETTE
itam_human     ---PPIIIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itam_mouse     ---PPIIIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itax_human     ---PIIIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itad_human     ---PIIIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itae_human     ---PIIIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itae_mouse     ETRSPIIIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita4_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita4_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita4_xenla     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita9_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita7_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita7_rat       ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita7_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita8_chick     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita8_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itab_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itab_papcy     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itab_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itav_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itav_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
itav_chick     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita2_drome     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita3_crisp     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita3_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita3_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita6_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita6_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita6_chick     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita5_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita5_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita5_xenla     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita1_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita1_rat       ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita1_human     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita1_mouse     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita1_drome     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita3_drome     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita5_drome     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
ita4_drome     ---IIVGSSVIGALLLLALVALLWKLGFYKRYKDMMSSEG-----GPPG
    
```

**β-Untereinheiten (swissprot Zugangscode; z.B. :it:integrin;b7:beta-7;\_human;organismus:itb7\_human)**

```

Dimerization motif          GxxxG
transmembraner Teil
XXXXXXXXXX
itb7_human     --TQAIIVGCVGGIVAVGLG--LVLAYRLSWEIYDRREYRFEKEQQQLNWKQD--SNPL
itb7_mouse     --AIIIGCTGGIVAVGLG--LVLAYRLSWEIYDRREYRFEKEQQQLNWKQD--NNPL
itb2_human     --AAIVGGTVAGIVLIGL--LLIWKRLTHISDLREYRFEKEKLSQWNN--DNPL
itb2_mouse     --AAIVGGTVAGIVLIGL--LLIWKRLTHISDLREYRFEKEKLSQWNN--DNPL
itb2_pig       --AAIVGGTVAGIVLIGL--LLIWKRLTHISDLREYRFEKEKLSQWNN--DNPL
itb3_human     --IIVVLLSVMGATILLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb3_mouse     --IIVVLLSVMGATILLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb6_human     --IPMIMIGVSLAIIIGLV--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb6_mouse     --IPMIMIGVSLAIIIGLV--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb5_human     --ATITLLAVVGSIIILVGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb5_papcy     --ATITLLAVVGSIIILVGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb5_mouse     --ATITLLAVVGSIIILVGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEERARAKWDTA--NNPL
itb1_rat       --IPIIVAGVVAGIVLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEKEMNAKWDTG--ENPI
itb1_xenla     --IPIIVAGVVAGIVLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEKEMNAKWDTG--ENPI
itb1_mouse     --IPIIVAGVVAGIVLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEKEMNAKWDTG--ENPI
itb1_human     --IPIIVAGVVAGIVLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEKEMNAKWDTG--ENPI
itb1_bovin     --IPIIVAGVVAGIVLIGLA--LLIWKLLTIHDRREFAKFEKEMNAKWDTG--ENPI
itb8_human     IFFIIFVTFIIGLLKLLTIHQVILQWNS-NKIKSSSDYRVSASKKDLILIQSVCTRAVT
itb8_rabbit    IFFIIFVTFIIGLLKLLTIHQVILQWNS-SKIKSSSDYRVSASKKDLILIQSVCTRAVT
    
```

**Abb. 2.10: Übereinanderlegung der Aminosäuresequenzen diverser Integrine.**  
 Es kann gesehen werden, dass das entscheidende Dimerisierungsmotif von GpA sowohl bei den α- (oben), als auch bei den β- (unten) Subtypen erhalten ist.

### 2.2.4 Sequenzähnlichkeit zwischen Integrinen und GpA

$\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 7$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha e$  und  $\alpha IIb$  Integrin enthalten das minimale Dimerisierungsmotiv von GpA, GxxxG. Integrin  $\beta 4$  hat allerdings keinerlei Ähnlichkeit zu der GpA Sequenz und wird im Folgenden nicht weiter betrachtet. Durch extensive Mutagenesestudien an GpA wurde gezeigt, dass die Seitenketten L75, I76, G79, V80, G83, V84 und T87 die Wechselwirkungen zwischen den Helices bestimmen.<sup>[55]</sup> Mutationen dieser Seitenketten führte zu signifikant verringerter Dimerisierung in SDS Micellen. Der Vergleich verschiedener Integrinsequenzen ist in Abb. 2.11 (links) gezeigt. Die Häufigkeit bestimmter Seitenketten an den äquivalenten Positionen in Integrinen ist in Abb. 2.11 (rechts) gezeigt.

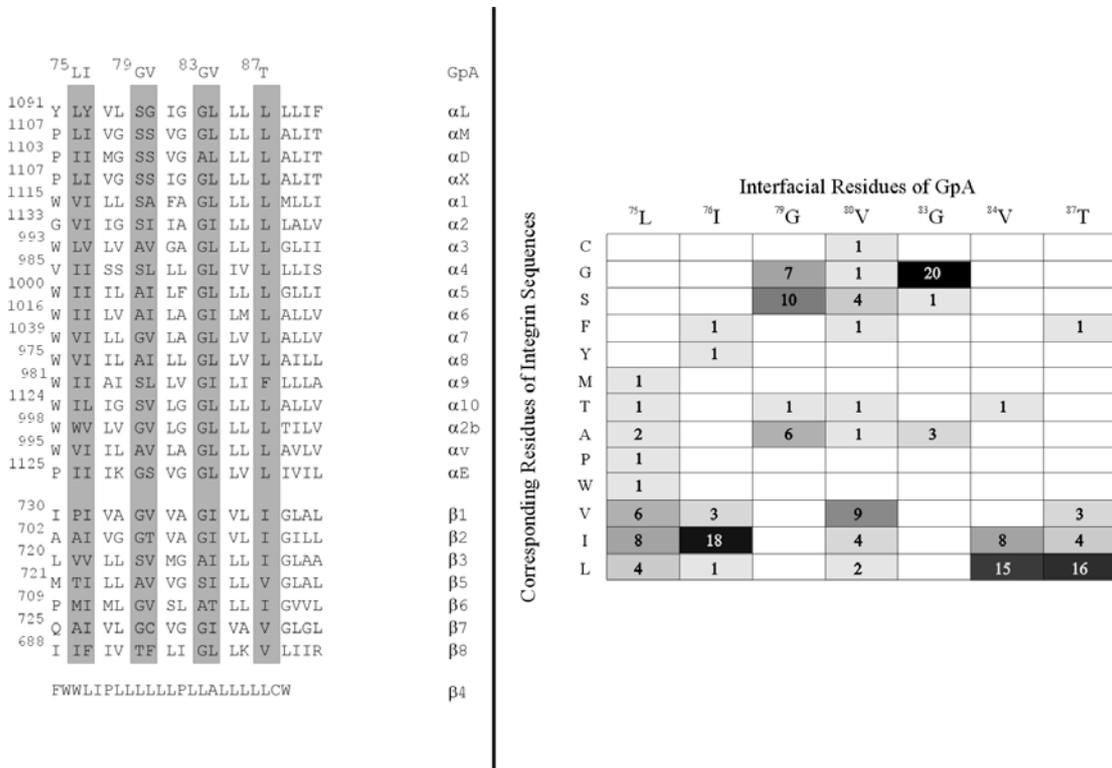


Abb. 2.11: Vergleich der Sequenzen der TM Domänen (links) und relative Aminosäurehäufigkeit (rechts).

Das Interface von GpA ist gut konserviert ist.

Die Position, die zu L75 in GpA äquivalent ist, ist bei den Integrinen hauptsächlich von Leu, Ile oder Val besetzt. Während bei GpA in SDS L75V, L75A oder L75I Mutationen keine Dimerisierung erkennen lassen, ist eine L75A Mutation in einer Membrenumgebung akzeptiert. Eine kombinatorische Sequenzbibliothek, die die Vereinbarkeit verschiedener Aminosäuren in der GPA Grenzschicht mit

Dimerisierung testete, zeigte, dass in der Membran sehr viel mehr Mutationen toleriert werden als in SDS Micellen.<sup>[56]</sup> Auch andere Studien mit GpA in einer Membran deuten darauf hin, dass die Struktur in natürlicher Umgebung sehr viel mehr Mutationen verkraftet als in SDS.<sup>[57]</sup> Es ist gezeigt worden, dass Val und Ile an Position 75 von GpA akzeptiert werden. Position 75 scheint also im Modell mit Aminosäuren besetzt zu sein, die mit einer GpA-ähnlichen Dimerisierung verträglich sind.

Die Position, die äquivalent zu I76 ist, ist auch bei Integrinen überwiegend mit Ile besetzt und damit GpA ähnlich.

Die zu Position G79 äquivalente Seitenkette ist entweder mit Gly, Ala oder Ser besetzt. Während G79A sogar in SDS Micellen zu Dimerisierung führt, ist G79S in SDS Micellen inhibierend für Dimerisierung. Jedoch wurde in der kombinatorischen Sequenzbibliothek Ser häufig an der Position 79 beobachtet.

Die Position, die äquivalent zu GpA-V80 ist, wird in den Integrinen im Wesentlichen mit Val, aber auch mit Leu, Ile und Ser besetzt. GpA-V80L dimerisiert wie der Wildtyp, GpA-V80I taucht häufig in der kombinatorischen Bibliothek auf.

Die zu GpA-G83 äquivalente Position ist in Integrinen hoch-konserviert.

GpA-V84 ist bei den Integrinen hauptsächlich mit mit Ile oder Leu besetzt. Für beide Substitutionen ist gezeigt worden, dass sie vereinbar mit einer GpA-ähnlichen Struktur sind.

Die zu GpA-T87 äquivalente Position ist nahezu ausschließlich mit Leu besetzt. Diese Substitution ist in SDS Dimer-inhibierend, und ist auch in der kombinatorischen Bibliothek nicht aufgetreten. Während also alle anderen Positionen mit GpA-verträglichen Seitenketten besetzt sind, ist dies für die zu T87 äquivalente Position nicht der Fall.

Das für die Dimerisierung in der Membran überaus wichtige und anscheinend hinreichende Motiv GxxxG ist bei den Integrinen entweder erhalten, oder zu SxxxG, AxxxG, GxxxA, SxxxA, AxxxS und TxxxG geändert. Eine statistische Analyse von transmembranen Sequenzen in der swissprot Datenbank hat gezeigt, dass die Motive [GAS]xxxG und Gxxx[GAS] gehäuft auftreten, was darauf hinweist, dass diese Kombinationen für Helix-Helix Kontakte üblich sind.<sup>[58]</sup>

Trotz der Unterschiede in der zu GpA-T87 äquivalenten Position scheinen die Integrine für eine GpA-ähnliche Struktur angemessene Sequenzen zu haben.

Verschiedene Hinweise deuten zusammenfassend darauf hin, dass Cluster 12

der Konformation mit hoher Ligandenbindungsaffinität ähnlich ist: es ist das strukturell am höchsten konservierte Cluster bei den untersuchten Integrinen, der Kreuzungswinkel und der Unterschied des Kreuzungswinkel zu der anderen Konformation stimmt mit EM Bildern überein, und dieser Cluster hat eine strukturelle Ähnlichkeit mit GpA, die sich in einer gewissen Sequenzähnlichkeit widerspiegelt.

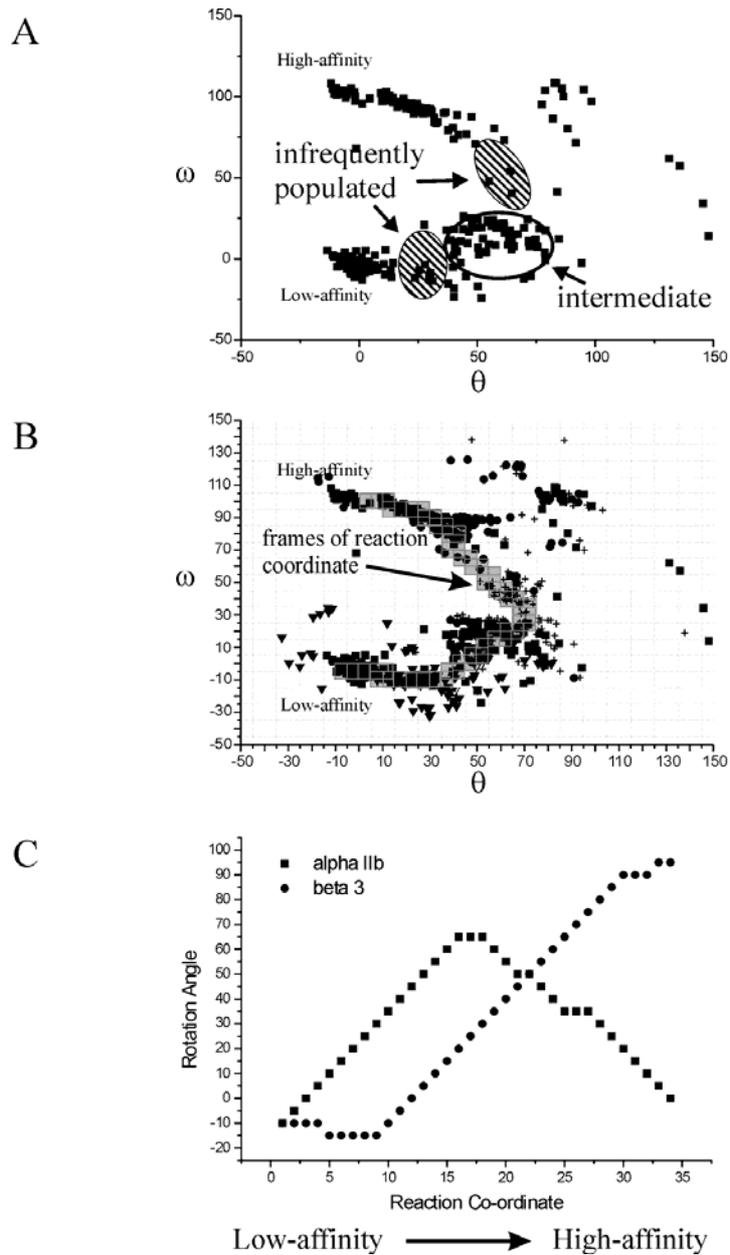
### 2.2.5 Die konformationelle Änderung während der Signaltransduktion

Moleküldynamik-Rechnungen sind für die Berechnung eines Übergangs zwischen zwei konformationellen Zuständen eines Proteins gut geeignet, da sie die Bewegungsgleichungen für jedes Atom im Protein lösen und so direkten Einblick in konformationelle Änderungen und Dynamiken erlauben. Hinderlich sind die sehr hohen Anforderungen, die an die berechnenden Computer gestellt werden. Durch den hohen Rechenaufwand lassen sich zur Zeit nur kurze Simulationen im ns Zeitrahmen rechnen. Die längste bisher gerechnete Simulation mit einem kleinen Protein ist im ms Bereich.<sup>[59]</sup> Da Konformationsänderungen meist mit Energiebarrieren zwischen den Konformationen verknüpft sind, sind diese Bewegungen eher langsam, und die MD Simulationen sind kurz im Vergleich zu der Zeitskala des strukturellen Überganges. Aus diesem Grund wurden Techniken entwickelt, die einen korrekten Übergangspfad in relativ kurzer Zeit berechnen können: wenn die Edukt- und Produkt-Konformationen bekannt sind, können im Prinzip ‚*minimum biasing MD*‘,<sup>[60]</sup> ‚*path energy minimization*‘,<sup>[61]</sup> die ‚*self penalty path*‘ Methode,<sup>[62]</sup> ‚*targeted MD*‘<sup>[63]</sup> und ‚*directed dynamics*‘<sup>[64]</sup> den Reaktionsweg beschreiben. Allen diesen Methoden ist gemeinsam, dass entweder ein intuitiver Weg angenommen und dann verfeinert wird oder dass Abstandsrestrains angewandt werden, die das System in eine gewünschte Richtung lenken sollen. Da jedoch im vorliegenden Fall die Ausgangs- und Endkonformation nur Computermodelle sind und daher bestenfalls als Strukturen mit niedriger Auflösung aufgefasst werden dürfen, würden künstliche Abstandsrestrains dem System eventuell einen nicht-natürlichen Pfad aufzwingen. Wenn jedoch ein Übergang ohne menschliche Intervention errechnet werden kann, so unterstützt dies zusätzlich die Validität der Modelle. Um künstliche Restraints zu vermeiden und dennoch die Simulationen zu beschleunigen, wurden Simulationen bei erhöhten Temperaturen gerechnet. Im verwandten Fall von Protein-Faltungs-Rechnungen ist gezeigt worden, dass Übergangszustände, die durch Simulationen mit erhöhten

Temperaturen errechnet wurden, in sehr guter Übereinstimmung mit experimentellen Daten und Simulationen sind, die unter physiologischen Bedingungen vorgenommen wurden.<sup>[65, 66]</sup> Rechenzeitbeschränkungen erlauben es jedoch nicht, Rechnungen mit expliziter Membran durchzuführen. Daher wurden nur Rechnungen allein der TM Domänen im Vakuum durchgeführt. Innerhalb dieser Näherung wurden allerdings schon gute Ergebnisse erzielt.<sup>[22, 67-69]</sup> In dieser Arbeit wurden die Simulationen zuerst bei 600 K durchgeführt, gefolgt von Simulationen bei 300 K. Sie wurden *in vacuo* mit den jeweiligen TM Konformationen als Startkonformationen ohne die zytosolischen Domänen durchgeführt. 150 Simulationen von beiden Startkonformationen mit verschiedenen Anfangsgeschwindigkeitsverteilungen wurden gerechnet, so dass eine Verteilung möglicher Simulationsergebnisse erhalten wurde. So konnte dann geprüft werden, ob die jeweils andere Konformation oder ein gemeinsames Intermediat erreicht wurde.

### 2.2.6 Modell der Signaltransduktion mit drei Zuständen

Eine Betrachtung der Rotationswinkel der Helices mit Bezug auf die geschlossene Konformation (niedrige Affinität) zeigt, dass von beiden Startstrukturen aus eine gemeinsame intermediäre Struktur erreicht wird, obwohl die meisten Strukturen relativ nahe der Ausgangsstruktur bleiben. Auch lassen sich zwei nur wenig populierte Regionen erkennen (Abb. 2.12). Für eine bessere Beschreibung des Reaktionsweges wurden zwei weitere Simulationen gerechnet, ausgehend von Konformationen, die nahe den wenig populierten Regionen sind. Aus den erhaltenen Konformationsdaten wurden ähnliche Strukturen zusammengefasst und ihre konformationellen Parameter bestimmt. Die Änderungen der Strukturparameter entlang der Reaktionskoordinaten sind in Abb. 2.12 und Abb. 2.13. dargestellt. Die intermediäre Konformation unterscheidet sich im Rotationswinkel der  $\alpha$ -Untereinheit (jeweils relativ zur geschlossenen Konformation), während die  $\beta$ -Untereinheit nahezu unverändert bleibt. Im weiteren Verlauf der konformationellen Änderung dreht sich die  $\alpha$ -Untereinheit fast auf ihren Ausgangswert zurück, die  $\beta$ -Untereinheit dreht sich um ca. 90 Grad. Auch der Kreuzungswinkel zwischen den Helices ändert sich beim Übergang von der geschlossenen zur intermediären Konformation nicht, danach jedoch sehr stark. Er geht erst auf +10 Grad zurück um dann den finalen Wert von – 25 Grad zu erreichen.



**Abbildung 2.12: Bestimmung der Reaktionskoordinate.**

**A:** Ausgehend von der hochaffinen und niedrigaffinen Konformation wird ein gemeinsames Intermediat erreicht. Zwei Regionen sind nur wenig populiert.

**B:** Um eine bessere Beschreibung der wenig-populierten Abschnitte zu erhalten, wurden Rechnungen ausgehend von Strukturen nahe diesen Regionen durchgeführt. Die Rotationswinkelverteilung dieser Rechnungen ist hier gezeigt.

**C:** Beschreibung der Rotationswinkel während des konformationellen Übergangs.

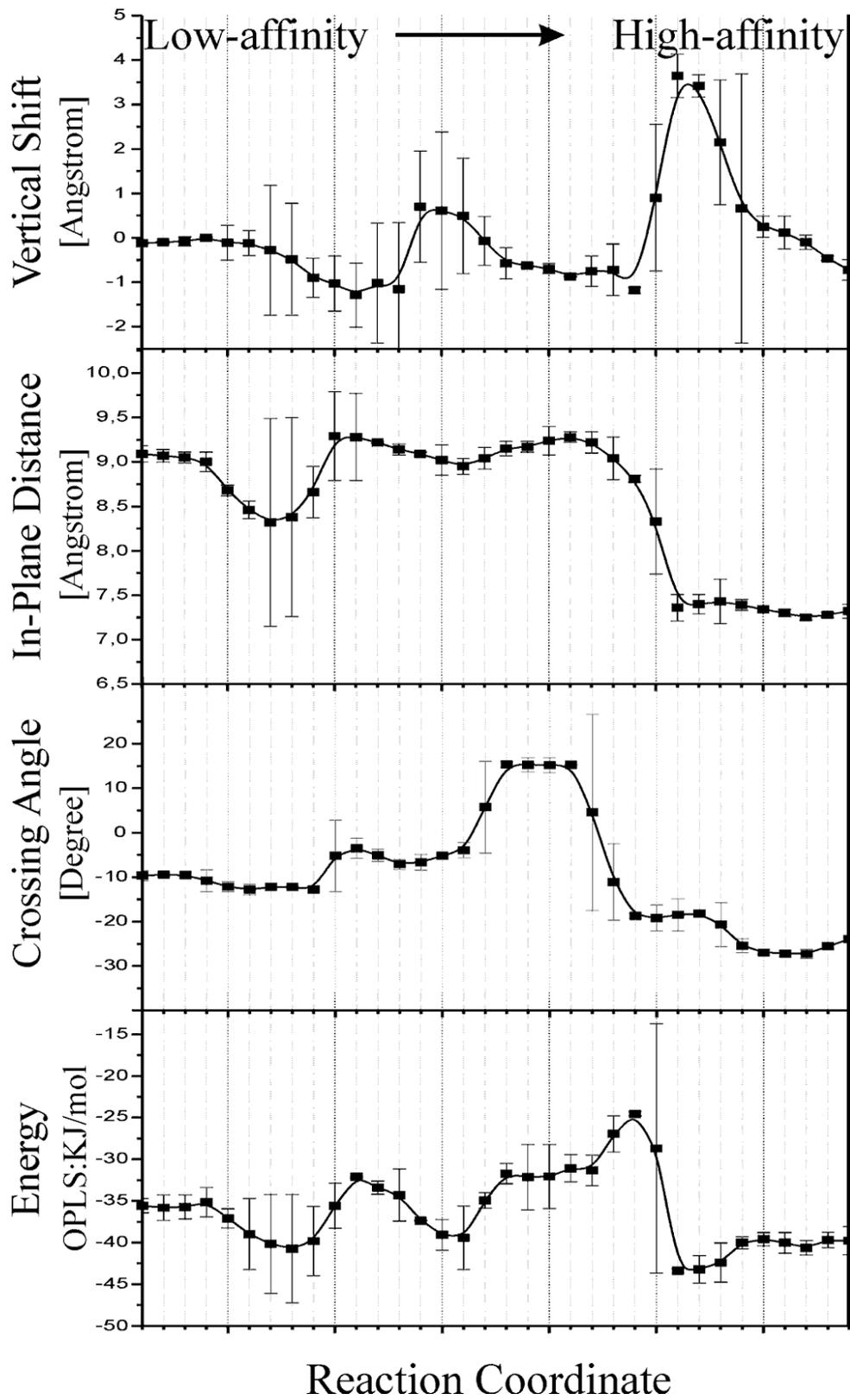


Abb. 2.13: Änderung der konformationellen Parameter und der Energie.

Die Wechselwirkungsenergie, auch wenn sie durch die vereinfachte Rechnung nur als Näherung verstanden werden kann, zeigt, dass die wenig-populierten Regionen vermutlich Übergangszustände sind (Abb. 2.14)

Neuere biochemische Studien haben gezeigt, dass der Übergang von der Konformation mit niedriger Affinität zu extrazellulären Liganden zur hochaffinen Konformation ein Prozess mit mehr als zwei Stufen, vermutlich mit drei Stufen ist.<sup>[70, 71]</sup> Es ist auch gezeigt worden, dass das Entfernen der TM- und zytosolischen Domänen das Integrin konstitutiv aktiviert, während die Kopfgruppen ohne Ligandenzugabe assoziiert bleiben.<sup>[72]</sup> Daher wird hier ein Drei-Stufen-Mechanismus vorgeschlagen: der erste Zustand ist durch intrazelluläre Wechselwirkungen stabilisiert und hat nur eine geringe Affinität zu extrazellulären Liganden. Intrazelluläre Signale ändern die Konformation durch eine Rotation der  $\alpha$ -Untereinheit. Hierbei wird im extrazellulären Raum eine Ligandenbindungsstelle exponiert. Ligandenbindung führt daraufhin zu weiteren Konformationsänderungen, die schließlich zu einer Separierung der Kopfgruppen führen. Die intermediäre Konformation, die hier beobachtet wurde, entspricht dem zweiten, aktivierten Zustand (Abb. 2.14).

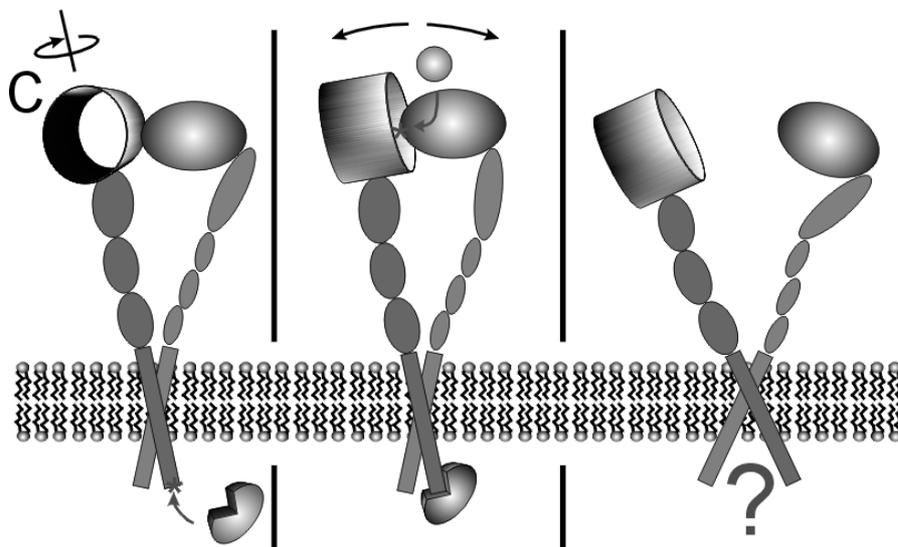


Abb. 2.14: 3-Stufen Modell der Signalweiterleitung.

Unten: Durch intrazelluläre Aktivierung ändert sich die relative Orientierung der Integrin-Untereinheiten. Das aktivierte Integrin kann nun mit hoher Affinität extrazelluläre Liganden binden. Die Ligandenbindung führt zu weiteren konformationellen Änderungen, die die Separierung der Kopfgruppen bewirken.

### 2.2.7 Einfluss der intrazellulären Domäne auf die Signaltransduktion

Die intrazelluläre Domäne spielt eine Schlüsselrolle bei der Schaltung des Proteins von der inaktiven zur aktivierten Konformation.<sup>[46]</sup> Es ist gezeigt worden, dass Mutationen in der zytosolischen Domäne das Protein konstitutiv aktivieren können.<sup>[46]</sup> Daher kann angenommen werden, dass die zytosolische Domäne, und nicht die extrazelluläre Domänen, das Integrin im niedrigaffinen Zustand stabilisieren. Dies ist sinnvoll, wenn man bedenkt, dass intrazelluläre Signale die Aktivierung des Proteins verursachen. Hier wird nun an Hand des Strukturmodells erklärt, wie die intrazelluläre Domäne den Grundzustand stabilisiert. Der Grundzustand ist energetisch durch die Salzbrücke zwischen  $\alpha$ Ib(R995) und  $\beta$ 3(D723) stabilisiert. Zusätzliche Kontakte zwischen den intrazellulären Domänen werden im niedrig affinen Zustand gebildet. Diese fehlen im hochaffinen Zustand und werden eventuell durch zusätzliche Kontakte zwischen Integrin und Aktivator-Protein überkompensiert. Weiterhin verhindert der nicht-helikale Abschnitt von  $\alpha$ Ib die Rotation, die nötig ist, um das Protein in den aktiviertem Zustand zu überführen (Abb. 2.15, rechts). Eine Mutante, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Proteins führt, hat eine andere Konformation im nicht-helikalen Abschnitt als der Wildtyp (Abb. 2.15, links),<sup>[38]</sup> die die erwähnte Rotation erlaubt. Die intrazellulären Domänen der Integrine scheinen also mindestens zwei Funktionen zu haben: zum einen wird der Grundzustand durch eine hohe Anzahl von Kontakten stabilisiert, zum anderen wird die Energie des Übergangszustandes durch den nicht-helikalen Teil von  $\alpha$ Ib angehoben. Es scheint wahrscheinlich, dass die intrazellulären Signal-Proteine, die mit der  $\alpha$ -Untereinheit assoziieren, die Konformation des nicht-helikalen Abschnittes von  $\alpha$ Ib ändern und durch Bindung an die intrazelluläre Domäne den Wechselwirkungsverlust, der durch räumliche Trennung der Domänen zweifelsohne auftritt, überkompensieren.

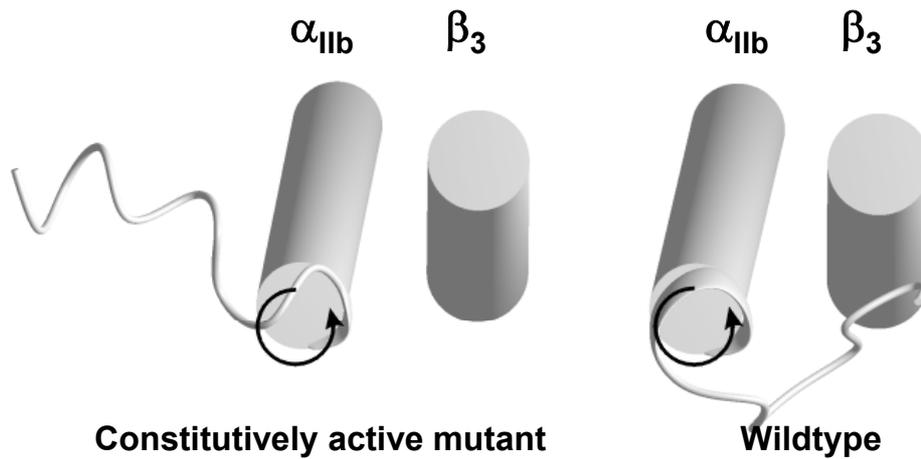


Abb. 2.15: Einfluss der intrazellulären Domäne.

Während im Wildtyp (rechts) eine Rotation verhindert wird, ist diese in einer aktiven Mutante (links) möglich.

## 2.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde ein gemeinsames Strukturmotiv der TM Domänen von Integrinen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Integrine in ihrer hoch-affinen Konformation eine GpA ähnliche Struktur einnehmen. Für  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wurde außerdem die niedrig-affine Konformation an Hand experimenteller Daten identifiziert. Ein möglicher Pfad zwischen diesen Konformationen wurde errechnet, und es konnte gezeigt werden, dass eine dritte, intermediäre Konformation existiert. Auf dieser Grundlage wurde ein Modell der Signaltransduktion mit drei Schritten erstellt. Weiterhin wurde der Einfluss der intrazellulären Domänen auf den Konformationsübergang beschrieben.

### 3 Docking Studien an Integrin $\alpha_v\beta_3$

#### 3.1 Einleitung

Ein weiteres pharmakologisch sehr wichtiges Integrin ist  $\alpha_v\beta_3$ . Mit der ligandenfreien Kristallstruktur der extrazellulären Domänen als Startpunkt wird im Folgenden gezeigt, dass auch  $\alpha_v\beta_3$  höchstwahrscheinlich in einem 3-Stufen-Mechanismus funktioniert. Es wird postuliert, dass eine  $\text{Ca}^{2+}$  - Bindungsstelle ihre Position verändert und diese Änderung der Anfangspunkt für weitere konformationelle Änderungen ist. Weiterhin werden die Ergebnisse der Docking-Studien mit der später veröffentlichten Kristallstruktur des Liganden-Integrins Komplexes verglichen.

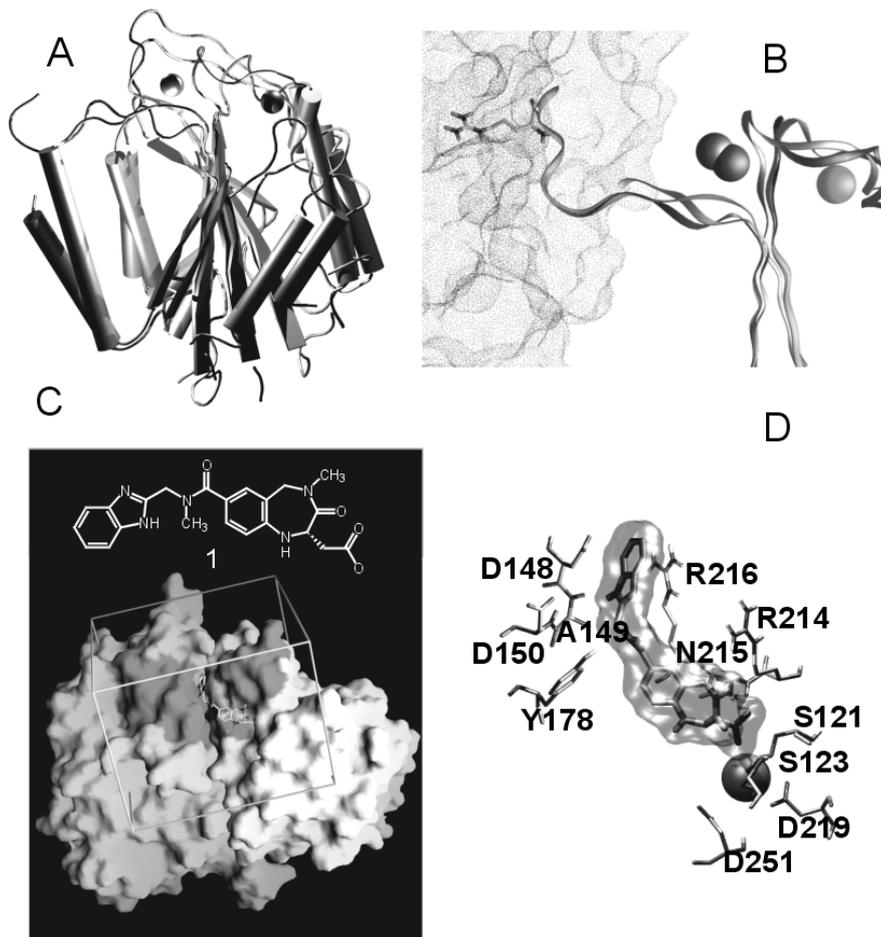
Man nimmt an, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion, das an eine MIDAS (**metal ion-dependent adhesion site**) -Region der  $\beta$ A-Domäne der  $\beta_3$  Untereinheit gebunden ist, mit dem Aspartat der Integrin bindenden RGD-Peptide wechselwirkt.<sup>[73]</sup> Überraschender Weise ist in der Kristall-Struktur des  $\alpha_v\beta_3$  die MIDAS-Region nicht mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion besetzt, wohl aber eine Region nahebei, die adMIDAS-Region genannt wird.<sup>[39]</sup>

Mutationsstudien haben gezeigt, dass der N-terminale  $\beta$ -Propeller der  $\alpha_v$ -Untereinheit auch in den Ligandenbindungsprozeß involviert ist und mit dem Arginin der RGD-Peptide interagiert.<sup>[74, 75]</sup> Der Umstand, dass es RGD-Liganden mit  $\alpha$ -Spezifität und auch solche mit  $\beta$ -Spezifität gibt, deutet ebenfalls darauf hin, dass die RGD-Peptide Kontakt zu beiden Untereinheiten haben.<sup>[76-78]</sup>

Während der Abstand zwischen dem Arginin und dem Aspartat im RGD-Peptid eine Größenordnung von 13 Å hat,<sup>[76, 79, 80]</sup> ist der kürzeste Abstand zwischen dem  $\text{Ca}^{2+}$ , das in der adMIDAS Region gebunden ist, und dem  $\beta$ -Propeller der  $\alpha$ -Untereinheit 17 Å. Es scheint also, dass die Kristallstruktur nicht die ligandenbindende Konformation konstituiert.

Superposition der  $\beta$ A-Domäne von  $\beta_3$  und der I-Domäne des Integrins  $\alpha_2$ <sup>[28]</sup> zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen Strukturen (Abb. 3.1a).<sup>[81]</sup> Eine nähere Analyse der Strukturen der I-Domäne von  $\alpha_2$  ohne Ligand und im Komplex mit Kollagen zeigt, dass das Bindungsereignis einen Versetzung der Ca-Position und der MIDAS Region der I-Domäne zur Folge hat. Hier wird

vorgeschlagen, dass im Falle des  $\alpha\beta 3$  Intergins ähnliche Konformationsänderungen stattfinden, die das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion näher an die  $\alpha$ -Untereinheit rücken und damit eine Interaktion des Liganden mit beiden Untereinheiten ermöglicht.



**Abb 3.1.: Ergebnisse der Dockingstudien**

**A:** Strukturelle Ähnlichkeit zwischen der  $\beta A$ -Domäne von  $\beta 3$  und der I-Domäne von  $\alpha 2$

**B:** Vergleich der Originalstruktur (rechter Loop) mit der I-Domänenstruktur (mittlerer Loop) und der modellierten Struktur (linker Loop). Die Position des Calciums (rechte Kugel) verschiebt sich auf die  $\alpha$ -Untereinheit zu (linke Kugeln).

**C:** Position des gedockten Liganden am Interface der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Die dunkelgrauen Regionen sind durch biochemische Studien als für die Ligandenbindung wichtig erkannt worden.

**D:** Mit dem Liganden wechselwirkende Seitenketten. Viele hiervon wurden durch Mutationsstudien als wichtig für die Ligandenbindung identifiziert.

## 3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die  $\beta_3$  MIDAS Region wurde entsprechend der I-Domäne modelliert (Abb. 3.1b). An der modellierten Struktur wurden automatisierte Dockingstudien mit Hilfe des Programms AutoDock und mit dem  $\alpha_v\beta_3$  selektiven Inhibitor 1<sup>[82]</sup> als Ligand vollzogen (Abb. 3.1c). Tatsächlich bindet nun die Säuregruppe des Inhibitors, die dem Aspartat im RGD Liganden entspricht, an das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion, das an der modellierten MIDAS Region gebunden ist, während der Abschnitt des Inhibitors, der dem Arginine im RGD Liganden entspricht, in der Gegend von  $(\alpha)$ -Asp<sup>148</sup> und  $(\alpha)$ -Tyr<sup>178</sup> der  $\alpha_v$  Propeller-Domäne bindet (Abb. 3.1d). Diese Seitenketten wurden in biochemischen Studien als besonders wichtig für Ligandenbindung und Spezifität erkannt.<sup>[83-85]</sup> Eine nähere Untersuchung der modellierten Rezeptor-Konformation zeigt, dass die adMIDAS Region nicht länger fähig erscheint, ein  $\text{Ca}^{2+}$  Ion zu binden, da die vorher  $\text{Ca}^{2+}$ -komplexierende Seitenkette  $(\beta)$ -Asp<sup>127</sup> nun in eine andere Richtung orientiert ist. Des weiteren sollte die Affinität der MIDAS Region für Metall-Ionen steigen, da  $(\beta)$ -Asp<sup>251</sup> nun in der Metallkomplexierung teilnimmt.

Trotz der guten Übereinstimmung der gefundenen Bindungsstelle mit biochemischen Daten ist eine Struktur mit assoziierten Kopfgruppen nicht in Übereinstimmung mit EM Bildern ligandenaktivierter Integrine.<sup>[26, 27]</sup> Daher scheint es wahrscheinlich, dass das Ligandenbindungsereignis zu weiteren konformationellen Änderungen führt, die die Separierung der Kopfgruppen bewirken. Zwei Loops, die in die  $\text{Ca}$ -Komplexierung und die Ligandenbindung und damit auch in die konformationellen Änderungen involviert sind, befinden sich nahe der Seitenkette  $(\beta)$ -Arg<sup>261</sup>. Diese Seitenkette ist Teil des  $\alpha/\beta$  Interfaces und inseriert in den  $\beta$ -Propeller der  $\alpha_v$  Untereinheit.  $(\beta)$ -Arg<sup>261</sup> ist umgeben von aromatischen Seitenketten der  $\beta$ -Propeller Domäne. Es sollten also Kation- $\pi$  Wechselwirkungen zwischen dem Arginin und den aromatischen Seitenketten der  $\alpha$ -Untereinheit zu dem  $\alpha/\beta$  Interface beitragen. Eine kleine Änderung der Position von  $(\beta)$ -Arg<sup>261</sup>, die durch eine allosterische Bewegung nach Ligandenbindung verursacht werden kann, kann diese Wechselwirkung unterbrechen.<sup>[86]</sup> In Konsequenz können die Kopfgruppen dissoziieren.

Es scheint, als ob die Kristallstruktur des freien Integrins der aktivierten Struktur in dem oben vorgestellten 3-Stufen-Modell darstellt, was darauf

zurückgeführt werden kann, dass die Ruhe-Konformation durch intrazelluläre Wechselwirkungen in ihrer Position gehalten wird, die im Kristall fehlen. Es wurde gezeigt, wie allosterische Effekte eine weitere konformationelle Änderung bewirken können.

### 3.3 Vergleich mit Röntgenstruktur.

Nach der Modellierung der Ligandenbindung wurde eine Struktur des Integrins im Komplex mit einem zyklischen RGD-Peptid als Ligand veröffentlicht.<sup>[40]</sup> Ein Vergleich der modellierten mit der experimentellen Struktur verdeutlicht das Potential von Modellierungsstudien. Der Trend in der Veränderung der *loop* Orientierung ist richtig wiedergegeben worden, wenn auch im Modell die Änderung als zu stark angenommen wurde (Abb. 3.2 links). Das Metall-Ion, welches an der Ligandenbindung beteiligt ist, wurde nahezu richtig positioniert. Da die Haupt-Wechselwirkung der Carboxyl-Gruppe des Liganden mit eben jenem Metall-Ion stattfindet, führt die richtige Positionierung des Ca-Ions zu einer richtigen Positionierung der Carboxyl-Gruppe. Die den Arginin-Rest nachahmende Gruppe im hineingerechneten Liganden ist anders orientiert als das Arg in der Kristallstruktur (Abb. 3.2 rechts). Dies kann entweder durch Fehler in der Docking-Prozedur oder aber auch durch die unterschiedliche Raumerfüllung der Liganden verursacht sein.

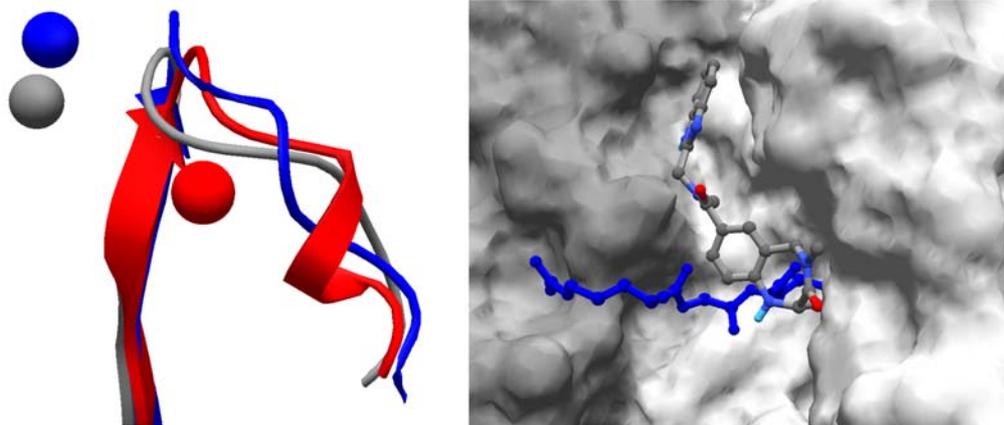


Abb. 3.2: Vergleich der gerechneten Struktur mit der Kristallstruktur.

**Links:** Der Trend in der Loop-Konformationsänderung wurde richtig erkannt; allerdings ist die Änderung als zu hoch eingeschätzt worden.

**Rechts:** Die an das Metallion bindende Säuregruppe ist richtig positioniert im hineinrechneten Liganden. Das Arginin-Mimetikum hingegen bindet laut Rechnung an einer anderen Stelle.

Die Unterschiede in den Ligandenkonformationen unterstreicht die Notwendigkeit von hochauflösenden Strukturen für das rationale Design von Liganden, besonders wenn konformationelle Änderungen bei der Ligandenbindung erwartet werden. Computer-gestützte Studien hingegen können Trends in konformationellen Änderungen richtig wiedergeben und in den modellierten Strukturen Ligandenbindungsregionen identifizieren. Dennoch müssen die Ergebnisse von reinen Computerstudien als Ergebnisse mit niedriger Auflösung aufgefasst werden.

### 3.4 Vom Liganden-basierten zum Protein-basierten rationalen Design

Sehr intensive Screening-Studien cyclischer RGD-Peptide führten in der Vergangenheit ohne Kenntnis der Proteinstruktur zur Entwicklung superaktiver und selektiver RGD-Peptide.<sup>[87, 88]</sup> Die kürzlich publizierten Röntgenstrukturen erlauben es nun, die Resultate strukturell zu interpretieren, insbesondere weil viele der synthetisierten cyclischen Peptide strukturell durch NMR aufgeklärt wurden.

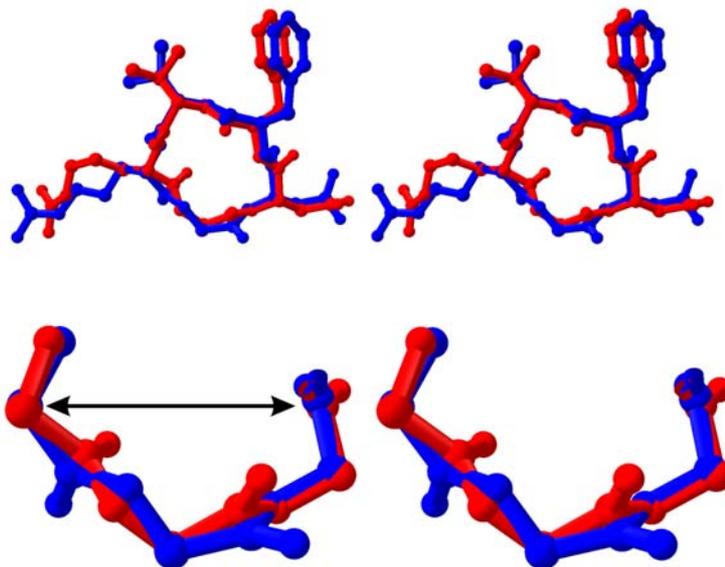


Abb. 3.3: Die Konformation des Liganden.

Vergleich der Konformation von  $\text{cyclo}(-\text{RGDfMeVal}-)$  gebunden am Protein (hell) und in wässriger Lösung (dunkel). Die Konformationen sind innerhalb der Fehler identisch. Speziell der entscheidende Abstand  $C_\alpha$  ändert sich bei der Bindung nicht.

Die Rückgratkonformation des Liganden in der Kristallstruktur des Komplexes<sup>[40]</sup> und die Lösungsstruktur des Liganden, die durch NMR-Spektroskopie in Wasser<sup>[89]</sup> bestimmt wurde, sind sehr ähnlich (Abb. 3.3 oben), besonders der wichtige Abstand der C $\alpha$ -Atome des Arg und des Asp ist identisch (Abb. 3.3 unten). Da die Röntgenstruktur nur mit einer Auflösung von 3.1 Å erhalten wurde, wäre eine detaillierte Diskussion der Unterschiede zwischen den beiden Ligandenkonformationen nicht sinnvoll. Andererseits zeigt es die Stärke der NMR-Spektroskopie bei der Bestimmung der Struktur von konformationell eingeschränkten, cyclischen Peptiden in Lösung,<sup>[90]</sup> ohne der Gefahr von Kristallisations-Artefakten zu unterliegen. Es unterstreicht weiterhin die Gültigkeit des Liganden-orientierten Design-Prinzips: ein Ziel des Liganden-Designs ist es, rigide Gerüste bereitzustellen, die ihre Konformation bei der Bindung an den Rezeptor möglichst wenig ändern. Ein starres Gerüst hat zwei Hauptvorteile: der Ligand nimmt immer die richtige Konformation ein, kein vorgelagertes Gleichgewicht verschiedener Konformationen verlangsamt den Bindungsprozess und die Bindung kostet keine zusätzlichen entropischen Beiträge.<sup>[90]</sup> Wenn Wasser von der Bindungsstelle verdrängt wird, wie das bei stark geladenen Ligand-Protein-Wechselwirkungen vorkommt, kann man sogar entropische Bindungsenergie gewinnen.

Screening der verschiedenen Seitenketten an Val und D-Phe in c(-RGDf[NMe]V-) ergab, dass Val durch viele andere Reste unterschiedlicher Größe ersetzt werden kann. In der Kristallstruktur macht Val keinen Kontakt zum Protein. Substitution von D-Phe durch D-Trp erhöht die Bindungsaffinität, während D-Prolin die Bindung verhindert.<sup>[87]</sup> Die Überlagerung der NMR-Strukturen der entsprechenden RGD-Peptide mit dem Peptid in der Röntgenstruktur zeigt nun, dass die D-Trp-Substitution die hydrophoben Wechselwirkungen erhöht, während c(-RGDpV-) das Protein nicht in gleicher Weise binden kann, weil es zu sterischer Hinderung zwischen der D-Pro-Seitenkette und dem Integrin kommt (Abb. 3.4 oben).

N-Methylierung von Val steigert die Bindungsaffinität etwa um den Faktor vier. Der Vergleich der Konformationen von c(-RGDfV-)<sup>[91]</sup> und c(-RGDf[NMe]V-) zeigt, dass die Konformation sich ändert und der Abstand C $\alpha$  zwischen Arg und Asp verkürzt ist (Abb. 3.4, unten).

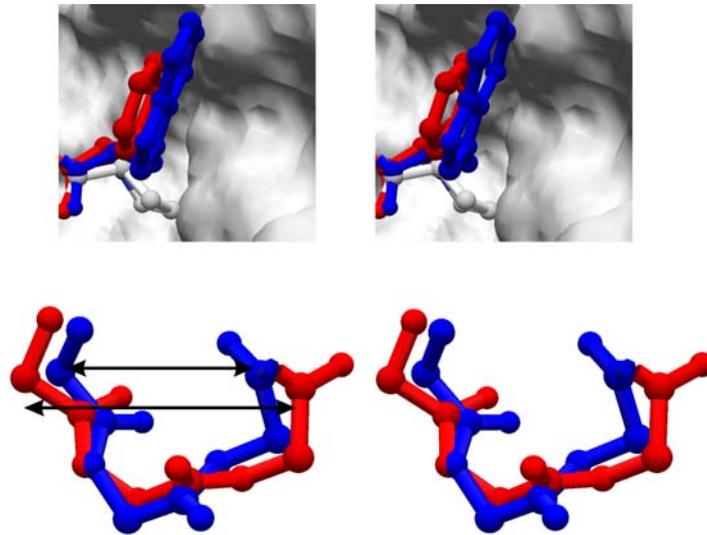


Abb. 3.4: Der Effekt von Substitutionen am Liganden auf die Bindung.

**Oben:** Die Substitution von D-Phe durch D-Trp verstärkt die Bindung, mit D-Pro wird sie verhindert. Das kann man nun leicht auf der Basis der Struktur erklären: während D-Trp die hydrophoben Interaktionen verstärkt, kollidiert D-Pro mit der Proteinoberfläche.

**Unten:** Der Effekt der N-Methylierung der D-Phe-Val Amidbindung. In der nicht-methylierten Form ist der  $C_{\alpha}$ -Abstand kürzer als in der methylierten, wie man aus NMR-Ergebnissen sehen kann.

### 3.5. Die Spezifität der Interaktion

Da nur das Arginin des Liganden mit der  $\alpha$ -Untereinheit in Kontakt tritt, muss die Spezifität zwischen den verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten entweder durch unterschiedliche Orientierungen der Seitenketten relativ zur Asparaginsäure oder durch Veränderung bzw. Substitution des Arginins zurückzuführen sein. Es können auch sekundäre Effekte, wie Strukturänderung in der  $\beta$ -Untereinheit durch die verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten, eine Rolle spielen. Tatsächlich fand man Spezifitäten beim Liganden-orientierten Design. Einerseits konnte gezeigt werden, dass der Ersatz von Arg durch Lys die Aktivität gegen  $\alpha_v\beta_3$ , nicht aber gegen  $\alpha_{11b}\beta_3$  zerstört. Andererseits lässt sich die Guanidiniumgruppe des Arginins ohne Verlust der Aktivität durch Aminopyridin für  $\alpha_v\beta_3$  ersetzen, während die gleiche Substitution von

---

$\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  nicht toleriert wird.<sup>[78]</sup> Diese Tatsache wird durch die Röntgenstruktur nunmehr erklärt: Asp<sup>218</sup> zeigt eine „side-on“ Bindung mit Arg; weitere Stabilisierung erfolgt über Asp<sup>150</sup> (Abb. 3.5a). Ein Sequenz-Vergleich zeigt, dass der dem Asp<sup>218</sup> entsprechende Rest in  $\alpha_{\text{IIb}}$  das Phe<sup>231</sup> ist, welches eine „side-on“ Wechselwirkung mit Arg nicht bilden kann (Abb. 3.5b).

Der Rest, der Asp<sup>150</sup> in  $\alpha_{\text{IIb}}$  entspricht, ist Glu<sup>157</sup>, der als „end-on“ Bindungspartner für Lys dienen kann. Ein Homologiemodell von  $\alpha_{\text{IIb}}$  (unveröffentlichte Ergebnisse), das der Struktur von  $\alpha_{\text{v}}$  superpositioniert ist, zeigt, dass der  $\alpha_{\text{v}}$ -spezifische RGD-Ligand nicht an  $\alpha_{\text{IIb}}$  in der gleichen Orientierung binden kann, wie am  $\alpha_{\text{v}}$ . Der auf  $\alpha_{\text{v}}$ -Asp<sup>150</sup> bzw.  $\alpha_{\text{IIb}}$ -Glu<sup>157</sup> folgende Loop ist zwischen den beiden Integrinen nicht konserviert. Die längere Schleife in  $\alpha_{\text{IIb}}$  schließt die Tasche, in die c(-RGDf[NMe]V-) bindet. Weitere sterische Wechselwirkungen findet man zwischen Gly in RGD und der Oberfläche von  $\alpha_{\text{IIb}}$  (Abb. 3.5c). Die Röntgenstruktur erlaubt somit nicht nur eine Rationalisierung der Aktivitäten der verschiedenen RGD-basierten Liganden von  $\alpha_{\text{v}}\beta_3$ , sondern kann auch helfen, die verschiedenen Spezifitäten für die Integrin-Subtypen zu verstehen.

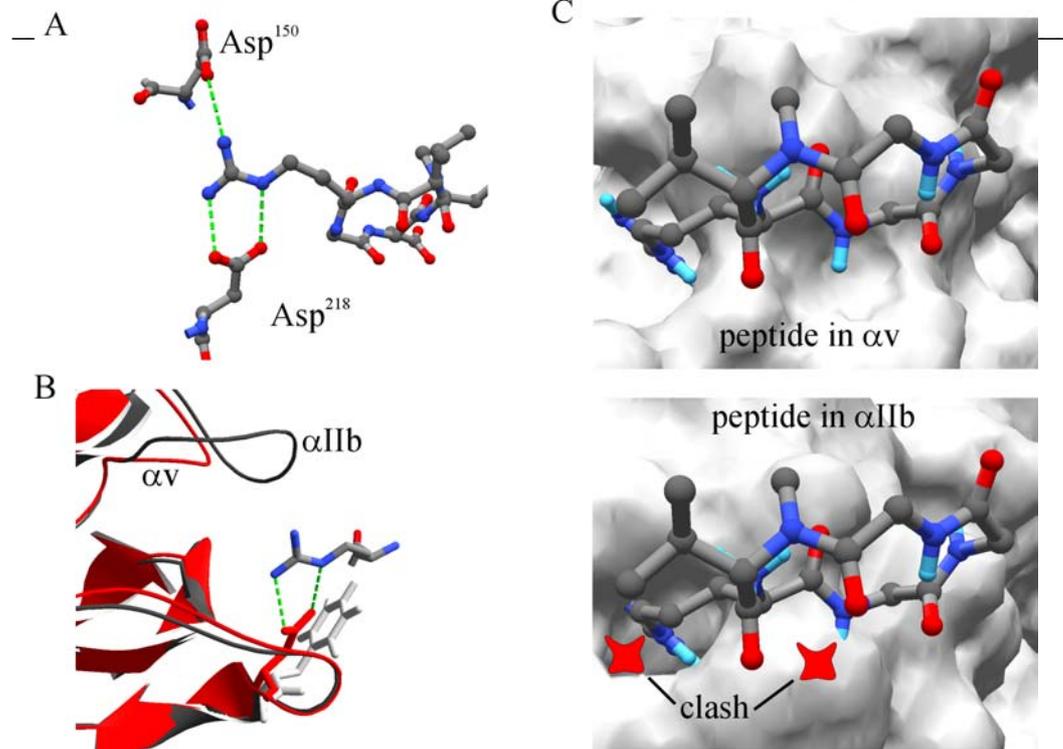


Abb. 3.5: Vergleich von  $\alpha_v\beta_3$  mit dem Homologie-Modell von  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin.

**A:** Die Bindung von Arg. Die Arginingruppe von c-(RGDfNMeVal-) wird hauptsächlich durch end-on Bindung mit Asp<sup>218</sup> und zusätzlich durch end-on Bindung zu Asp<sup>150</sup> der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden.

**B:** Die Überlagerung eines Homologie-Modells von  $\alpha_{IIb}$  mit  $\alpha_v$  zeigt, dass ( $\alpha_v$ )-Asp<sup>218</sup> nicht konserviert ist. Der entsprechende Phe Rest in  $\alpha_{IIb}$  erlaubt keine side-on Stabilisierung. Der dem ( $\alpha_v$ )-Asp<sup>150</sup> entsprechende Rest in  $\alpha_{IIb}$  ist ein Glu, das end-on binden kann. Der entsprechende Loop ist in den zwei Integrinen nicht konserviert.

**C:** Während in  $\alpha_v$  das Arg sich in eine negativ geladene Tasche des Proteins einschleibt (oben) ist diese Tasche in  $\alpha_{IIb}$  viel kleiner (unten), so dass sowohl Arg als auch Gly sterische Wechselwirkungen mit dem Protein zeigt, die die Spezifität dieses Liganden für  $\alpha_v$  erhöhen.

### 3.6 Neue Aspekte der Signaltransduktion

Eine genaue Betrachtung des Signaltransduktions-Mechanismus bei Integrinen und bei der Wechselwirkung von G-Proteinen mit den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zeigt konzeptionelle Ähnlichkeiten, die einen allgemeinen Mechanismus beider Signaltransduktionen nahe legen (Abb. 3.6).

In beiden Fällen existiert eine inaktive Konformation, die durch intra- oder extrazelluläre Signale aktiviert wird. Im Falle der Integrine scheint die Aktivierung

eine Rotation einer der Untereinheiten zu sein, wie es Rechnungen nahe legen.<sup>[92]</sup> In GPCR schließt die Aktivierung ebenfalls eine strukturelle Reorganisation von Helices ein (Abb. 3.6, I).<sup>[93-98]</sup>

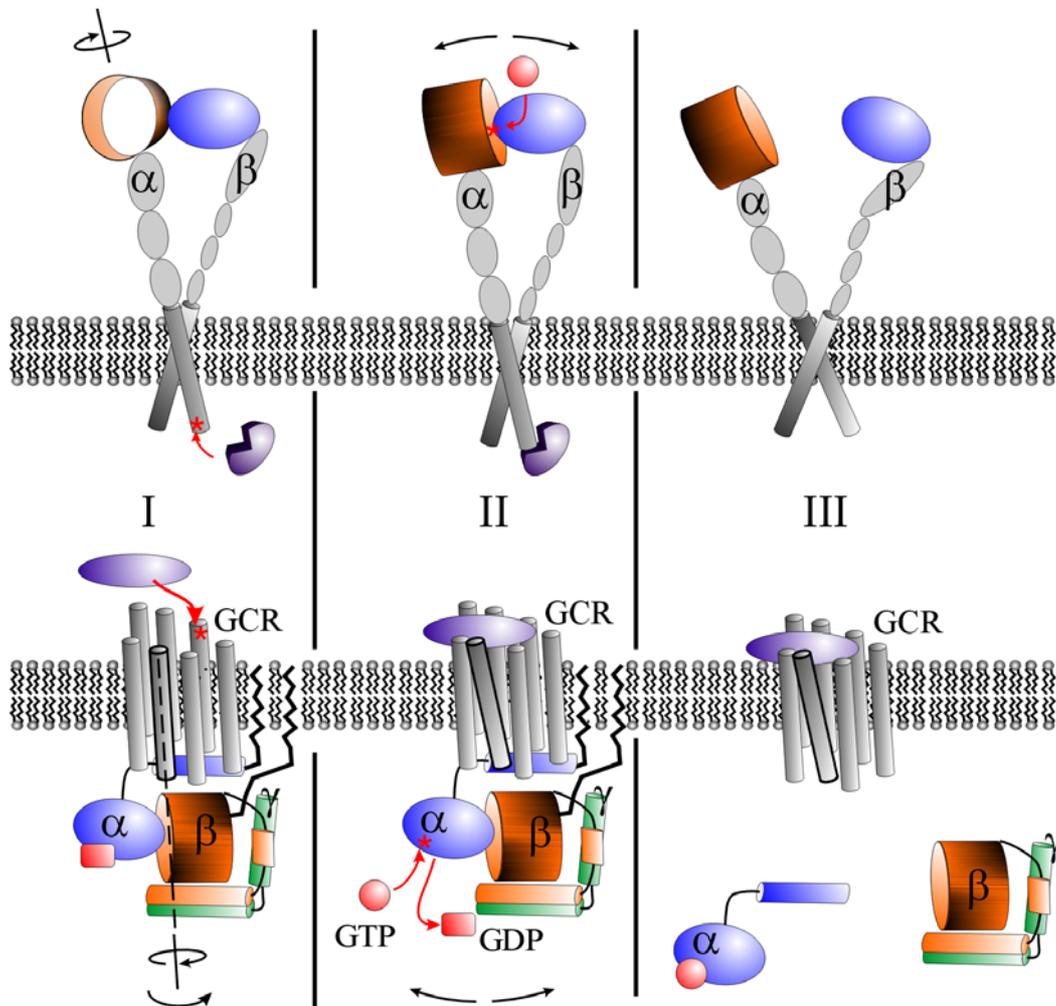


Abb. 12: Ähnlichkeiten bei der Signaltransduktion von Integrinen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

In beiden Fällen induziert ein Ligand eine Reorganisation der transmembranen Helices (links, Teilbild I). Diese Konformationsänderung wird zur Ligandenbindungsdomäne auf der anderen Seite der Membran geleitet, wodurch nun Bindung erfolgen kann (beim Integrin) oder Ligandenaustausch stattfindet (bei GPCR) (Mitte, Teilbild II). Dieser Prozess führt zur Separation der zwei Domänen nahe der Bindungsregion (rechts, Teilbild III). Diese Trennung ist der Startpunkt für weitere Signalkaskaden.

Der Konformationsänderung folgt im Falle der Integrine die Bindung der extrazellulären Liganden,<sup>[25]</sup> bei den GPCRs führt dies zum Ersatz des GDP durch GTP (Abb. 3.6, II). Die Bindung von Liganden oder der Ersatz von GDP durch GTP

---

induziert weitere Strukturänderungen: bei den Integrinen dissoziieren die Kopfgruppen, in den G-Proteinen dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit vom  $\beta\gamma$ -Komplex (Abb. 3.6, III).<sup>[26, 99]</sup> Hier wird die konzeptionelle Ähnlichkeit auch auffallende strukturelle Ähnlichkeiten reflektiert: die Struktur der Grenzschichten der interagierenden Domänen entsprechen sich weitgehend.<sup>[39, 100, 101]</sup> Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen stabilisieren die Assoziation bei  $\alpha_v\beta_3$ , nicht jedoch für G-Proteine. Dort führt ein Netzwerk von Salzbrücken zu starken Wechselwirkungen. Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen sind sehr gut geeignet für die Regulation der Affinität von Interaktionen zwischen Protein-Domänen, weil bereits geringe strukturelle Änderungen eine attraktive Wechselwirkung in eine repulsive umwandeln können. Die dann folgende Dissoziation ist Startpunkt für eine Kaskade weiterer Ereignisse. Bei den Integrinen ist dies die Interaktion mit anderen Rezeptoren und Cluster-Bildung.<sup>[102]</sup> Das sich herauskristallisierende gemeinsame Thema ist ein Mechanismus, der drei Zustände (ein inaktiver, ein aktivierter und ein dissoziierter) einschließt, denen Cluster-Bildung folgt.

## **4. Modellierung eines 4-Helix Bündels durch systematisches Absuchen des Konformationsraumes von Helixpaaren.**

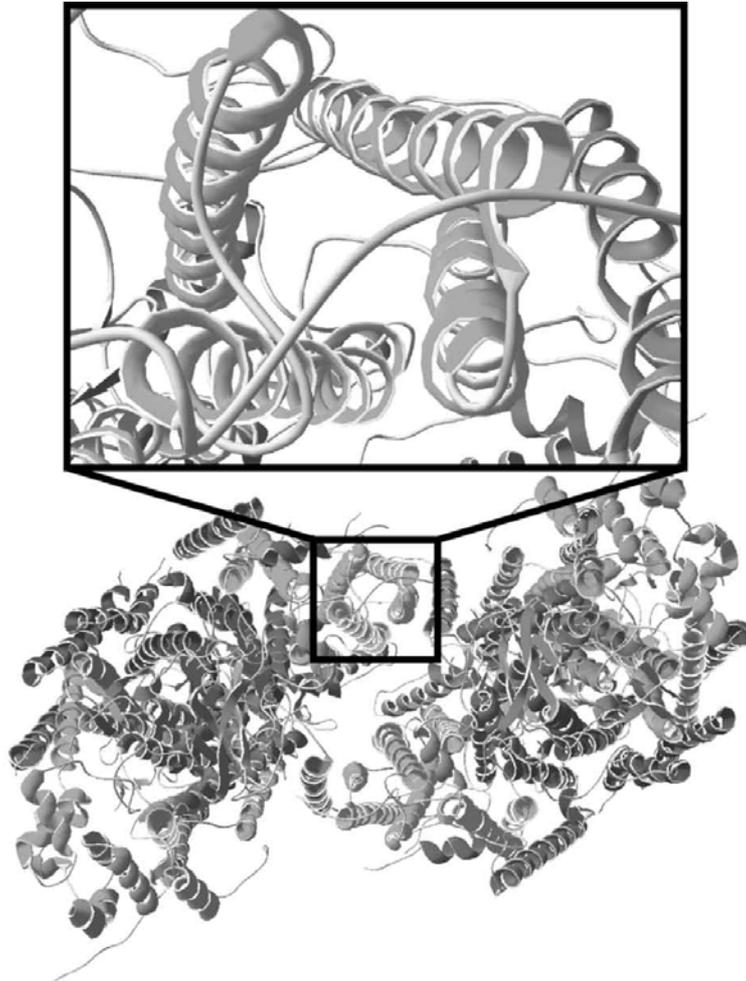
### **4.1 Einleitung**

Wie in Kapitel 1 erwähnt, kann die Faltung eines Membranproteins als ein Mehrstufen-Prozess begriffen werden. Die einzelnen Helices werden zunächst in die Membran insertiert und assoziieren sich in einem nachfolgenden Schritt.<sup>[1, 13, 14]</sup> Dies hat zu dem Vorschlag geführt, auch polytope Membranproteine durch eine systematische Absuche des Konformationsraumes der möglichen Helixpaare zu modellieren.<sup>[21]</sup> Der Vorteil einer solchen Betrachtungsweise liegt in der Reduktion des Vielkörperproblems zu einer Reihe von Zwei-Körperproblemen. Am Beispiel des homo-pentameren Phospholambans wurde gezeigt, dass eine solche Reduktion zu einem vergleichbaren Ergebnis führt wie die Betrachtung des Gesamtproteins.<sup>[21]</sup> Da jedoch die Struktur des Phospholambans nicht bekannt ist, kann die Qualität der Modelle nur schlecht abgeschätzt werden. Neuere Untersuchungen sprechen für eine andere Helix-Anordnung als von dem ursprünglichen Modell beschrieben.<sup>[21, 103-123]</sup> Für nicht-symmetrische Proteine ist die Optimierung des Gesamtproteins mit einer systematischen Absuche des Konformationsraumes nicht möglich, da die Anzahl der Freiheitsgrade exponentiell mit der Anzahl der Helices ansteigt. Hier soll nun versucht werden, eine Teilstruktur der Cytochrom C Oxidase mit einer Konformationsraum-Suche der möglichen Helixpaar Kombinationen nachzumodellieren. Die Struktur des Proteins ist bekannt und sehr komplex.<sup>[124]</sup> Der betrachtete Teilabschnitt des Proteins bildet ein 4-Helix-Bündel (Abb. 4.1). Da die Struktur des Bündels bekannt ist, lässt sich die Methode an diesem Beispiel gut überprüfen.

### **4.2 Methode**

Das Vier-Helix-Bündel wird in vier Helixpaare, Helix 1 und Helix 2, Helix 2 und Helix 3, Helix 3 und Helix 4 sowie Helix 4 und Helix 1 aufgeteilt. Mögliche Kombinationen wie Helix 1 und Helix 3 oder Helix 2 und Helix 4 werden außer acht

gelassen. Wie schon bei den Integrinen, werden auch hier die Rotationswinkel eines jeden Helixpaares systematisch verändert, um die Helix-Packung zu optimieren. Die Rechnungen erfolgen wie bei Adams et al.<sup>[20]</sup> beschrieben. Die erhaltenen Strukturen werden in Cluster zusammengefasst. Für jedes Cluster wird eine repräsentative Struktur errechnet.



*Abb. 4.1: Struktur der Cytochrome C Oxidase.*

Die Oxidoreduktase ist ein komplexes, homo-dimeres Transmembranprotein mit vielen Helices (unten). Die betrachtete Untereinheit C hat ein zentrales 4-Helix-Bündel (oben). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, dieses Bündel zu modellieren.

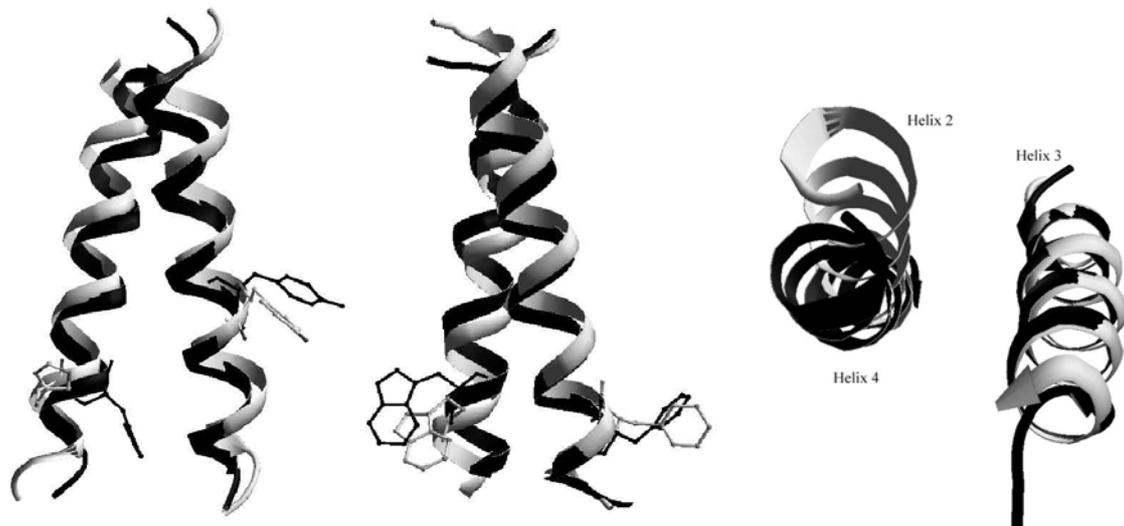
### 4.3 Ergebnisse

In Tabelle 4.1 sind die RMSD der einzelnen Cluster zu der experimentellen Struktur dargestellt. Wie in der Tabelle zu sehen ist, werden nicht alle Helixpaare mit zufriedenstellender Genauigkeit modelliert. Während das Paar Helix 3 und Helix 4 einen Cluster aufweist, der einen RMSD zur experimentellen Struktur von 1.6 Å aufweist und somit nahezu richtig modelliert wurde (Abb. 4.2 mitte), wurde für das Paar Helix 2 und Helix 3 kein Cluster gefunden, der einen besseren RMSD als 2.4 Å aufweist. Bei diesem Cluster ist eine korrekte Helixorientierung nicht gegeben (Abb. 4.2 links). Aus diesen Rechnungen lässt sich kein 4-Helix-Bündel formen. Das beste Cluster des Paares 23 ist so orientiert, dass Helix 2 an der Position der Helix 4 liegt (Abb. 4.2 rechts) und dadurch eine sinnvolle Anordnung der Helices zu einem Bündel nicht möglich ist.

**TABELLE 4.1:**  
*RMSD der Cluster zu der Röntgenstruktur*

*Der jeweils kleinste RMSD-Wert ist fett dargestellt. Es werden nur die Paare 12 und 34 mit ausreichender Genauigkeit ( $< 2 \text{ \AA}$  RMSD) errechnet, die beiden anderen Paare zeigen  $\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$ .*

Cluster	Occ-Paar 12	Occ-Paar 23	Occ-Paar 34	Occ-Paar 41
1	3.6	3.7	3.1	<b>2.3</b>
2	4.5	3.5	<b>1.6</b>	<b>2.3</b>
3	2.2	2.5	2	3.2
4	3.5	3.4	3	4.2
5	3.1	<b>2.4</b>	4.2	3.7
6	3.7	2.6	2.1	3.8
7	<b>1.9</b>	4.1	3.3	5.5
8	2.9	4	3.8	5.3
9	5	3.8	3.9	4.8
10	5.3	4.6	4.4	
11	3.5	5	4.9	
12		4.9		
13		5.3		
14		4.4		



*Abb. 4.2: Vergleich zwischen modellierter und Kristallstruktur.*

Für das Helixpaar 23 (links) wurde kein Cluster mit korrekter Helixorientierung gefunden. Wie am Histidin der linken Helix zu sehen ist, ist diese Helix um ca. 100 Grad gedreht. Das Helixpaar 34 (mitte) hingegen wurde richtig modelliert. Aus diesen Rechnungen lässt sich kein 4-Helix-Bündel formen, da bei Betrachtung der besten Cluster Helix 2 und Helix 4 übereinandergelegt werden (rechts)

#### 4.4 Diskussion

Wenn auch konzeptionell vielversprechend, so führt die Aufteilung eines Helixbündels in eine entsprechende Anzahl von Helixpaaren im gewählten Beispiel nicht zum gewünschten Erfolg. Zwar werden Teilaspekte des Bündels richtig modelliert (insbesondere das Helixpaar Helix 3 und Helix 4), doch ist es nicht möglich, eine zufriedenstellende Gesamtstruktur zu erstellen. Weiterhin erscheint es schwierig, ohne Kenntnis detaillierter experimenteller Daten zwischen den Clustern einer jeden Paarsuche zu unterscheiden. Das für die Integrine angewendete Verfahren einer parallelen Modellierung homologer Sequenzen ist für größere Protein sehr aufwendig und scheint wenig praktikabel, wenn auch nicht unmöglich. Ein Vorteil des Verfahrens ist, dass Teilaspekte eines Proteins, die von besonderem Interesse sind (wie z.B. die Kanal-bildenden Helices eines Ionenkanals) gut modelliert werden können, sofern experimentelle Daten vorliegen, da auch die internen Freiheitsgrade einer Helix durch das SA/MD Verfahren berechnet werden.

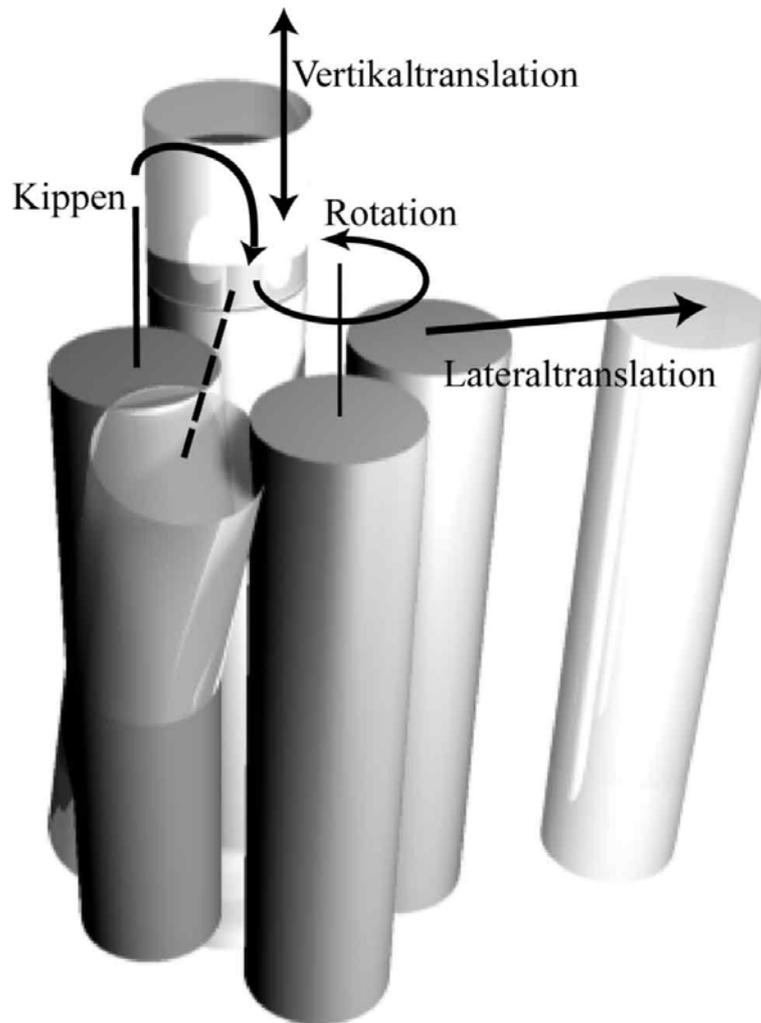
## **5. Modellierung eines 4-Helix-Bündels mit Hilfe einer Zufallsbibliothek von Konformationen.**

### **5.1. Einleitung**

Wie oben gezeigt kann für ein Helixpaar der Konformationsraum mit einem SA/MD Verfahren systematisch abgesucht werden. Die Dauer dieses Vorganges wird durch zwei Faktoren bestimmt: durch die Anzahl der möglichen Helix-Orientierungen, und durch die Anzahl der zu simulierenden Atome. Das erste ist ein kombinatorisches Problem: die Anzahl der möglichen Helixorientierungen steigt exponentiell mit der Anzahl der zu untersuchenden Helices an. Das zweite ist ein Rechenproblem: eine Moleküldynamik-Rechnung ist abhängig von der Anzahl der zu berechnenden Atome. Auch hier ist der Anstieg der Rechenzeit exponentiell. Während für das Helixpaar 512 Strukturen in ca. einer Woche berechnet wurden, müssten für ein 4-Helix Bündel bei gleicher Auflösung 32768 Strukturen berechnet werden, was einem Zeitaufwand von über einem Jahr auf einem R10000 Prozessor entspricht. D.h., das oben vorgestellte Verfahren, welches ein Helixpaar mit ausreichender Genauigkeit berechnen kann, ist für größere Systeme ungeeignet. Wie weiterhin gezeigt wurde, führt eine modulare Betrachtungsweise, die das Protein aus Helixpaaren zusammensetzt, nicht zu guten Ergebnissen. Hier wird nun ein neues Verfahren vorgestellt, das ein 4-Helix-Bündel in angemessener Zeit mit hoher Genauigkeit berechnen kann. In diesem Verfahren wird eine Strukturbibliothek erstellt, die den Konformationsraum eines 4-Helix-Bündels nahezu vollständig abdeckt.

### **5.2. Methode**

Jede Helix in einem Helix-Bündel hat vier externe Freiheitsgrade (Abb. 5.1), die simultan optimiert werden müssen, um zuverlässig die Struktur eines solchen Bündels vorherzusagen. In der vorliegenden Arbeit wird dazu eine Strukturbibliothek erstellt. Die Erzeugung dieser Strukturen erfolgt durch eine zufällige Zuordnung eines Rotationswinkels um die Helix-Längsachse, eines Wertes für Lateral- (in der Membranebene) und Vertikal-Translation (senkrecht zu Membranebene) sowie eines Kippwinkels für jede Helix. Die erzeugten Strukturen werden kurz energieminiert.

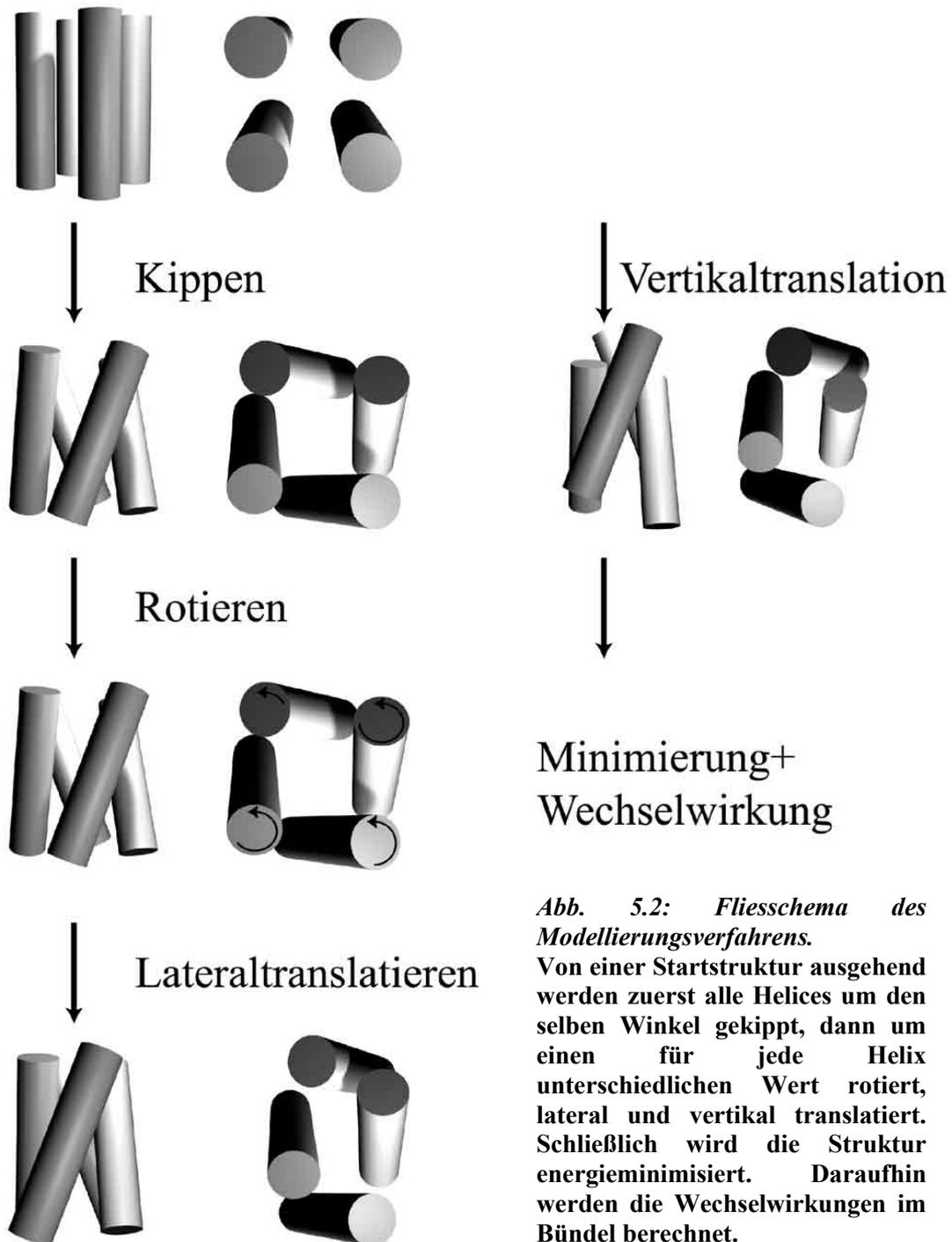


*Abb. 5.1.: Methode: Simultane Optimierung der vier Externen Freiheitsgrade einer Helix im Bündel.*

Eine Helix kann lateral und vertikal zur Membranebene translatiert werden, um die Längsachse rotiert oder aber gekippt werden. Im vorgestellten Verfahren werden für ein 4-Helix-Bündel diese vier Parameter für jede Helix individuell um einen zufälligen Wert verändert.

Eine Dynamikrechnung erfolgt nicht. Nach der Minimierung wird die nicht-kovalente Wechselwirkung einer jeden Helix mit dem Rest des Proteins individuell berechnet. Die Gesamtenergie kann durch Aufsummierung der einzelnen Helix-Restprotein-Wechselwirkungen berechnet werden. Das Verfahren besteht also aus verschiedenen Schritten, denen die Auswertung nachgeordnet ist (Abb. 5.2).

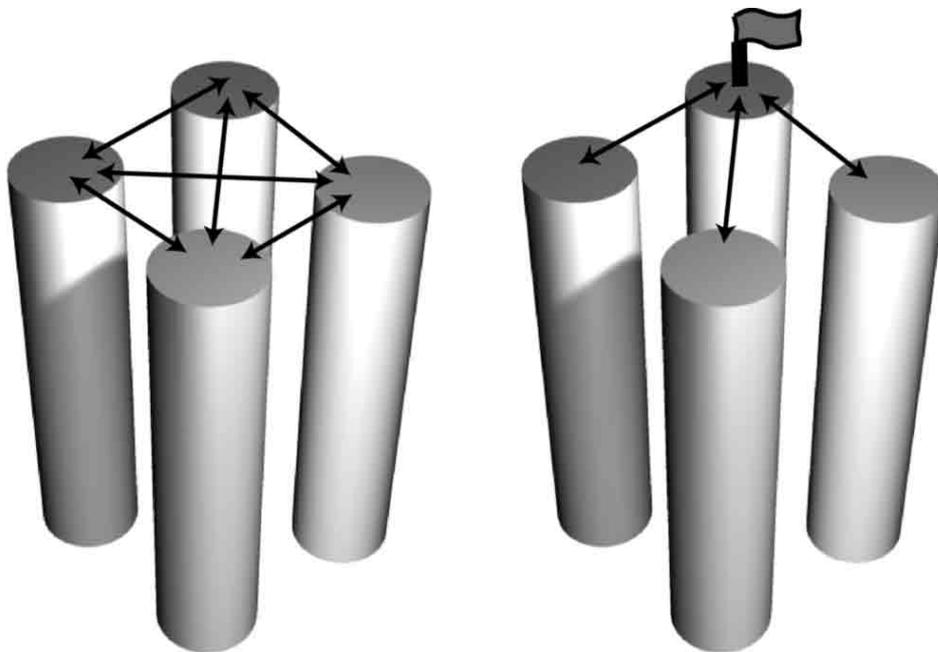
## Seitenansicht    Aufsicht



*Abb. 5.2: Fließschema des Modellierungsverfahrens.*

Von einer Startstruktur ausgehend werden zuerst alle Helices um den selben Winkel gekippt, dann um einen für jede Helix unterschiedlichen Wert rotiert, lateral und vertikal translatiert. Schließlich wird die Struktur energieminimiert. Daraufhin werden die Wechselwirkungen im Bündel berechnet.

Um ein optimales Auswertverfahren zu realisieren, wurde zunächst in einem Testlauf von der Kristallstruktur ausgegangen und nur der Rotationswinkel und die Vertikaltranslation verändert. An Hand dieses Testlaufes konnte die Abhängigkeit der Winkelverteilung von der Wechselwirkungsenergie untersucht werden. Die endgültige Auswertung erfolgte auf drei Arten: Zum einen dient die Gesamtenergie der Wechselwirkungen zwischen den Helices als Kriterium, zum anderen wird jede Helix individuell betrachtet. Dabei stellt die Wechselwirkungsenergie zwischen der betrachteten Helix und dem Rest des Proteins das Unterscheidungskriterium dar (Abb. 5.3). Für dieses Energiekriterium wird jeweils die energieärmste Konformation betrachtet. Außerdem werden die Verteilungen der 0.5% energieärmsten Konformationen ausgewertet.



*Abb. 5.3: Methoden der Auswertung.*

Zwei Kriterien werden bei der Auswertung getrennt betrachtet. Zum einen wird die Gesamt-Wechselwirkungsenergie des Systems betrachtet, also die Wechselwirkungen aller Helices miteinander (links). Eine andere Auswertung betrachtet jede Helix individuell (rechts, mit Fahne). Von dieser Helix wird die Wechselwirkung mit dem Restprotein für die betrachtete Struktur berechnet. Die Wechselwirkungen der anderen Helices untereinander werden nicht berücksichtigt.

### 5.3. Optimierung einer Teilstruktur der Oxidoreduktase

#### 5.3.1 Generierung der Startstrukturen

Bei einem 4-Helix-Bündel müssen zwei Startstrukturen generiert werden, die sich in der relativen Anordnung ihrer Helices unterscheiden (Abb. 5.4A). Die beiden Anordnungen sind die möglichen Stereoisomere eines 4-Helix-Bündels. Da im vorliegenden Fall jedoch nur das Verfahren getestet werden soll, wurde auf die Startstruktur mit falscher relativer Helixanordnung verzichtet, um Rechenzeit zu sparen. Als Startstrukturen wurden ideale Helices generiert, die sich in einem Abstand von 10.5 Å voneinander befinden (Abb. 5.4B). Die geometrischen Zentren der Rückgrad-Atome der Helices wurden dabei auf eine Höhe gesetzt, der Kippwinkel war 0 Grad. (Abb. 5.4B).

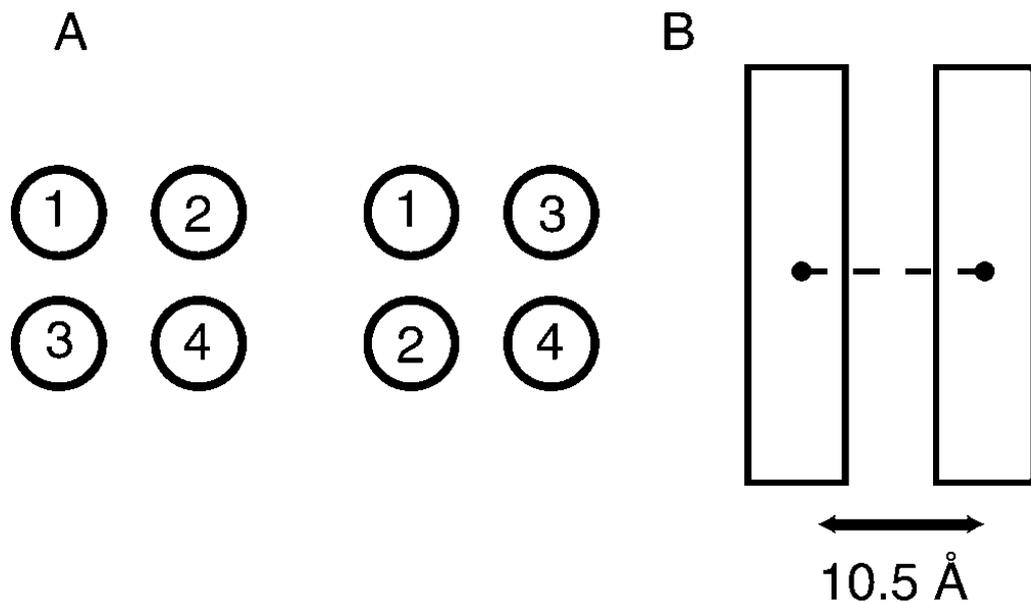


Abb. 5.4: Parameter der Startstruktur.

**A:** Ein 4-Helix-Bündel hat zwei Stereoisomere. Für den Test des Verfahrens wurde nur die korrekte Helixanordnung gewählt.

**B:** Die Zentren benachbarter Helices waren 10.5 Å voneinander entfernt und auf gleicher Höhe. Die Helices waren parallel mit einem Kippwinkel von 0 Grad.

---

### 5.3.2 Erzeugung der Strukturbibliothek

Die Strukturbibliothek wurde - wie oben beschrieben - durch zufällige Zuordnung jeweils eines Wertes für die vier Freiheitsgrade pro Helix erzeugt. Die Startstrukturen wurden entsprechend modifiziert. Der Rotationswinkel wurde dabei von  $0^\circ$  bis  $360^\circ$  variiert. Die Lateraltranslation erfolgte von  $-2 \text{ \AA}$  (zum Zentrum des Bündels hin) bis  $4 \text{ \AA}$  (vom Zentrum des Bündels weg). Der Kippwinkel wurde vom  $0^\circ$  bis  $40^\circ$  variiert, und die Vertikaltranslation erfolgte um jeweils  $4 \text{ \AA}$  nach oben und unten.  $4 \text{ \AA}$  entsprechen dem Hub einer Helixwindung, also einer Unsicherheit in der Lateraltranslation von ca. 4 Aminosäuren in jede Richtung, insgesamt also 8 Aminosäuren. Dies ist ungefähr die Genauigkeit von Vorhersageprogrammen für transmembrane Sequenzabschnitte. Die so gebildeten Strukturen wurden mit 50 Schritten einer Powell-Minimierung energieminiert, um mögliche ungünstige sterische Wechselwirkungen zu beseitigen.

Es wurde eine Bibliothek mit insgesamt  $2 \cdot 10^5$  Strukturen erstellt.

## 5.4 Ergebnisse

### 5.4.1 Die Struktur mit der niedrigsten Gesamt-Wechselwirkungsenergie.

Nach Auswertung der Strukturbibliothek durch Berechnung der Gesamtenergie des Helix-Bündels konnte für jede Helix genau ein Wert für die vier Parameter (Kippwinkel, Rotation, Vertikaltranslation und Lateraltranslation) ermittelt und daraus die Struktur des Helix-Bündel errechnet werden. Die Parameter-Werte der Freiheitsgrade der Struktur mit niedrigster Gesamtenergie sind in Tabelle 5.1 gezeigt (Modell 1), zusammen mit dem RMSD der daraus resultierenden Struktur mit der Röntgenstruktur. Der RMSD zwischen Modell und Struktur beträgt  $3.7 \text{ \AA}$ . Dies kann zwar als Startpunkt für eine weitere Verbesserung der Struktur mit experimentellen Daten dienen, ist jedoch als Ergebnis unbefriedigend.

TABELLE 5.1:

*Parameter der verschiedenen Modelle und RMSD zur experimentellen Struktur.*

		Modell 1 <sup>1</sup>	Modell 2 <sup>2</sup>	Modell 3 <sup>3</sup>	Modell 4 <sup>3</sup>	Modell 5 <sup>3</sup>	Modell 6 <sup>3</sup>
<b>Helix 1</b>	<b>Rotation</b>	22	-67	-48	-48	-48	-48
	<b>Vertikaltranslation</b>	1.4	-1.2	1	1	1	1
	<b>Lateraltranslation</b>	1.7	0	-0.5	-0.5	-0.5	-0.5
	<b>Kippwinkel</b>	12	28	12.5	12.5	12.5	12.5
<b>Helix 2</b>	<b>Rotation</b>	35	143	19	19	117	117
	<b>Vertikaltranslation</b>	-1	-0.4	1	1	1	1
	<b>Lateraltranslation</b>	-1	-4.2	-1.4	-1.4	-1.4	-1.4
	<b>Kippwinkel</b>	23	11	7.5	7.5	7.5	7.5
<b>Helix 3</b>	<b>Rotation</b>	139	99	140	247	140	247
	<b>Vertikaltranslation</b>	-2.4	0	-3	-3	-3	-3
	<b>Lateraltranslation</b>	1.7	-3.6	0.5	0.5	0.5	0.5
	<b>Kippwinkel</b>	20	4.4	7.5	7.5	7.5	7.5
<b>Helix 4</b>	<b>Rotation</b>	45	61	55	55	55	55
	<b>Vertikaltranslation</b>	-3	0.8	1	1	1	1
	<b>Lateraltranslation</b>	1.7	-3.6	-1.5	-1.5	-1.5	-1.5
	<b>Kippwinkel</b>	17	24	15	15	15	15
<b>RMSD</b>		<b>3.7</b>	<b>3.4</b>	<b>3.0</b>	<b>2.6</b>	<b>2.5</b>	<b>2.0</b>

*1: Modell aus Betrachtung der Gesamtwechselwirkungsenergie aller Helices*

*2: Modell aus individueller Betrachtung der Wechselwirkungsenergie für jede Helix*

*3: Modell aus Betrachtung der Parameterverteilungen für die 1000 Strukturen mit der niedrigsten Wechselwirkungsenergie individuell für jede Helix.*

#### 5.4.2 Die Struktur mit der niedrigsten Helix-Helix Wechselwirkungsenergie pro Helix

Für die zweite Auswertungsmethode wurde nicht mehr die Gesamtenergie betrachtet, sondern die Wechselwirkungsenergie jeder einzelnen Helix mit dem Rest des Proteins. Dabei wurde für jede einzelne Helix die Parameterkombination gewählt, die zu der niedrigsten Wechselwirkungsenergie für diese betrachtete Helix geführt hat. Diese Parameterkombination ist in Tabelle 5.1 als Modell 2 gezeigt. Wenn auch diese Auswertung bessere Ergebnisse liefert als die Betrachtung der Gesamtenergie

---

(der RMSD zur experimentellen Struktur beträgt 3.4 Å), müssen dennoch Verfahren entwickelt werden, die eine genauere Vorhersage ermöglichen.

### 5.4.3 Abhängigkeit der Rotationswinkelverteilung von der Wechselwirkungsenergie

Am Beispiel der Helix 1 des betrachteten Helix-Bündels wird dargestellt, wie die Winkelverteilung von der Wechselwirkungsenergie abhängt. Zur Untersuchung der besten Auswertemethode wurden zunächst nur die Vertikaltranslation und Rotation verändert. Dabei wurde untersucht, inwieweit die Verteilung der Rotationswinkel von der Wechselwirkungsenergie der einzelnen Helix mit dem Restprotein abhängig ist. Für diese Betrachtung wurde zunächst nicht von einer zufälliger Helix-Anordnung, sondern von der Kristallstruktur ausgegangen. Ein Rotationswinkel von 0 Grad entspricht also dem gewünschten Ergebnis. Die Rechnungen erfolgten mit dem Wildtyp-Protein und zusätzlich mit neun homologen Proteinen simultan. Die homologen Proteine wurden mit einer Blast-Suche der swissprot Datenbank gefunden. Es wurden sowohl die Summe der nicht-bindende Energien als auch die Energie der Einzelkomponenten (van-der-Waals Energie und elektrostatische Wechselwirkungen) betrachtet. Wie in Abb. 5.5 gezeigt lässt sich die Wechselwirkungsenergieverteilung gut als Gauß'sche Verteilung beschreiben.

Werden nur die Konformationen betrachtet, bei denen Helix 1 Wechselwirkungen mit einer Wechselwirkungsenergie  $E_{nb}$  (nb: non-bonded) kleiner als 0 KJ/mol (OPLS-Energie im Vakuum) der Energieverteilung aufweist (also eine anziehende Wechselwirkung beschreibt), zeigt sich, dass die Rotationswinkel nicht ganz gleichverteilt sind. Es lässt sich jedoch kein Präferenz-Winkel ablesen.

Bei den Konformationen mit einer Energie  $E_{nb} < m-s$ , wobei  $m$  der Mittelwert der Energieverteilung und  $s$  die Standardabweichung sind, ist bereits deutlich ein bevorzugter Winkel zu erkennen, der neben zwei weiteren Winkeln vorliegt. Es ist zu erwarten, dass drei Vorzugswinkel gefunden werden, da der Winkel zwischen zwei Aminosäureresten in einer  $\alpha$ -Helix  $100^\circ$  beträgt, pro Helixwindung also 3.6 Aminosäuren auftreten. Wenn man bedenkt, dass eine bevorzugte Packung für Helices die sogenannte *knobs-into-holes* Packung ist (was bedeutet, dass eine

Aminosäure der einen Helix (*knob*) am ehesten zwischen zwei Resten (*holes*) der wechselwirkenden Helix packt), werden also 3-4 bevorzugte Winkel erwartet.

Werden nur die Konformationen betrachtet, bei denen die Wechselwirkungsenergie  $E_{nb} < m-2s$  ist, tritt nur noch ein einziger Winkel mit sehr geringem Beitrag der Neben-Maxima in der Verteilung auf. Das Hauptmaximum kann mit einer Gauß-Kurve angenähert werden. Der Mittelwert dieser Gauß-Kurve wird dann als richtiger Rotationswinkel für die betrachtete Helix angesehen. Analog wird mit den restlichen Freiheitsgraden verfahren.

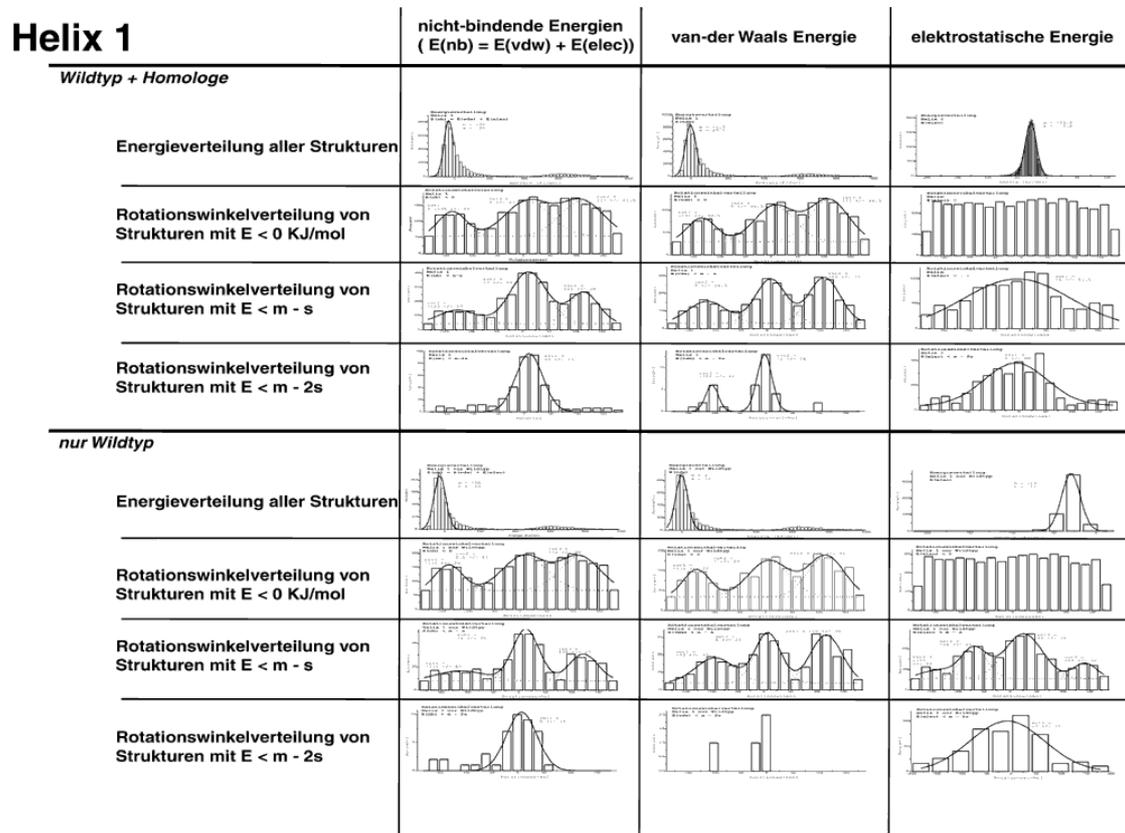


Abb. 5.5: Rotationswinkelverteilung in Abhängigkeit von der Wechselwirkungsenergie.

Am Beispiel von Helix 1 wird gezeigt, wie die Verteilung der Rotationswinkel von der Wechselwirkungsenergie der betrachteten Konformationen abhängt. Je niedriger man den *cut-off* der Wechselwirkungsenergie ist legt, desto klarer ist das Maximum der Verteilung beim richtigen Wert. Es kann also die Wechselwirkungsenergie der einzelnen Helix mit dem Restprotein gut als Unterscheidungskriterium zwischen verschiedenen Konformationen dienen, obwohl weder die Membran noch die Loops berücksichtigt wurden.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind ein schlechtes Kriterium für die Güte der Konformation da die Verteilungen sehr breit sind. Der Mittelwert der Rotationswinkelverteilung in Abhängigkeit von der van-der-Waals Energie ist nahezu identisch mit dem Mittelwert der Rotationswinkelverteilung in Abhängigkeit von der Summe der nicht-bindenden Energien. Die Anzahl der Strukturen und damit die Stichprobengröße ist jedoch bei Betrachtung der Verteilung in Abhängigkeit von der Summe der nicht-bindenden Energien größer. Da eine höhere Stichprobengröße die Verlässlichkeit der Methode verbessert, ist die genaueste Größe zur Beurteilung der Winkelverteilung die Summe der nicht-bindenden Anteile. Es scheint also, als ob die Spezifität der Wechselwirkungen im Wesentlichen von den van-der-Waals Wechselwirkungen herrührt, die elektrostatischen Kräfte hingegen zur Stabilität beitragen.

Die Betrachtung von homologen Proteinen zusätzlich zum Wildtyp-Protein verlängert die Rechenzeit enorm, ohne jedoch einen wesentlichen Informationsgewinn zu bieten. Daher wurden für die Rechnungen des 4-Helix Bündels nur die Wildtyp-Sequenz betrachtet. Sämtliche Parameter wurden verändert und die Summe der nicht-bindenden Wechselwirkungen als Kriterium für die Güte der Konformation gewählt. Da die Energieverteilung mit einer Gauß-Verteilung angenähert werden kann, für die gilt, dass 0.5% der Werte außerhalb von  $m \pm 2s$  (mit  $m$  als Mittelwert der Energieverteilung und  $s$  der Standardabweichung der Verteilung) sind, werden in der weiteren Auswertung jeweils nur die 0.5% energieärmsten Konformationen betrachtet. Im vorliegenden Fall werden also bei insgesamt 200000 Konformationen die 1000 energieärmsten ausgewertet.

#### 5.4.4. Auswertung der Parameterverteilungen

Die Werte der Freiheitsgrade, die durch die oben beschriebene Auswertung erhalten wurden, sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Die Verteilungen sind bei gleichzeitiger Optimierung aller vier Freiheitsgrade breiter als bei dem Testdurchlauf. Während für Helices 1 und 4 eindeutige Werte für die Rotation erhalten wurden, kann bei Helix 2 und Helix 3 nicht zwischen zwei Werten unterschieden werden (Abb. 5.6). Helix 3 hat einen Vorzugswinkel und zusätzlich einen oft populierten Nebenwinkel. Die möglichen Kombinationen der verschiedenen Winkel führen zu vier Modellen (Modelle 3 – 6 in Tabelle 5.1). Es stellt sich heraus, dass der Nebenwinkel für Helix 3

der richtige ist (Tabelle 5.1). Die Struktur mit der Rotationswinkelkombination, die der experimentellen Struktur am ähnlichsten ist, hat einen RMSD von 2.0 Å zur experimentellen Struktur (Tabelle 5.1 und Abb. 5.7). Allerdings ist bei Helix 3 das kleinere Nebenmaximum, und nicht das Hauptmaximum richtig. Leider sind die Ergebnisse nicht eindeutig, können aber mit den resultierenden Strukturen als testbare Hypothesen des Designs von Experimenten dienen. Mit Hilfe von *crosslinking*-Studien oder anderen experimentellen Daten wie Abstandsmessungen bestimmter markierter Aminosäuren mit Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine Unterscheidung zwischen den Modellen möglich.

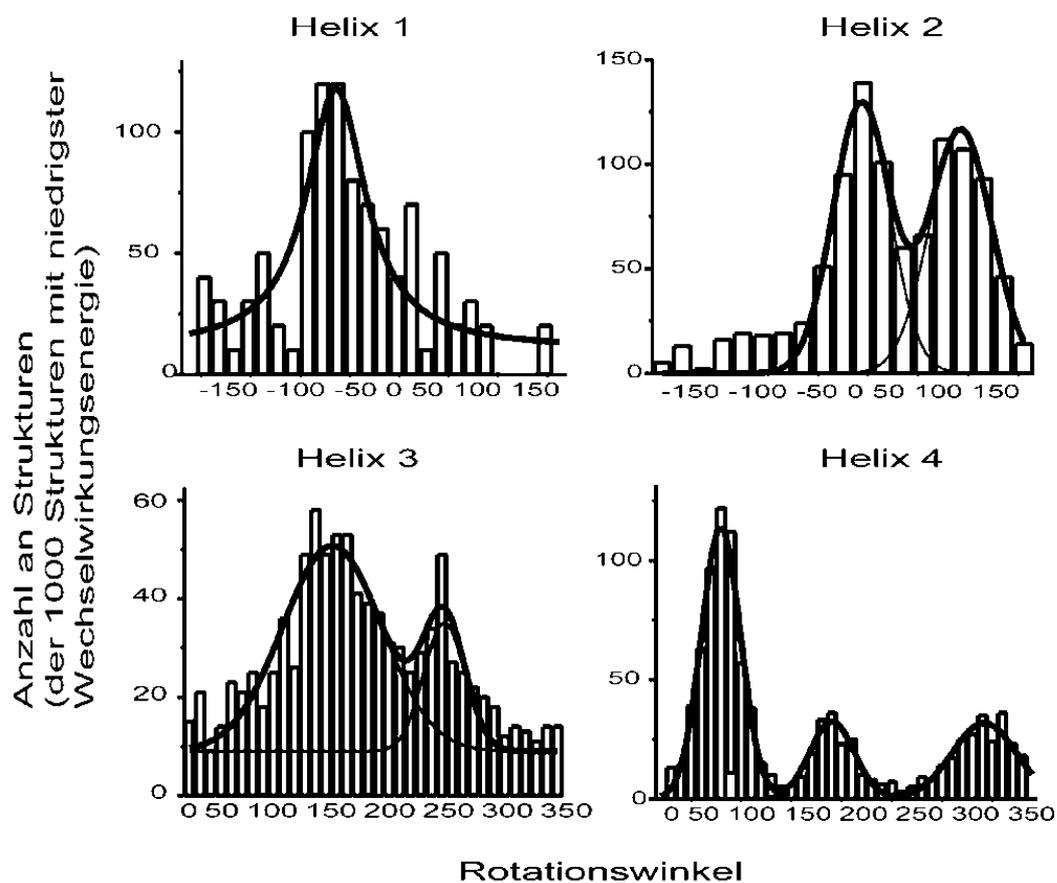
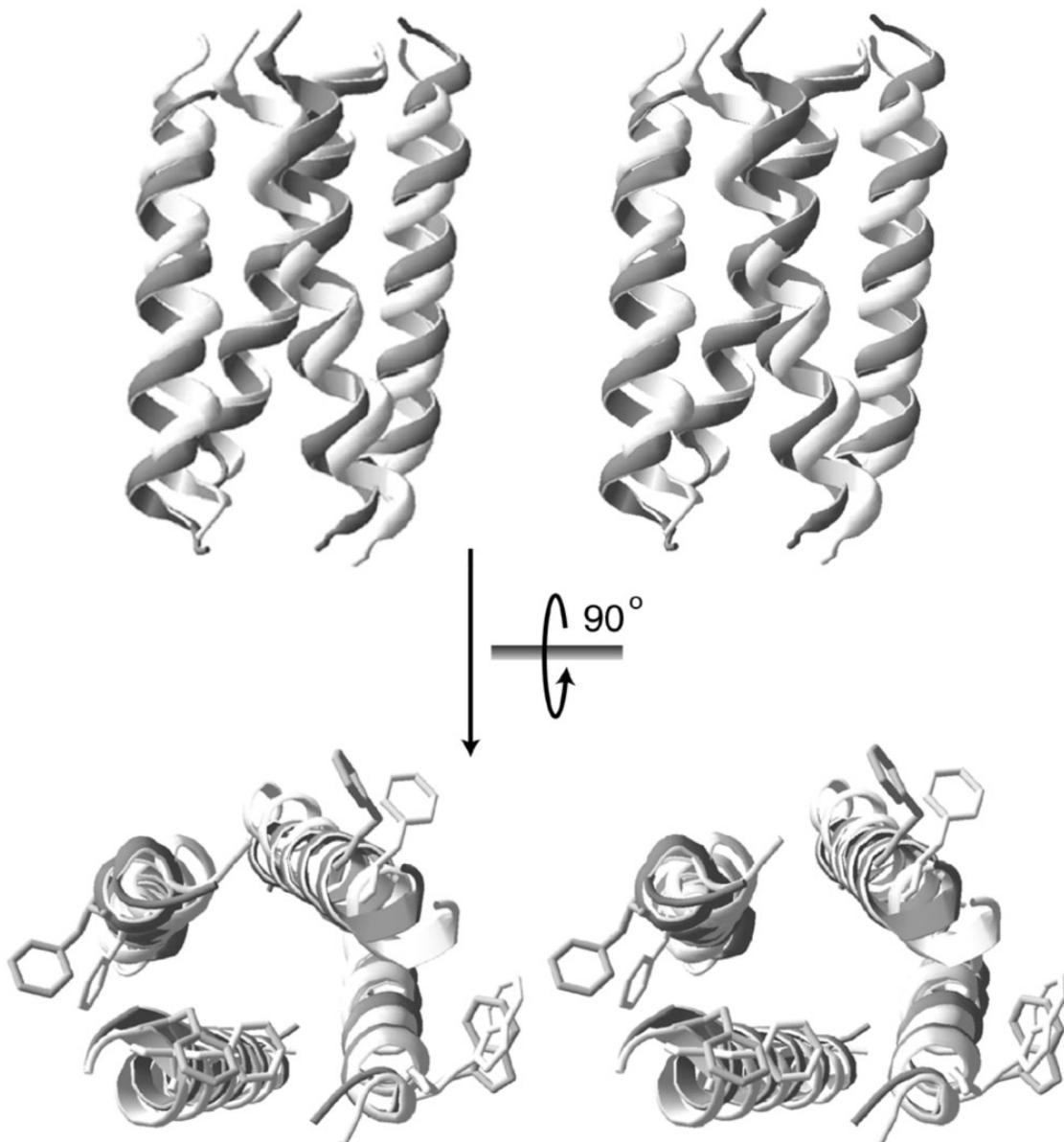


Abb. 5.6: Rotationswinkelverteilung der Helices von *occ*.

Die Rotationswinkelverteilungen der jeweils 1000 energieärmsten Strukturen ist gezeigt. Helix 1 und Helix 4 haben einen eindeutigen Vorzugswinkel, wobei bei Helix 4 noch zwei weitere, wenig populierte Winkel zu sehen sind. Bei Helix 2 liegen 2 ungefähr gleich populierte Winkel vor. Helix 3 hat einen Vorzugswinkel und einen Nebenwinkel. Die beiden Winkelverteilungen überlappen sich. Vergleich mit der Röntgenstruktur zeigt, dass der Vorzugswinkel für Helices 1 und 4 richtig erkannt wurde. Für Helix 2 ist der Winkel um 120 Grad der richtige, während für Helix 3 der Nebenwinkel der Röntgenstruktur entspricht.



*Abb. 5.7: Stereobild der Struktur mit niedrigsten RMSD zur experimentellen Struktur.*

In der Seitenansicht (oben) ist zu erkennen, dass der Kippwinkel und auch die Vertikaltranslation nicht immer richtig errechnet wurde. Hier scheinen neben Helix-Helix Wechselwirkungen auch Helix-Membran oder Helix-loop Wechselwirkungen eine Rolle zu spielen. In der Aufsicht (unten) sieht man, dass die Rotationswinkel sehr gut übereinstimmen. Die Rotationswinkel werden also im Wesentlichen durch Helix-Helix Wechselwirkungen bestimmt, wenn auch andere Einflüsse eine Rolle spielen. So sind die Verteilungen für Helices 2 und 3 nicht eindeutig auszuwerten, was für den Einfluss entweder von weiteren Helices des komplexen Proteins oder aber der Membranumgebung oder *loops* spricht.

## 5.5 Diskussion der Methode

Die Generierung einer Konformationsbibliothek mit einer großen Anzahl von Konformationen hat den Vorteil, dass der Konformationsraum nahezu vollständig abgesucht werden kann. Durch den Verzicht auf eine Simulation des Systems mit einer Dynamikrechnung ist dies in annehmbarer Zeit möglich.

Es hat sich bei der Auswertung weiterhin als vorteilhaft erwiesen, nicht die Gesamtenergie des Systems, sondern die Wechselwirkungen der einzelnen Helices mit dem Restprotein als Kriterium zu verwenden und somit jede Helix für sich genommen einzeln zu optimieren. Vermutlich müssen dadurch nur Teilabschnitte des Proteins, nämlich im Wesentlichen die Helix selbst sowie die beiden benachbarten Helices, eine korrekte Orientierung aufweisen, während die vierte Helix durchaus falsch orientiert sein kann. Die Ursache liegt in der kurze Reichweite der nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Dadurch wird das Vierkörper-Problem effektiv zu einem Dreikörper-Problem reduziert. Dieses Verfahren müsste also auch auf größere Proteine anwendbar sein; allerdings müssen dafür die Anzahl der Freiheitsgrade weiter eingeschränkt werden.

Die besten Ergebnisse liefert nicht die jeweils energieärmste Konformation, sondern eine Auswertung der Verteilung der energieärmsten Konformationen. Jede Struktur, die von einer Verteilung der Parameter gewonnen wurde, ist besser als die beiden Strukturen, die nur die energieärmsten Strukturen berücksichtigen (einmal die Struktur mit der niedrigsten Gesamtenergie und einmal die Struktur, bei der die Parameter der niedrigsten Energie für jede Helix individuell betrachtet wurde). Die Auswertung der Verteilungen hat weiterhin den großen Vorteil, dass Nebenminima der Helix-Wechselwirkung, die auf eine gewisse konformationelle Flexibilität hinweisen können, detektiert werden. Diese Nebenminima in der Wechselwirkung drücken sich durch Neben-Maxima in den Verteilungen aus. Ferner kann durch den Einfluss der Umgebung, z.B. der Membran oder der *loops*, eine Konformation bevorzugt werden, die keine optimalen Helix-Helix-Wechselwirkungen aufweist. Dies scheint der Fall bei Helix 3 zu sein. Auch solche Konformationen mit suboptimaler Helix-Helix-Wechselwirkung können als Nebenmaximum in der Verteilung auftreten und dann durch experimentelle Studien als die richtige

---

Konformation identifiziert werden. Auch theoretische Methoden wie die Betrachtung der Konservierung von Aminosäuren in verwandten Proteinen oder die Berechnung von Membran-exponierten Helixseiten kann zur Unterscheidung der Modelle dienen.<sup>[125]</sup> Gleichzeitig werden weniger mögliche Strukturen erhalten als bei dem systematischen Absuchen des Konformationsraumes mittels MD/SA. So mussten bei dem 4-Helix-Bündel nur zwischen vier möglichen Konformationen entschieden werden, während allein beim systematischen Absuchen der Helixpaare der Integrine ungefähr zehn mögliche Konformationen gefunden wurden, obwohl die Anzahl an Freiheitsgraden geringer war. Der Nachteil der Methode ist sicherlich, dass die Helices sich nicht verwinden oder anderweitig von einer idealen Helix abweichen können, sondern als starre Körper behandelt werden. Die Seitenketten können sich jedoch durch die kurze Minimierung an die jeweilige Konformation adaptieren. Der Nachteil der starren Helices kann unter Umständen durch eine kurze Dynamik-Rechnung nach Optimierung der Packung ausgeglichen werden. Das Verfahren ist sehr sensibel für Rotationswinkel. Die Kippwinkelverteilungen hingegen sind sehr breit, die Ergebnisse ungenau. Dennoch lässt sich das Bündel mit gutem Erfolg modellieren. Rechentechnisch vorteilhaft ist, dass das Verfahren sehr leicht parallelisiert werden kann (man kann auf 4 Prozessoren jeweils 50000 Zufallsstrukturen rechnen oder auf einem Prozessor 200000, ohne den Rechencode ändern zu müssen). Auch können experimentelle Abstandsinformationen durch eine Erweiterung der Energiefunktion mit NOE-artigen Termen inkorporiert werden.

## 6. Modellierung des Multidrug Transporters EmrE

### 6.1 Biologischer Hintergrund

Multidrug Transporter erkennen eine Vielfalt von Substraten mit hoher Affinität. Diese werden dann aktiv aus dem Zytosol entfernt.<sup>[126]</sup> Bei toxischen Substraten wird durch den aktiven Transport zelluläre Resistenz gegen die schädlichen Effekte der Substrate erreicht. Diese Überlebensstrategie ist die Grundlage für die Resistenz einiger Bakterienstämme gegen eine Vielzahl von Antibiotika. Auch einige Tumorklinien werden dadurch resistent gegen Chemotherapie.<sup>[127-129]</sup> Basierend auf Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen wurden die Transporter in verschiedene Klassen unterteilt.<sup>[130, 131]</sup>

Der Transporter EmrE (Ethidium bromide **M**ultidrug **R**esistance protein from *E. coli*) ist 110 Aminosäuren lang und gehört zu der Familie der MiniTexane oder Smr (Small **M**ultidrug **R**esistance) Transporter.<sup>[126, 132, 133]</sup> EmrE kann Acriflavin, Ethidiumbromid, Tetraphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>), Benzalkoniumsalze und verschiedene andere kationische Substanzen mit hoher Affinität transportieren. EmrE ist ein Protonen/Substrat Antiporter, der den elektrochemischen Protonen-Gradienten durch die zytoplasmische Membran des Bakteriums als Energiequelle nutzt. EmrE transportiert ein Substrat-Molekül im Austausch gegen zwei Protonen.<sup>[134]</sup>

Sequenzanalysen sagen vier Helices für EmrE vorher. Dies ist in Übereinstimmung mit Fourier-transformierten Infrarot-Studien.<sup>[135]</sup> Durch hochaufgelöste NMR-Spektroskopie in einem Lösungsmittel-Gemisch konnte die Sekundärstruktur des Proteins genau bestimmt werden. Eine Bestimmung der Tertiärstruktur war durch das Fehlen von Abstandsinformationen zwischen den Helices nicht möglich.<sup>[136]</sup>

Biochemische Studien demonstrieren, dass EmrE funktional als Oligomer vorliegt.<sup>[137]</sup> Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit niedriger Auflösung lassen vermuten, dass es sich um ein Dimer handelt.<sup>[138]</sup>

Es ist gezeigt worden, dass ein zentrales, in der Membran liegendes Glutamat (E14) für die Transportaktivität unabdingbar ist. Selbst konservative Substitutionen wie z.B. mit Aspartat verhindern Transport, nicht jedoch Ligandenbindung. Weiterhin

wurde demonstriert, dass dieses zentrale Glutamat notwendig für Substrat- und Protonenbindung ist.<sup>[139-144]</sup>

Ein Verfahren, auf biochemischen Weg zu Abstandsinformationen zu gelangen, ist das *crosslinking*. Beim *crosslinking* werden spezifische Seitenketten durch Cysteine ersetzt. Reagentien, die mit zwei S-H Gruppen reagieren, können dann mit diesen Cysteinen reagieren. Zwei Cysteine, die sich an verschiedenen Monomeren befinden, werden kovalent verbunden, wenn der Abstand zwischen diesen Cysteinen mit dem Abstand der reaktiven Gruppen übereinstimmt.<sup>[145]</sup>

Neuere *crosslinking* Untersuchungen haben gezeigt, dass E14 an der Grenzfläche des Dimers liegt (Schuldiner, persönliche Mitteilung). Außerdem wurden neben E14 eine Anzahl von weiteren Seitenketten innerhalb der Dimer-Grenzschicht identifiziert. Bis auf eine Seitenkette im *loop* zwischen Helix 2 und Helix 3 befinden sich alle interfacialen Seitenketten entweder in Helix 1 oder in Helix 4. Es wurde gezeigt, dass auch Helices 1 und 4 durch *crosslinking* verknüpft werden können (Schuldiner, persönliche Mitteilung). Diese Daten haben zu einem topologischen Modell von EmrE geführt, bei dem sich die Helices 1 und 4 zentral kreuzweise gegenüber stehen (Abb. 6.1). Allerdings kann dieses Modell *crosslinking* im Loops zwischen Helices 2 und 3 nicht schlüssig erklären.

Im Folgenden wird versucht, ein Modell von EmrE zu entwickeln, das in Übereinstimmung mit den vorhandenen experimentellen Daten ist.

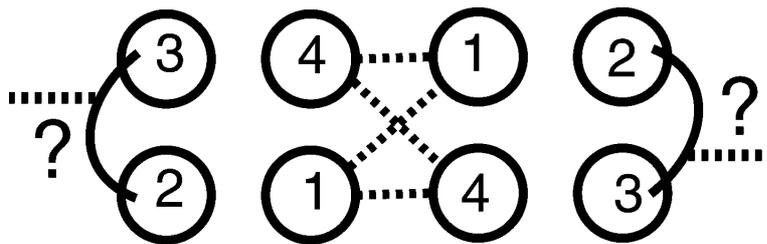


Abb. 6.1: Topologisches Modell von EmrE, hergeleitet von *crosslinking* Studien.

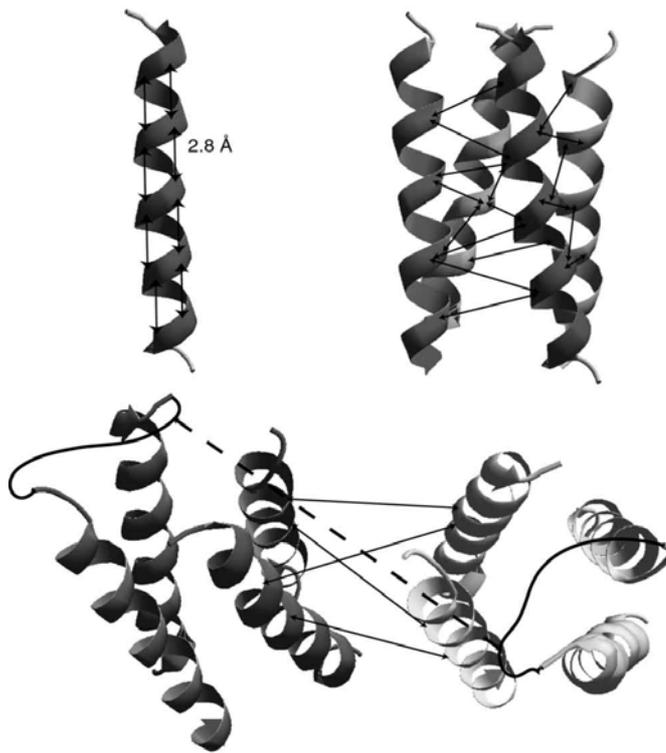
Die *crosslinking*-Stellen (unterbrochene Linien) legen eine kreuzförmige Anordnung der Helices 1 und 4 nahe. Allerdings kann dieses Modell nicht *crosslinking* zwischen den Loops der beiden Monomere, der Helix 2 mit Helix 3 verbindet, erklären.

---

## 6.2 Methode

EmrE wurde in verschiedenen Schritten modelliert. Die Länge einer jeden Helix ist durch NMR-spektroskopische Untersuchungen bekannt. Die NMR-Ergebnisse unterscheiden sich von den vorhergesagten Helixlängen. Die Helices wurden entsprechend der NMR-Ergebnisse einzeln errechnet und zu einem Bündel zusammengefügt, das in seinen Parametern der Startstruktur von occ entspricht. Der Kippwinkel der Helices betrug allerdings nicht 0 Grad wie im Falle von occ, sondern 27 Grad. 27 +/- 20 Grad war als durchschnittlicher Winkel aller Helices relativ zur Membrannormalen durch Fourier-transformierte Infrarot-Studien bestimmt worden.<sup>[135]</sup> Der Ausgangswinkel, der um +/- 20 Grad modifiziert wurde, war also 27 Grad. Ausgehend von dieser Startstruktur wurde eine Bibliothek von Zufallskonformationen erstellt. Im nächsten Schritt wurde der kurze, vier Aminosäuren lange *loop* zwischen Helix 2 und Helix 3 eingefügt. Daraufhin wurden zwei Monomere mit Hilfe der *crosslinking*-Daten von Helices 1 und 4 zu einem Dimer zusammengeführt. Als letzter Schritt wurde auch noch das *crosslinking*-Ergebnis des *loops* zwischen Helices 2 und 3 berücksichtigt.

Folgende Abstandsinformationen gingen in die Dimerisierungs-Rechnungen ein: zum einen die Abstände zwischen  $N_i$  und  $O_{i+4}$  innerhalb einer Helix (Abb. 6.2 oben links), um die Helizität während der Rechnungen zu erhalten; weiterhin Abstände zwischen den  $C\alpha$ -Atomen der Helices im Monomer, die von den Ergebnissen der Konformationenbibliothek erhalten wurden (Abb. 6.2 oben rechts); und schließlich Intermonomerabstände aus den *crosslinking*-Studien (Abb. 6.2 unten.). Der Abstand „*crosslinkender*“ Seitenketten wurde auf  $< 8 \text{ \AA}$  gesetzt.



**Abb. 6.2 Restraints bei Modellierung von EmrE.**

Es werden jeweils nur Beispiele für die Abstandsinformationen gegeben.

**Oben links:**

Helix erhaltende *restrains* zwischen  $N_i$  und  $O_{i+4}$ .

**Oben rechts:**

Intramonomer-*Restraints*. Die Abstandsdaten wurden aus der monomeren Struktur erhalten, die mit Hilfe der Konformationsbibliothek gewonnen worden war.

**Unten:**

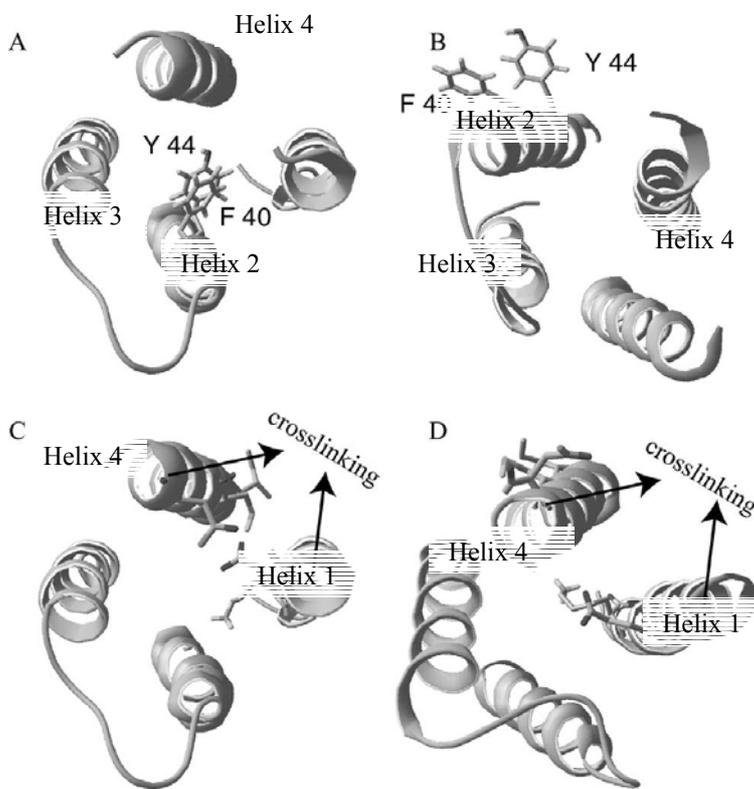
Intermonomer-*restrains* basierend auf *crosslinking* Studien. Als letztes wurde der Abstand zwischen den *loop* von Helices 2 und 3 eingeschränkt.

Im letzten Modellierungs-Schritt wurde auf die intramonomeren Abstände, die von der Konformationsbibliothek ermittelt worden waren, verzichtet und nur der maximale Abstand zwischen benachbarten Helices auf 12 Å begrenzt. Das System wurde mit den experimentellen inter-monomer Abständen sowie helixerhaltenden Abstandsinformationen 2500 Schritte bei einer Schrittweite von 0.001 ps bei 300 K mit einer Simulation im kartesischen Koordinatenraum simuliert. 100 Strukturen wurden berechnet und mit NMRclust in Cluster unterteilt.

## 6.3 Ergebnisse

### 6.3.1 Monomer

Die Konformationsraumsuche liefert auch für EmrE, wie schon für das 4-Helix-Bündel von occ, kein eindeutiges Ergebnis. Insgesamt werden sechs mögliche Konformationen erkannt. Die 6 Möglichkeiten wurden auf ihre Übereinstimmung mit Mutations- und *crosslinking* Daten überprüft. Es ist gezeigt worden, dass Substitution der Seitenketten 40 und 44 die Aktivität von EmrE zerstört. Während in den Modellen 3-6 diese Seitenketten dem Lipid zugewandt sind (Abb. 6.3B), sind sie in den Modellen 1-2 an zentraler Stelle im Helix-Bündel (Abb. 6.3A).



**Abb. 6.3: Unterscheidung der Modelle nach experimentellen Daten.**

**(A) Orientierung der Helix 2 in Modellen 1 und 2.**

**(B) Orientierung der Helix 2 in den Modellen 3 bis 6. Diese Orientierung ist mit Mutationsstudien unvereinbar.**

**(C) Orientierung der Helices 1 und 4 in Modell 1.**

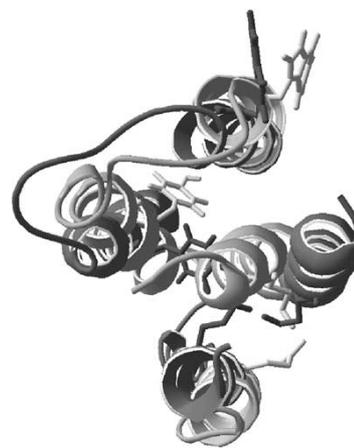
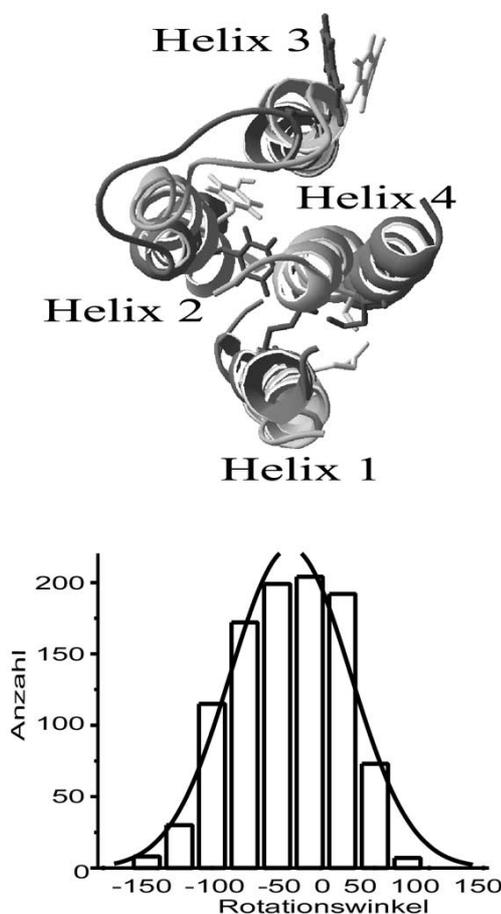
**(D) Orientierung der Helices 1 und 4 in Modell 2.**

**In (C) und (D) werden „crosslinkende“ Seitenketten gezeigt.**

Die Modelle 3-6 wurden daher als nicht mit den Mutationsstudien vereinbar verworfen. Die Modelle 1 und 2 unterscheiden sich allein im Rotationswinkel der Helix 4. In Modell 1 ist Helix 4 so orientiert, dass eine Dimerisierung gemäß den *crosslinking* Daten möglich ist (Abb. 6.3C), während bei Modell 2 Helix 4 eine weitere Rotation vornehmen müsste (Abb. 6.3D). Beiden Modellen ist gemein, dass Helix 1 rotiert werden muss, um den *crosslinking* Studien zu entsprechen. Da Modell 1 den experimentellen Daten am besten entspricht, wurde ein Dimer für Modell 1 berechnet.

### 6.3.2 Dimer

Die konformationellen Änderungen von Monomer zu Dimer betreffen hauptsächlich die Positionen der Helices zueinander, während die Rotationswinkel, die die Helix-Helix-Interaktionen bestimmen, nahezu unverändert sind (Abb. 6.4 oben). Die größten Veränderungen im Rotationswinkel treten an der Dimerisierungsstelle auf, also bei Helix 4 und insbesondere bei Helix 1 auf. Doch auch Helix 1 rotiert nur in einer Größenordnung von 50 Grad, also innerhalb des Fehlers der Monomerberechnung. Weiterhin ist es sinnvoll, dass im Monomer das polare Glu 14 eher in das Bündel hineinragt (und nicht zum Lipid exponiert ist), während es im Dimer an der Monomer-Monomer Grenzfläche positioniert ist. Es scheint also im Laufe der Dimerisierung eine konformationelle Änderung aufzutreten, die eine Rotation von Helix 1 beinhaltet. In der Auswertung der Konformationsbibliothek ist die Verteilung der Rotationswinkel für Helix 1 breit, was für eine größere konformationelle Flexibilität spricht (Abb. 6.4 unten). Helix 4 rückt weiter in das



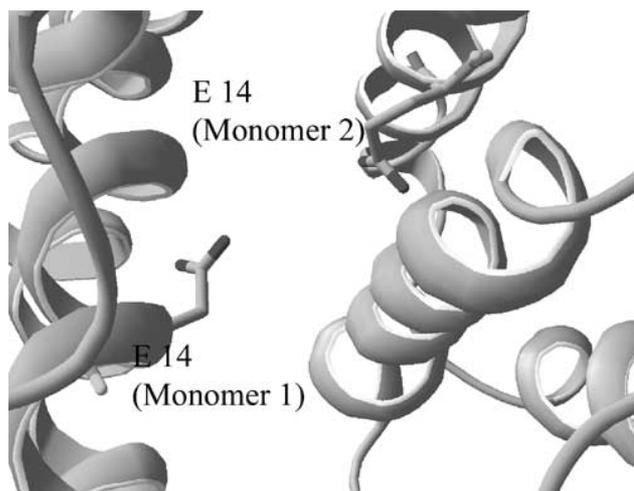
**Abb. 6.4: Dimerisierung.** Bei der Dimerisierung gemäss den *crosslinking*-Studien schiebt sich Helix 4 weiter in das 4-Helix Bündel, so dass Helices 1,3 und 4 das Dimer-Interface bilden (oben, Stereobild, dunkle Struktur). Die größte Änderung im Rotationswinkel erfolgt bei Helix 1. Hier ist die Verteilung der Rotationswinkel sehr breit (unten). Dies weist auf höhere Flexibilität hin.

Bündel. Dadurch wird eine breite Interaktionsfläche zwischen den Monomeren geschaffen, die Helices 1, 3 und 4 beinhaltet (Abb. 6.4 oben).

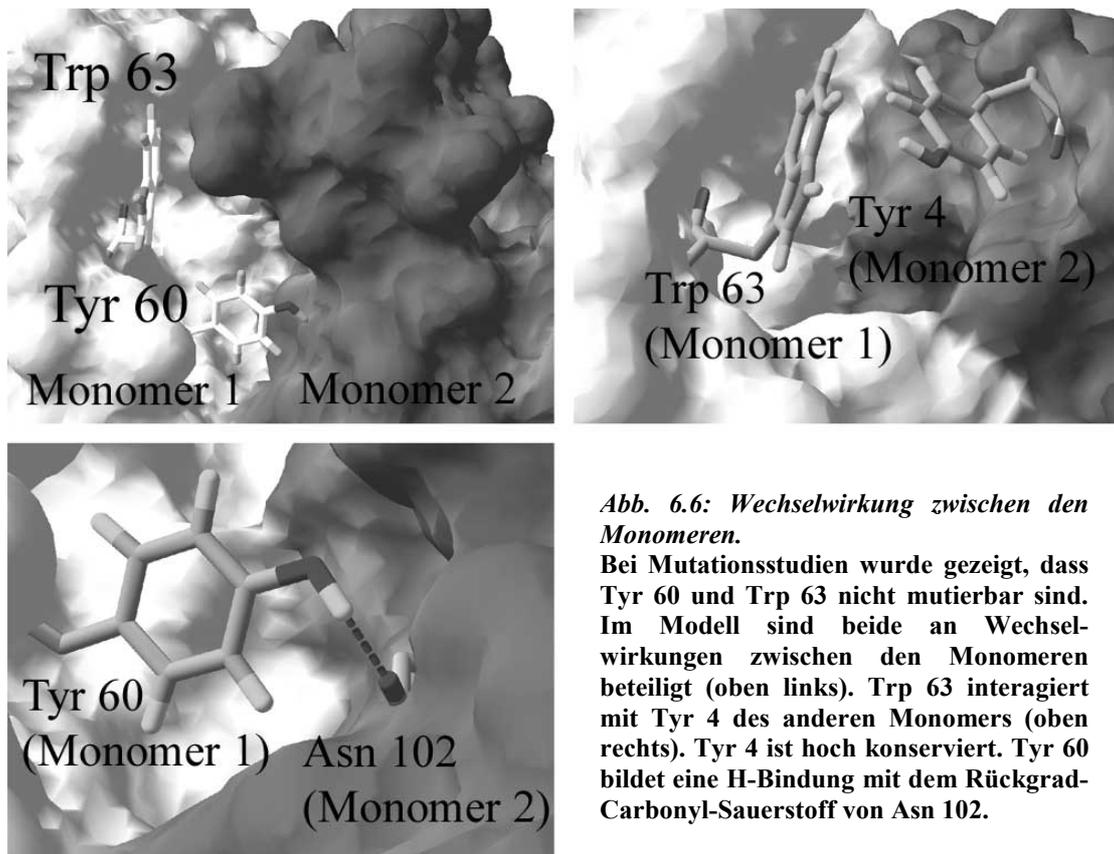
Die zentral an dem Transportprozess beteiligte Seitenkette Glu14 liegt in der Mitte des Interfaces. Dort kann die Aminosäure die kationischen Substrate stabilisieren und im Austausch mit Protonen entweder binden oder nach einer konformationellen Änderung auf der anderen Seite der Membran wieder freigeben (Abb. 6.5).

Mutationsstudien zeigen, dass Tyr 60 und Trp 63 unabdingbar für den Transport sind. Auch die konservative Mutation zu Phe führt in beiden Fällen zum kompletten Verlust der Aktivität. In dem Modell sind beide Seitenketten an Inter-Monomer-Kontakten beteiligt (Abb. 6.6 oben links). Trp 63 interagiert mit Tyr 4, einem hochkonserviertem Aromaten in der Familie der Smr. (Abb. 6.6 oben rechts) Die Mutationsstudien an Tyr 60 lassen vermuten, dass diese Seitenkette neben reinen van-der-Waals Kontakten auch an einer Wasserstoff-Brückenbindung beteiligt ist, da sonst bei einer Substitution mit Phe zumindest Teilaktivität erhalten bleiben sollte. Tatsächlich kann Tyr 60 im Modell eine H-Brückenbindung zum anderen Dimer ausbilden und sich so an der Dimerisierung beteiligen (Abb. 6.6 unten links).

Experimente zur weiteren Verifizierung des Modells sind nötig. Hierzu bieten sich Fluoreszenz-Quenching Studien an Trp 63 sowie weitere *crosslinking*-Studien zwischen den Monomeren an.



**Abb. 6.5: Position von Glu 14.**  
Glu 14 ist zentral am Interface der beiden Monomere lokalisiert. Dort kann es in der Mitte der Membran die positiv geladenen Substrate stabilisieren und im Austausch mit Protonen entweder binden oder freigeben.



*Abb. 6.6: Wechselwirkung zwischen den Monomeren.*

Bei Mutationsstudien wurde gezeigt, dass Tyr 60 und Trp 63 nicht mutierbar sind. Im Modell sind beide an Wechselwirkungen zwischen den Monomeren beteiligt (oben links). Trp 63 interagiert mit Tyr 4 des anderen Monomers (oben rechts). Tyr 4 ist hoch konserviert. Tyr 60 bildet eine H-Bindung mit dem Rückgrad-Carbonyl-Sauerstoff von Asn 102.

## 6.4 Diskussion

Das am Beispiel der Cytochrome C Oxidase getestete Verfahren einer Konformationsbibliothek wurde in diesem Kapitel auf das Vier-Helix-Bündel des Transporters EmrE angewandt. Die erhaltenen möglichen Monomerkonformationen konnten mit Hilfe von Mutations- und *crosslinking*-Studien unterschieden und eine Vorzugskonformation ermittelt werden. Die Vorzugskonformation wurde dann zu einem Dimer zusammengefasst. Sämtliche biochemischen Ergebnisse sind im Einklang mit dem Modell und lassen sich nun strukturell interpretieren. Ein neues, topologisches Modell von EmrE kann nun erstellt werden, welches auch die *crosslinking*-Ergebnisse des *loop* zwischen Helix 2 und 3 beinhaltet (Abb. 6.7).

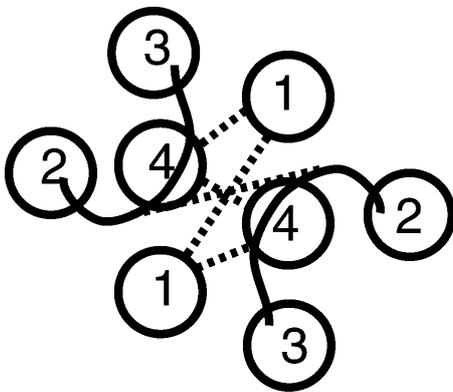


Abb. 6.7: Helix-Anordnung nach dem Modell.

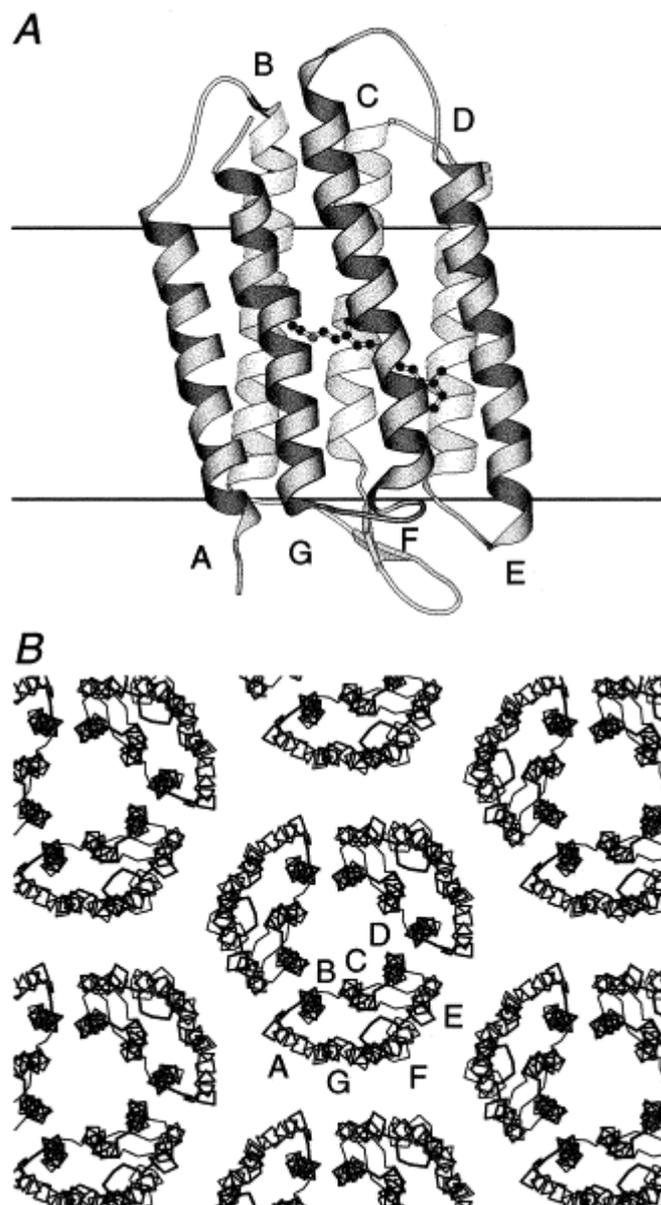
In diesem Modell können alle Vorgaben aus *crosslinking*-Daten erfüllt werden (gestrichelte Linien). Auch sonstige Mutationsdaten können gut strukturell erklärt werden.

Das Modell erlaubt das gezielte Entwerfen weiterer Experimente, die Aufschluss über die Konformation des Proteins liefern können. Wünschenswert wäre es, wenn das Modell darüber hinaus prüfbare Vorschläge zum Transportmechanismus geben könnte. Dies ist gegenwärtig schwierig, vor allem da der Transporter vermutlich größere konformationelle Änderungen während des Transportes durchmacht, die Helix-Helix-Anordnung also flexibel ist. Es scheint plausibel, dass die erhaltenen *crosslinking*-Informationen einer gemittelten Struktur innerhalb des Konformationsraumes entsprechen und nicht alle Abstandsinformationen gleichzeitig erfüllt werden. Eine freie Moleküldynamik-Rechnung des Modells in einer Membran oder in einem Membranmimetikum kann unter Umständen Informationen über die Flexibilität der Struktur und über mögliche Zwischenzustände geben. Eine solche Rechnung ist jedoch sehr aufwendig und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

## 7. Helix-Helix Wechselwirkungen in einem Polytopen Protein

### 7.1 Einleitung

Wie in den bisherigen Kapiteln beschrieben wurde, ist es möglich, Helixbündel mit bis zu vier Helices mit guter Genauigkeit zu modellieren. Jedoch versagt das mit einer Konformationsbibliothek arbeitende Verfahren bei Proteinen mit mehr als vier Helices, da die Anzahl der möglichen Orientierungen zu groß wird. Die Anzahl der Freiheitsgrade muss daher experimentell eingeschränkt werden. Hier soll nun an Hand des polytopen membrandurchspannenden Protein Bakteriorhodopsin



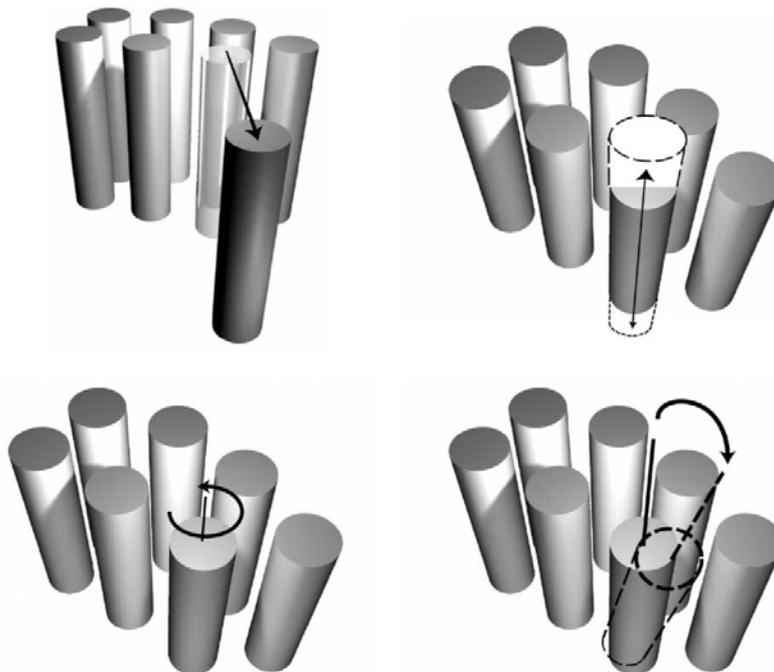
*Abb. 7.1: Struktur von Bakteriorhodopsin.*

Bakteriorhodopsin ist ein 7-Helix Bündel, das als Kofaktor ein Retinal bindet (A). In der Membran liegt Bakteriorhodopsin als Trimer vor, bei dem Helix B mit Helix D wechselwirkt. Das Homotrimer ist zu höhergeordneten Strukturen verbunden und bildet natürlicherweise einen 2-dimensionalen Kristall.

untersucht werden, welche Freiheitsgrade sich gut berechnen lassen und welche sinnvollerweise durch Experimente bestimmt werden müssen. Bakteriorhodopsin ist ein TM Protein mit sieben TM Helices (Abb. 7.1). Es bindet als Cofaktor ein Retinal. Die Struktur des Grundzustandes und einer Reihe von angeregten Zuständen ist durch vielfältige Studien mit Elektronenmikroskopie oder Röntgenstreuung bekannt.<sup>[146-156]</sup>

Da alle Rechnungen nur die TM-Helices betrachten, wird im Folgenden näher untersucht, welche Freiheitsgrade durch Helix-Helix Wechselwirkungen determiniert sind und bei welchen Freiheitsgraden andere Faktoren wie Membrandicke oder Loop-Länge einen wichtigen Einfluss haben.

Fragmente von Bakteriorhodopsin assoziieren spontan.<sup>[157-159]</sup> Dies lässt die Behandlung der Helices als unabhängige Faltungseinheiten zu, ähnlich den Domänen in löslichen Proteinen. Im Folgenden wird diese Eigenschaft genutzt, um auf vereinfachte Weise die Kräfte, die bei der Assoziation der Helices wirken, nachzuvollziehen.

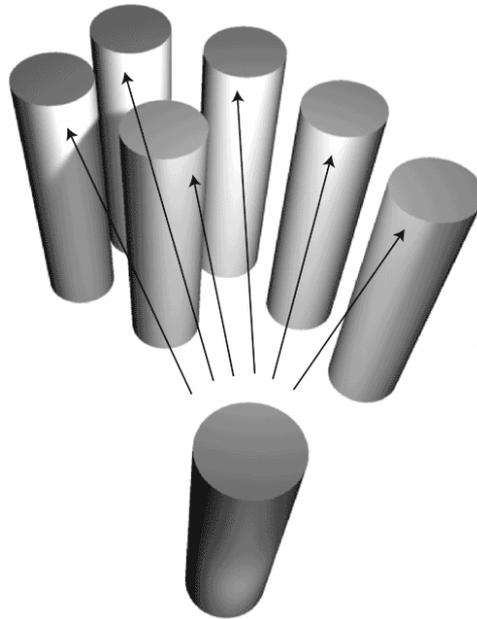


**Abbildung 7.2:** Vier Freiheitsgrade des Proteins im Komplex.

Die Helix kann lateral aus dem Komplex herausgezogen werden (oben links), sich senkrecht zur Membranebene bewegen (oben rechts), um die Längsachse gedreht werden (unten links) oder aber den Kippwinkel ändern (unten rechts).

Hierfür wurden die vier Freiheitsgerade (Abb. 7.2) separiert und die Auswirkung ihrer Änderung auf die Helix-Helix-Wechselwirkungen untersucht.

Die einzelnen Helices wurden um die eigene Achse rotiert (Abb. 7.2, unten links), um ihren Massenschwerpunkt gekippt (Abb. 7.2, unten rechts) und entlang der langen Helixachse translatiert (Abb. 7.2, oben rechts). Diese drei Bewegungen wurden jeweils mit einer Translation lateral zur Membranebene verknüpft (Abb. 7.2, oben links). Die Wechselwirkung der jeweiligen Helix mit dem unveränderten Rest des Proteins wurden bestimmt (Abb. 7.3).

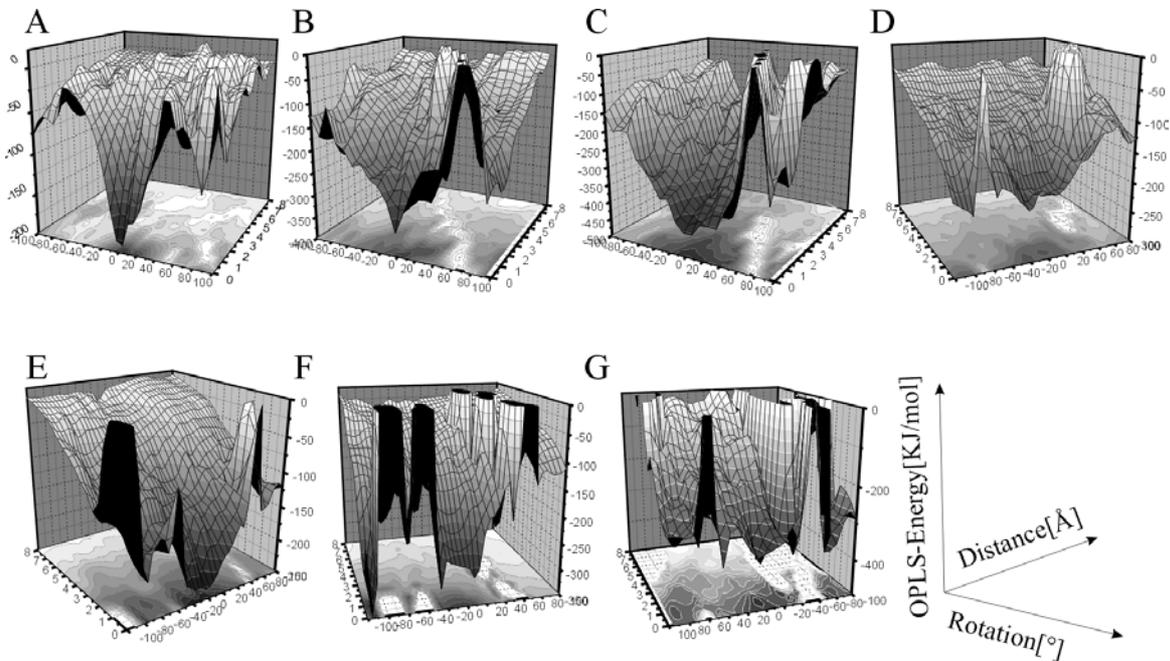


**Abbildung 7.3: Die Wechselwirkungen einer Helix mit dem gesamten Rest des Proteins.**

Die Helix wurde entweder um die Längsachse gedreht, gekippt oder senkrecht zur Membranebene verschoben, jeweils in Kombination mit einer Verschiebung der Helix in der Membranebene. Daraufhin wurden die Wechselwirkung der betrachteten Helix mit dem Restprotein berechnet.

## 7.2 Rotation und Lateraltranslation

In Abb. 7.4 sind die Abhängigkeiten der Wechselwirkungsenergien der einzelnen Helices von dem Rotationswinkel und dem Abstand dargestellt.



**Abbildung 7.4** Wechselwirkungsenergie einer Helix mit dem Rest des Proteins in Abhängigkeit von lateraler Translation und Rotation.

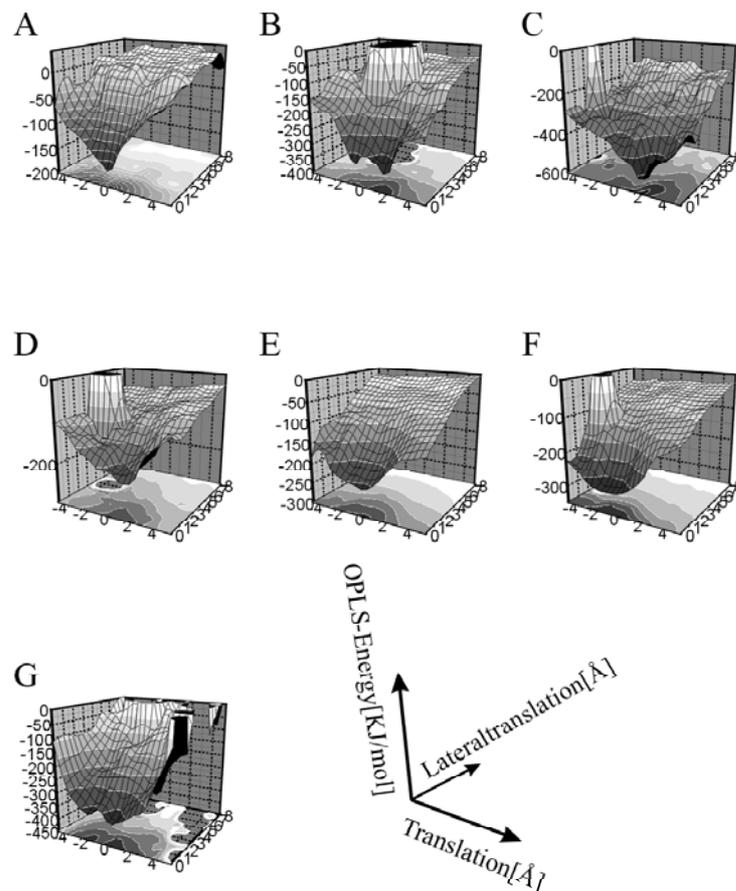
Mit Ausnahme von Helix F ist das Minimum der Energie nahe den Koordinaten der Röntgenstruktur. Die Position von Helix F ist von der Retinalkonformation abhängig. Es scheint also, als würde Helix F durch das Retinal in einer Konformation gehalten, die es ohne Retinal nicht einnehmen würde.

Die Wechselwirkung ist im hohen Maße vom Rotationswinkel abhängig. Für fast alle Helices liegt das Minimum der Energie bei  $0^\circ$  Rotation und  $0 \text{ \AA}$  lateraler Translation, also bei den Koordinaten der Röntgenstruktur. Eine auffällige Ausnahme ist Helix F. Obwohl hier beim Rotationswinkel  $0^\circ$  ein Minimum liegt, ist ein weiteres Minimum bei ca.  $-100^\circ$  und bei ca.  $-40^\circ$  Rotation energetisch günstiger. Während das Minimum bei  $-100^\circ$  durch eine starke Barriere vom lokalen Minimum bei  $0^\circ$  getrennt ist, ist das Minimum bei  $-40^\circ$  nur durch eine kleine Barriere getrennt. Helix-Helix Wechselwirkungen können folglich nicht erklären, warum Helix F nicht in einer um  $40^\circ$  rotierten Konformation vorliegt. Bei der cis-trans Isomerisierung des Retinals nach Belichtung das Protein findet eine konformationelle Änderung statt, die

im Wesentlichen Helix F betrifft.<sup>[160]</sup> Während dieser Änderung dreht sich die Helix F um ca. 40°. Helix F liegt also durch Wechselwirkungen mit dem Retinal in einer gespannten Konformation vor, die sich bei Belichtung löst, wodurch ein Signal durch die Membran gesendet werden kann. Im Allgemeinen wird der Rotationsfreiheitsgrad durch Helix-Helix Wechselwirkungen bestimmt, jedoch können auch weitere Faktoren, wie die die Helices verbindenden Loops oder Cofaktoren, Einfluss auf die Rotation von Helices nehmen.

### 7.3 Vertikaltranslation und Lateraltranslation

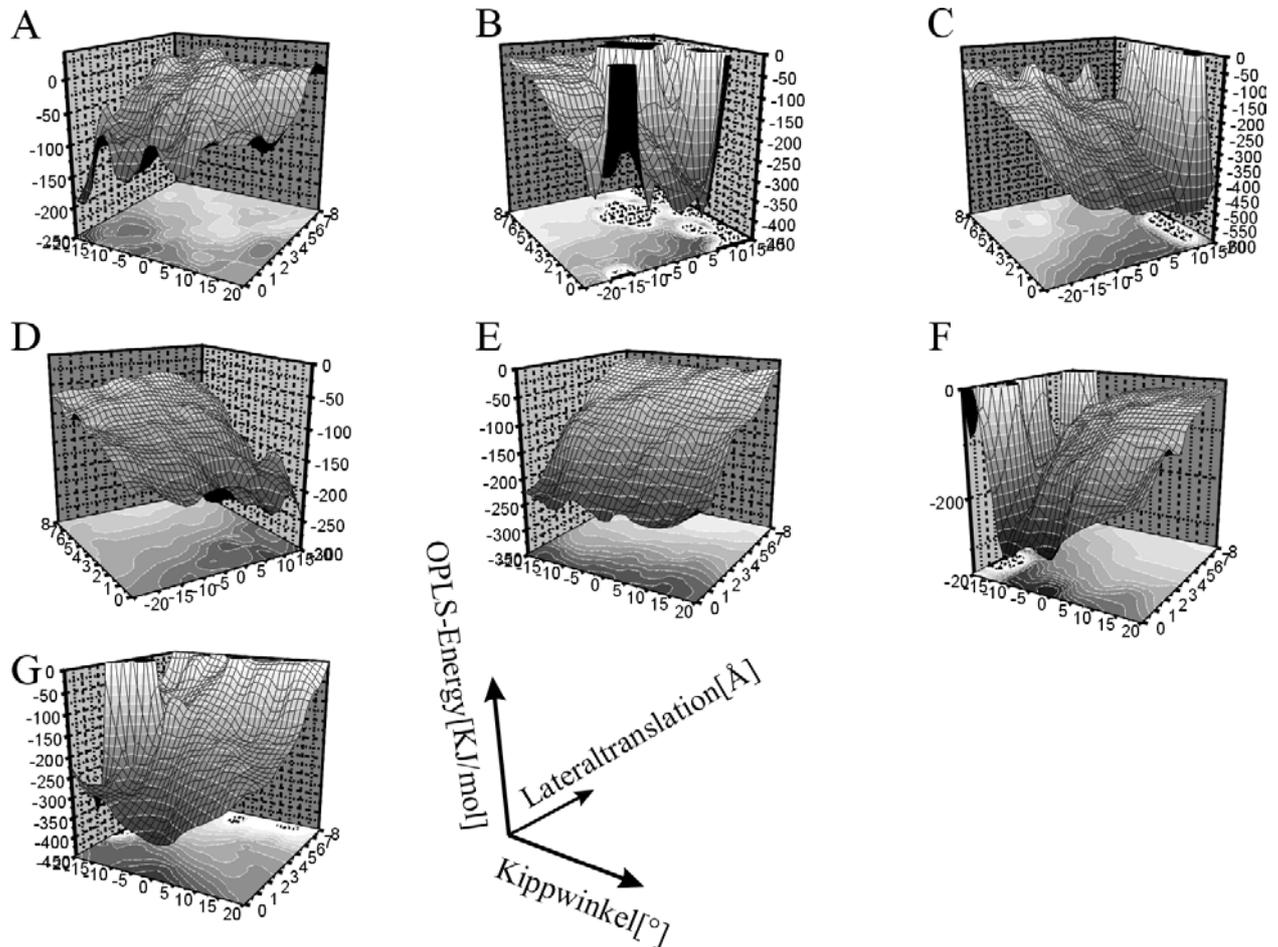
Es besteht eine Abhängigkeit der Wechselwirkungsenergie von einer vertikalen Translation (Abb. 7.5), wenn auch diese Abhängigkeit nicht ganz so deutlich ausgeprägt ist wie die Abhängigkeit vom Rotationswinkel.



**Abbildung 7.5:** Die Abhängigkeit der Wechselwirkungsenergie der einzelnen Helices mit dem Rest des Proteins von Lateraltranslation und Translation senkrecht zur Membranebene.

## 7.4 Translation und Kippwinkel

Während sowohl für die vertikale Translation als auch für die Rotation die Energieminima nahe den Koordinaten der Röntgenstruktur lagen, ist beim Kippwinkel keine solche Abhängigkeit zu sehen (Abb. 7.6).



**Abbildung 7.6:** *Abhängigkeit der Wechselwirkungsenergie der einzelnen Helices mit dem Rest des Proteins von Laterals translation und vom Kippwinkel.*

Außer bei Helix G liegt bei keiner der Helices das Minimum der Wechselwirkungsenergien nahe an den Werten der Röntgenstruktur. Während für Helix E beinahe keine Abhängigkeit der Wechselwirkung vom Kippwinkel festgestellt werden kann, liegt das Minimum bei den übrigen Helices weit von den Strukturwerten entfernt. Helix-Helix Wechselwirkungen bestimmen also nach diesen Rechnungen den Kippwinkel der Helices nicht. Der Kippwinkel wird daher vermutlich durch die loops, aber vor allem durch die Lipiddoppelschicht bestimmt. So wurde für GpA durch eine Simulation der Dimerisierung gezeigt, dass schon die

---

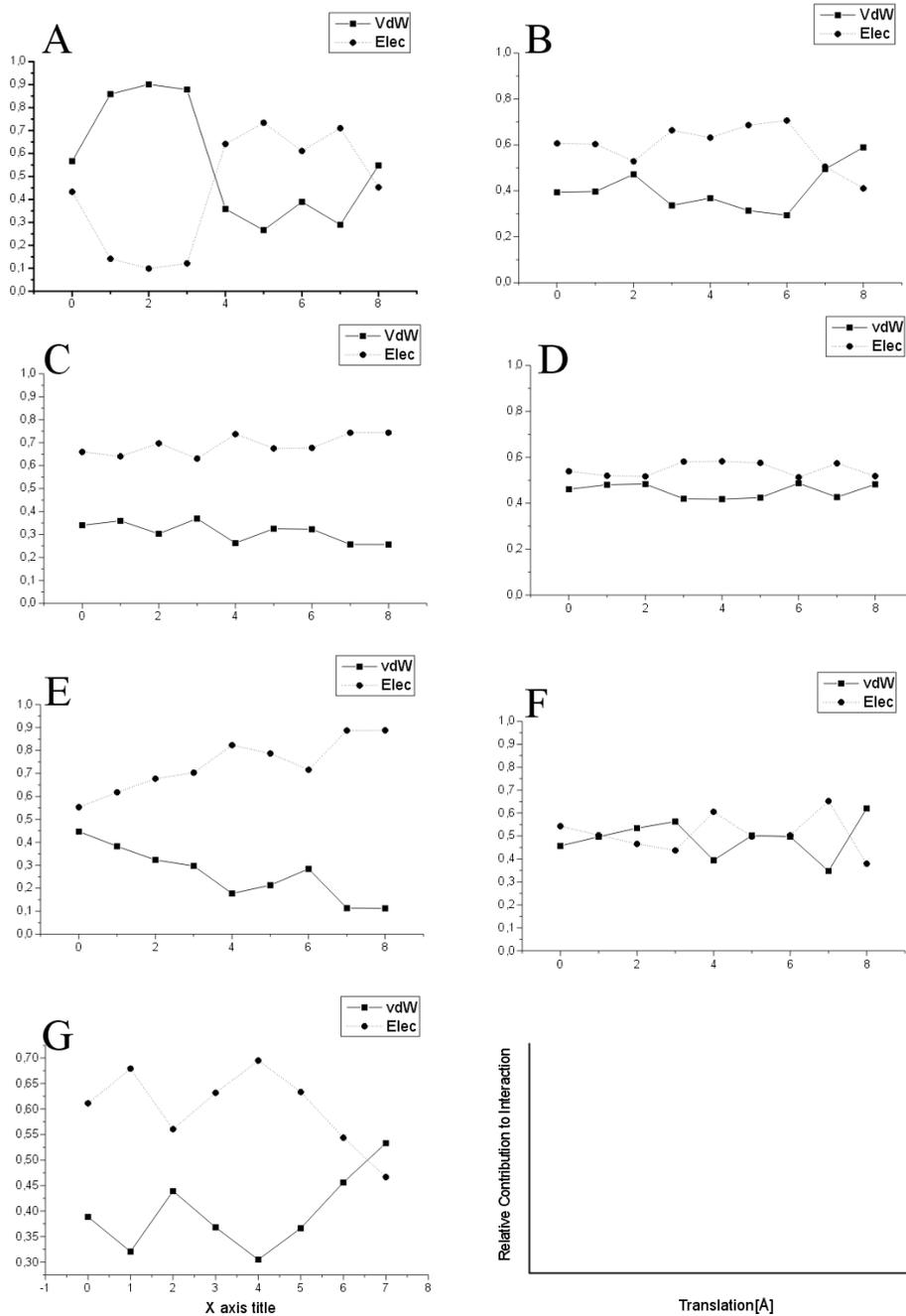
monomere Helix den nahezu identischen Kippwinkel in der Membran einnimmt wie das Dimer. Bei Modellhelices ist bekannt, dass stark polare Seitenketten, die sich nahe der Lipid/Wasser Grenzschicht befinden, in die Wasserphase reichen und so die Helix in einem bestimmten Winkel in der Membran verankern.

## 7.5 Relativer Beitrag der nicht-bindenden Energien

Da der Rotations- und Vertikaltranslationsfreiheitsgrad im Wesentlichen durch Helix-Helixwechselwirkungen bestimmt zu sein scheint, wird im Folgenden untersucht, welchen Anteil van-der-Waals und elektrostatische Energien an den Wechselwirkungen haben. Für den Kippwinkel wird diese Betrachtung nicht vorgenommen, da dieser nicht von Helix-Helixwechselwirkungen bestimmt wird.

Der relative Beitrag der beiden nicht-gebundenen Energieterme folgt keinem klaren Trend (Abb. 7.7). Um den relativen Beitrag zu errechnen, wurde zu jedem Abstandswert ungefähr am Minimum der relative Beitrag von van-der-Waals und elektrostatischen Energien berechnet. Grundlage waren die Rechnungen mit Änderung des Rotationswinkels, da diese die klarste Abhängigkeit der Wechselwirkung von der Änderung des geometrischen Parameters zeigen.

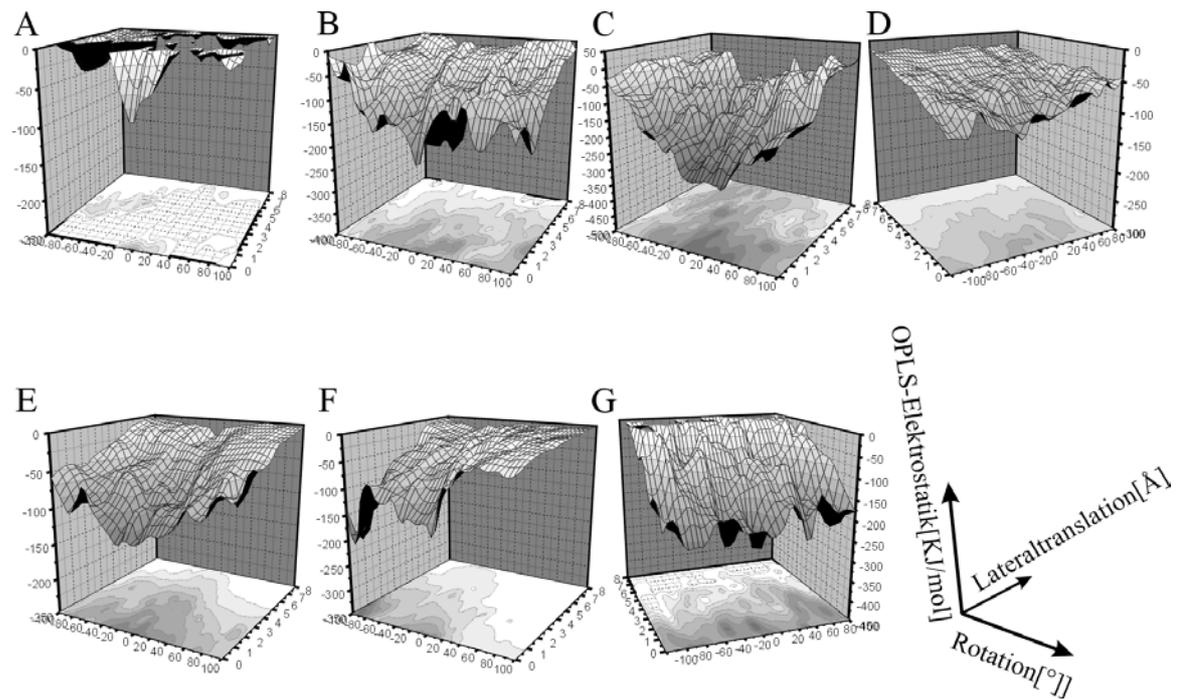
Beide Terme tragen zur Stabilität in ähnlichem Ausmaße bei. Auch ist kein Trend in der Abstandsabhängigkeit zu erkennen. Obwohl die van-der-Waals Energien sehr viel stärker abstandsabhängig sind als die elektrostatischen Energien, tragen sie auch in einer Entfernung von 8 Å zur Gesamtstabilisierung bei. Allerdings sind die Gesamtwechselwirkungen bei dieser Entfernung sehr gering. Ein leichter Trend zu höherer Stabilisierung durch elektrostatische Wechselwirkungen bei weiterer Entfernung deutet sich an. Der relativ hohe Anteil der elektrostatischen Energien überrascht etwas, da polare Seitenketten in TM Proteinen selten sind. Bei großer Entfernung muss allerdings damit gerechnet werden, dass die Lipid-Protein Wechselwirkungen zunehmen. Daher ist es möglich, dass bei großer Entfernung im Vakuum zwar stabilisierende van-der-Waals Kräfte zwischen den Helices auftreten, diese jedoch in der Membran vollkommen durch Protein-Lipid Wechselwirkungen kompensiert werden.



**Abbildung 7.7:** Relativer Beitrag der nicht gebundenen Energieterme (van der Waals und elektrostatisch) ist gezeigt.

Ein komplexes Bild ergibt sich, wenn man die Abhängigkeit der Energien vom geometrischen Parameter betrachtet (Abb. 7.8 – 7.11). Im Falle der Rotation tragen bei Helix A die elektrostatischen Kräfte zur Stabilität und Spezifität bei. Bei den anderen Helices sind die Minima wenig spezifisch oder sogar, wie bei Helix F, bei einem anderen Rotationswinkel. Das Minimum der van-der-Waals Wechselwirkungen hingegen ist bei allen Helices nahe einem Rotationswinkel von 0°. Nahe des

Gleichgewichtsabstandes werden von den van-der-Waals Kräften zusätzlich große Energiebarrieren bei der Rotation aufgebaut. Bei der Vertikaltranslation tragen beide Kräfte zu Stabilität und Spezifität bei. Bei Helices E-G jedoch ist das Minimum der elektrostatischen Energie sehr breit, während das Minimum der van-der-Waals Energie schmaler ist. Insgesamt scheinen elektrostatische Wechselwirkungen die Stabilität zu erhöhen und teilweise zur Spezifität beizutragen. Der wesentliche Beitrag zur Spezifität wird hingegen von den van-der-Waals Wechselwirkungen geleistet.



**Abbildung 7.8:** Abhängigkeit der elektrostatischen Wechselwirkungen vom Rotationswinkel der Helix

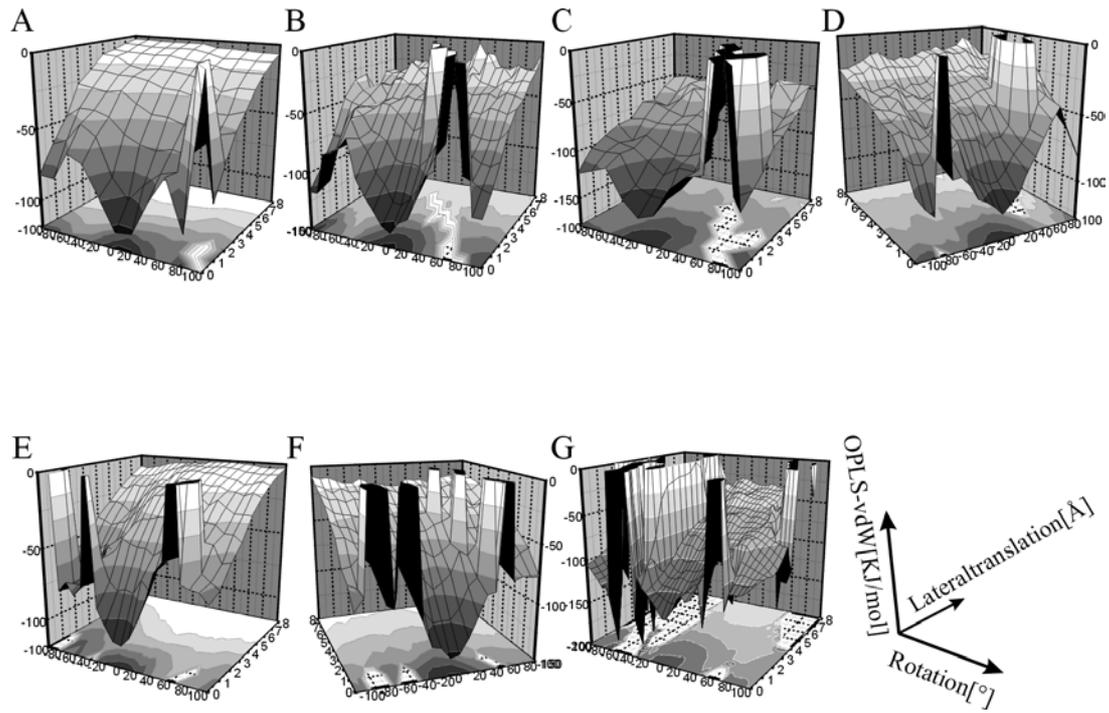


Abbildung 7.9: Abhängigkeit der van-der-Waals Wechselwirkungen vom Rotationswinkel der Helix

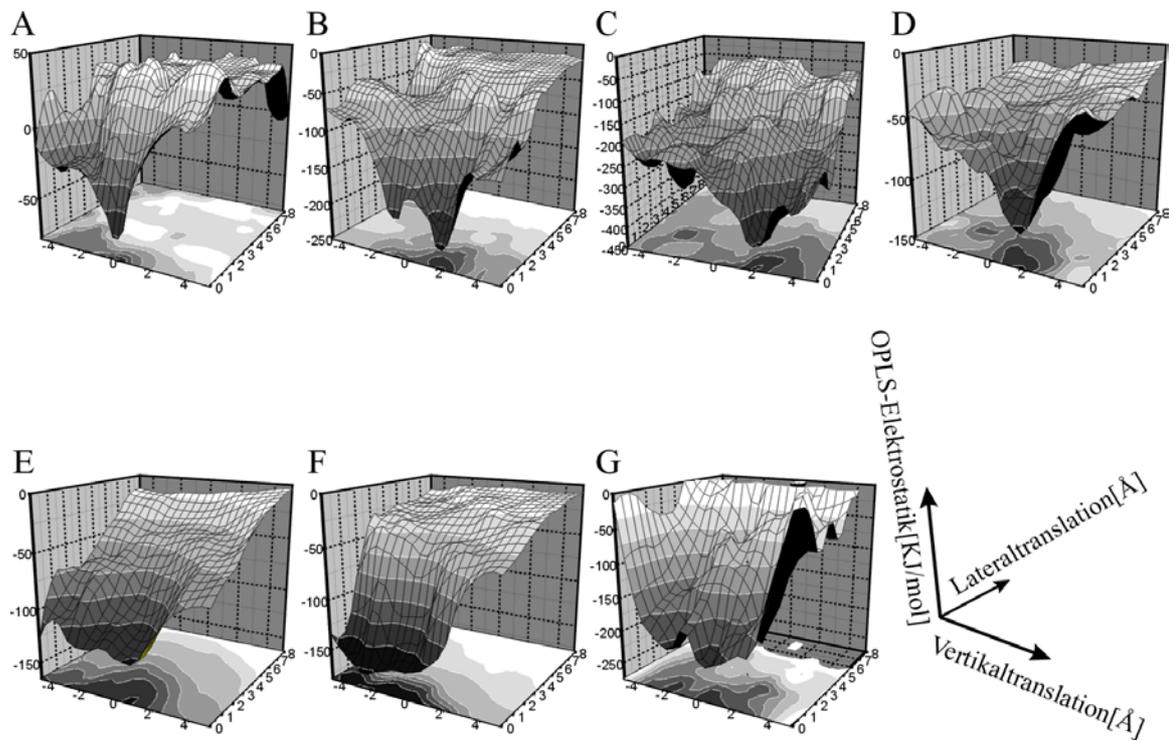


Abbildung 7.10: Abhängigkeit der elektrostatischen Wechselwirkung von der Vertikaltranslation.

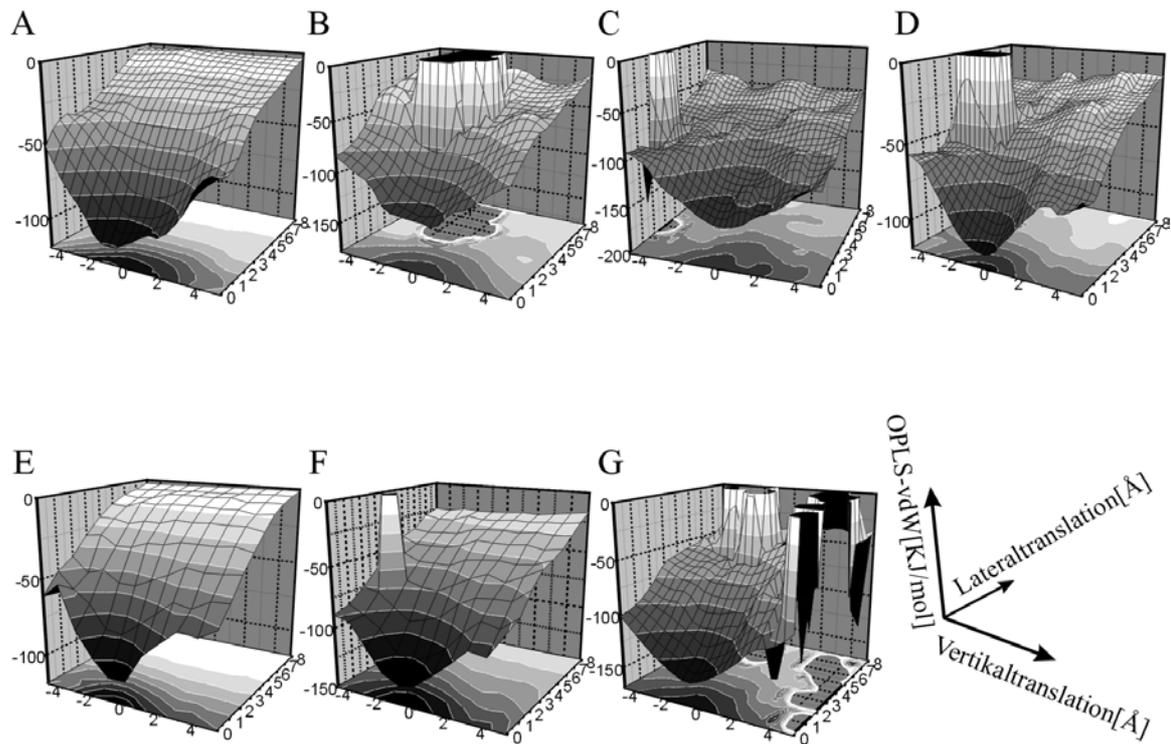


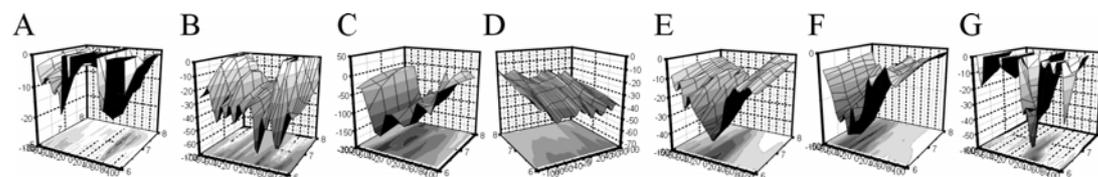
Abbildung 7.11: Abhängigkeit der van-der-Waals Wechselwirkung von der Vertikaltranslation.

## 7.6 Fernwirkung der Kräfte

Die unterschiedliche Abstandsabhängigkeit der van-der-Waals Kräfte und der elektrostatischen Wechselwirkungen wirft die Frage auf, wie die Fernwirkung der Kräfte ist. Daher wird hier untersucht, wie die Spezifität der Wechselwirkungen bei größerem Abstand ist (Abb. 7.12 und Abb. 7.13).

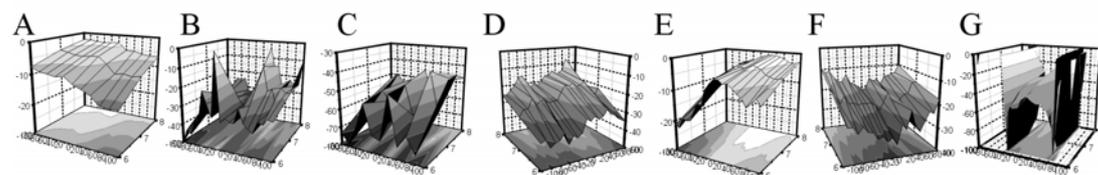
Bei einem Abstand  $> 6 \text{ \AA}$  ist bei den van-der-Waals Wechselwirkungen kein klarer Trend der Abhängigkeit der Wechselwirkung von dem Rotationswinkel oder der Vertikaltranslation zu erkennen. Bei Helix F scheint es eine gewisse Präferenz für Rotationswinkel nahe  $0^\circ$  zu geben. Die van-der-Waals Kräfte sind also bei diesen Abstand unspezifisch und können durch Helix-Lipid Wechselwirkungen kompensiert werden. Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind bei der Vertikaltranslation ebenfalls unspezifisch. Bei der Rotation hingegen ist bis auf Helix D eine deutliche Abhängigkeit der Wechselwirkung vom Rotationswinkel festzustellen. Es kann also eine Vororientierung der Helices bei größeren Entfernungen durch elektrostatische Wechselwirkungen stattfinden. Dies ist vergleichbar mit der diffusionsgesteuerten Annäherung zweier wechselwirkender löslicher Proteine. Auch hier ist eine

Vororientierung der wechselwirkenden Partner durch elektrostatische Wechselwirkungen beschrieben worden.<sup>[161, 162]</sup> Änderung der Elektrostatik ermöglichte sogar das Design von sehr schnell und stark miteinander wechselwirkenden Proteinen. Diese Analogie bestätigt zum einen das grundlegende Konzept, die einzelnen Helices als unabhängige Faltungseinheiten analog zu Domänen in löslichen Proteinen aufzufassen, und zum anderen erscheint es möglich, durch entsprechende Mutationen schneller faltende oder stärker wechselwirkende Transmembranproteine zu designen.

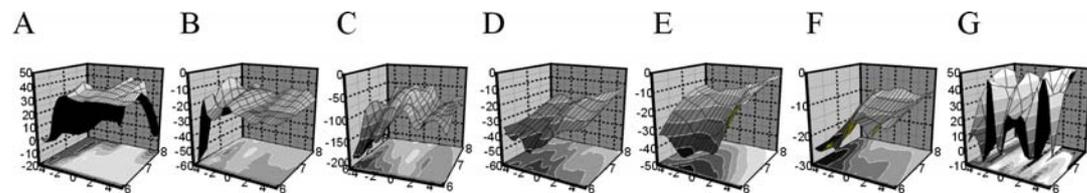


Elektrostatik

Van-der-Waals

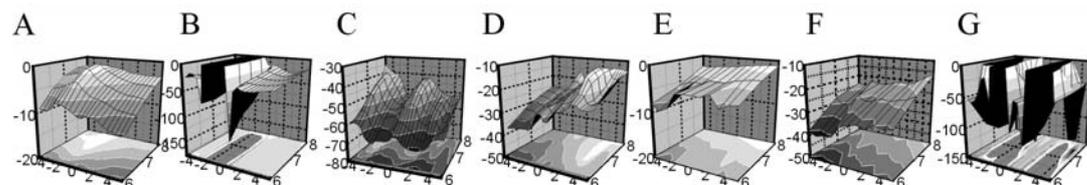


**Abbildung 7.12: Elektrostatische und van-der-Waals Wechselwirkungen bei Entfernungen > 6 Å; Abhängigkeit von Rotation**



Elektrostatik

Van-der-Waals



**Abbildung 7.13: Elektrostatische und van-der-Waals Wechselwirkungen bei Entfernungen > 6 Å; Abhängigkeit von Vertikaltranslation.**

---

## 7.7 Diskussion

In diesem Kapitel ist gezeigt worden, dass der Rotationsfreiheitsgrad und beide Translationsfreiheitsgrade durch Helix-Helix-Wechselwirkungen bestimmt werden. Der Kippwinkel der Helices dagegen wird durch andere Einflüsse bestimmt, wie z. B. die *loops* und vor allem die Membrandicke. So ist bei einer Simulation der Assoziation der beiden Helices in Glykophorin A gezeigt worden, dass sich der Kippwinkel während der Assoziation kaum ändert, sondern offensichtlich schon im Monomer durch die Insertion in die Membran bestimmt wird.<sup>[163]</sup> Andere Untersuchungen haben ergeben, dass häufig nahe der Membran-Wasser Grenzfläche geladene, polare oder aromatische Aminosäuren positioniert sind, die die Helix in einem bestimmten Winkel zur Membrannormalen verankern.<sup>[164-166]</sup> Auch diese Untersuchungen sind im Einklang mit den vorliegenden Rechnungen. Für das Modellieren polytooper Membranproteine bedeutet dies, dass zumindest der Kippwinkel bekannt sein sollte. Ein weiterer Freiheitsgrad, der durch Experimente bestimmt werden sollte, ist die relative Positionierung der Helices im Raum. Die Translation lateral zur Membranebene ist durch Helix-Helix-Wechselwirkungen bestimmt. Jedoch ist die Anzahl der möglichen Anordnungen der Helices im Raum enorm. Daher muss für eine erfolgreiche Modellierung größerer Transmembranproteine die Position der Helix zusätzlich zum Kippwinkel bekannt sein. Sind diese beiden Parameter bekannt, müssen noch die Rotation und Vertikaltranslation durch Rechenverfahren optimiert werden.

## 8. Modellierung von Transmembranproteinen mit Hilfe von Strukturdaten niedriger Auflösung

### 8.1 Einleitung

Wie oben gezeigt, sind für die Modellierung von polytopen Membranproteinen Strukturdaten unabdingbar. Insbesondere der Kippwinkel jeder Helix sowie ihre Position im Raum sollten bekannt sein. Experimentelle Techniken, die sich für Membranproteine besonders eignen, sind die Elektronenmikroskopie (EM) und Festkörper-NMR-Spektroskopie.<sup>[167]</sup> Allerdings ist beiden Techniken gemein, dass meist nur Strukturdaten mit niedriger Auflösung erhalten werden. Ein Parameter, der der Festkörper-NMR zugänglich ist, ist der Winkel einer Helix relativ zur Membrannormalen. Auch FTIR-Studien können den Winkel einer Helix relativ zur Membran bestimmen.<sup>[168-177]</sup> Elektronenmikroskop-Aufnahmen lassen die relative Position der Helices zueinander erkennen und erlauben einen Rückschluss auf den Kippwinkel der einzelnen Helices, besonders wenn eine drei-dimensionale Rekonstruktion erfolgt ist. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass die relative Position der Helices zueinander und der Kippwinkel der Helices bekannt ist, jedoch Rotation und Vertikaltranslation durch Rechenmethoden ermittelt werden sollen (Abb. 8.1).

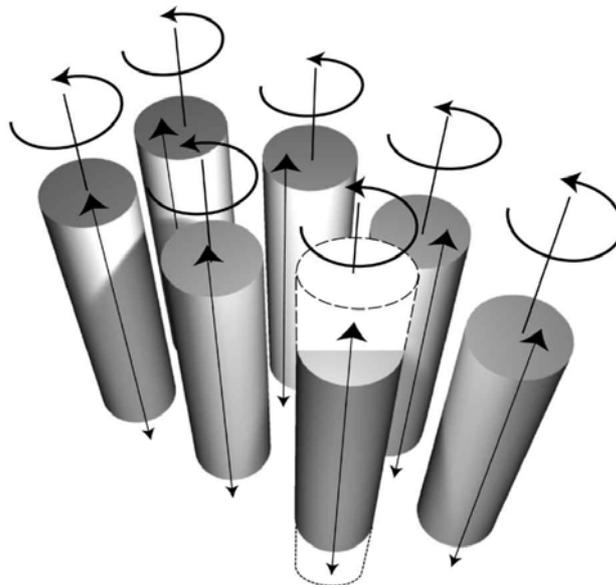


Abb. 8.1: Modellierung von TM Proteinen mit Hilfe von Strukturdaten. Nur die angedeuteten Freiheitsgrade werden optimiert.

---

Hierbei werden, wie bei der Erstellung der Konformationsbibliothek, alle Helices im Protein simultan um einen zufälligen Wert (der sich von Helix zu Helix unterscheidet) rotiert und parallel zur Längsachse der Helix translatiert (Abb. 8.1). Der Kippwinkel und die Position der Helices werden nicht verändert. Für jede einzelne Helix wird dann für die Wechselwirkungsenergie mit dem Restprotein für jede Rotationswinkel/Translationskombination berechnet.

Dieses Verfahren wurde an drei Transmembranproteinen verschiedener Größe getestet. Die Röntgenstruktur dieser Proteine ist bekannt und diente als Ausgangsstruktur. Es handelt sich um ein Fragment der Cytochrome C Oxidase (occ),<sup>[124, 178]</sup> das aus vier Helices besteht und im Kapitel 5 bereits mit Hilfe der Strukturbibliothek errechnet wurde, um Bakteriorhodopsin<sup>[147]</sup> (brd) und um ein weiteres Fragment der Cytochrome C Oxidase (ar1), welches aus 12 Helices besteht.

## 8.2. Methode

Die Kristallstrukturen der Proteine dienten als Ausgangsstruktur für die Rechnungen. Die Proteine wurden auf ihre TM Helices reduziert, die loops wurden entfernt. Daraufhin wurde die Konformationsbibliothek dieser Helixbündel wie im Kapitel 5 erstellt und auf verschiedene Weise ausgewertet. Im Unterschied zu dem Vorgehen in Kapitel 5 wurde hier nur die Vertikaltranslation und Rotation optimiert, die Lateraltranslation und der Kippwinkel jedoch konstant gelassen. Die Wechselwirkungsenergie einer einzelnen Helix mit dem Rest des Proteins wurde berechnet. Dann wurde entweder die Helix-Orientierung mit niedrigster Wechselwirkungsenergie, oder die Verteilung der Konformationswerte für die Konformationen mit den 0.5% niedrigsten Energien betrachtet. Für occ und brd wurden 5000 Zufallsstrukturen berechnet, für das größere ar1 10000. Es wurden daher für occ und brd die 25 Konformationen mit niedrigster Wechselwirkungsenergie ausgewertet, für ar1 die niedrigsten 50.

## 8.3. Ergebnisse

### 8.3.1 Betrachtung der niedrigsten Energie

Der Rotationswinkel der Parameterkombination mit niedrigster Wechselwirkungsenergie für jede Helix ist in Tabelle 8.1 gezeigt. Da die Röntgenstruktur als Ausgang gewählt wurde, ist ein Rotationswinkel von 0 Grad als richtig anzusehen. Im Folgenden werden jedoch alle Ergebnisse mit einem Rotationswinkel von 0 +/- 30 Grad als richtig innerhalb der Fehlergrenze betrachtet. Die Summe der nichtbindenden Energien (nb), die van-der-Waals (vdw) und die elektrostatische (elek) Energie wurden getrennt ausgewertet. Die meisten Werte wurden bei Betrachtung der Summe der nicht-bindenden Energien richtig erkannt. Von den insgesamt 23 betrachteten Helices haben 18 einen Rotationswinkel von 0 +/- 30 Grad. Fünf Helices haben eine größere Abweichung als 30 Grad vom von der Kristallstruktur vorgegebenen Wert. Die Auswertung der van-der-Waals Energie führt, wie auch die Auswertung der nicht-bindenden Energien, zu fünf Abweichungen der Rotationswinkel, die höher als 30 Grad sind.

Die durchschnittliche Abweichung bei der Betrachtung der Summe der nichtbindenden Energien beträgt 30 Grad, bei der Betrachtung der van-der-Waals Energien alleine jedoch 36 Grad. Die nichtbindenden Energien sind folglich ein besseres Kriterium für die Richtigkeit der Helixorientierung als die van-der-Waals Wechselwirkungen alleine.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen sind ungeeignet, eine korrekte Helixorientierung zu berechnen. Nur zwei Helices wurden richtig orientiert, die durchschnittliche Abweichung beträgt 101 Grad. Es wird also, wie oben schon beschrieben, die Spezifität der Wechselwirkung durch die van-der-Waals Wechselwirkungen bestimmt. Die durchschnittliche Abweichung in der Translation beträgt 2.1 Å bei der Summe der nicht-bindenden Wechselwirkungen und 1.9 Å bei der Betrachtung der van-der-Waals Energien. Beide Werte sind innerhalb der Genauigkeit der Methode als gleich anzusehen.

Die RMSD der modellierten Struktur zur Kristallstruktur sind 3.1 Å für ar1, 2.1 Å für brd und 1.6 Å für occ. Besonders der Wert für ar1 muss verbessert werden.

**TABELLE 8.1:**  
**Rotationswinkel bei Betrachtung der Helixkonformation mit niedrigster Energie.**

Protein	Helix	Rotation	Translation	Rotation	Translation	Rotation	Translation
		Nb <sup>1</sup>		Vdw <sup>2</sup>		Elec <sup>3</sup>	
<b>Occ</b>	<b>1</b>	15.7	-2.3	-20.5	0.77	205.9	-3.4
	<b>2</b>	-13.5	2.7	-0.4	2.7	-111.8	-3.5
	<b>3</b>	-93.5	-2.5	-19.5	3.3	140	-3
	<b>4</b>	-7.3	2	0.3	0.5	-114	3.8
<b>RMSD[Å]</b>		<b>1.6</b>		<b>2.1</b>		<b>4.4</b>	
<b>Brd</b>	<b>1</b>	19.6	-3.1	-16.4	1.9	-15.4	-1.2
	<b>2</b>	3.4	1.2	-2.1	-3.2	58.4	-0.6
	<b>3</b>	-2.6	1	31.2	-0.5	-2.6	1
	<b>4</b>	53.4	-0.8	6.4	-0.1	75.4	-0.3
	<b>5</b>	-8.4	-1.2	-8.4	-1.2	106.9	-3.6
	<b>6</b>	28.6	-2.8	-18.6	2.3	59.2	-2.1
	<b>7</b>	-23.6	-3	-2.8	-1.6	-168.3	-3.8
<b>RMSD[Å]</b>		<b>2.1</b>		<b>1.7</b>		<b>3.5</b>	
<b>Ar1</b>	<b>1</b>	4.3	-3.1	-128.1	3.6	79.1	3.3
	<b>2</b>	-117.5	-1.8	-117.5	-1.8	97.8	-3.4
	<b>3</b>	157	-0.8	-5.4	3	92	-3.4
	<b>4</b>	4.8	-0.9	8.1	-1.4	-127.8	3.7
	<b>5</b>	-0.1	2.5	-165.3	-2.3	77.1	1.4
	<b>6</b>	-11.8	-3.9	-11.8	-3.9	116.1	0.25
	<b>7</b>	7.4	-3.5	-0.1	3.2	-162.3	-1
	<b>8</b>	0.9	1.6	0.9	1.6	162.4	-2.9
	<b>9</b>	-30.4	3.7	-176	1.2	77.4	1.5
	<b>10</b>	71.3	1.9	71.3	1.9	-159.9	-3.1
	<b>11</b>	-14.9	0	-14.9	0	56.9	-3.1
	<b>12</b>	-8.1	1.9	-8.1	1.9	49	-3
<b>RMSD[Å]</b>		<b>3.1</b>		<b>4.1</b>		<b>4.7</b>	

**1: Betrachtung der Summe aus van-der-Waals und elektrostatischen Energien**

**2: Betrachtung nur der van-der-Waals Wechselwirkungen**

**3: Betrachtung nur der elektrostatischen Wechselwirkungen**

### 8.3.2 Betrachtung der Energieverteilungen

Wie schon im Falle des 4-Helix Bündels führt die Betrachtung der Energieverteilung zu einem besseren, jedoch nicht mehr eindeutigen Ergebnis (Tabelle 8.2) als die Betrachtung der niedrigsten Energie alleine. Nur noch zwei Helices und nicht fünf wie bei Betrachtung der niedrigsten Energien werden eindeutig mit einem Rotationswinkel mit einer größeren Abweichung als  $0 \pm 30$  Grad modelliert, allerdings sind bei weiteren fünf Helices die Ergebnisse nicht mehr eindeutig: eine erkannte Rotationskonformation führt zu einer richtigen Orientierung, eine zweite hingegen zu einer falschen. Hier müssten weitere experimentelle Daten bei der Unterscheidung herangezogen werden. Bei Helix 1 von ar1 ist zwar das Hauptmaximum der Verteilung falsch, es liegt jedoch noch ein kleines Nebenmaximum mit richtigem Rotationswinkel vor.

Werden die jeweils besseren Orientierungen vorgegeben, ist der RMSD der modellierten Struktur zur Kristallstruktur 2.5 Å für ar1, 2.0 Å für brd und 0.7 Å für occ. In Anbetracht der Anzahl der Helices sind diese Ergebnisse sehr zufriedenstellend. Insbesondere die Struktur von occ wurde hervorragend wiedergegeben. Die Abweichung von 0.7 Å liegt innerhalb der Fehler der Kristallstruktur.

## 8.4 Diskussion

Offensichtlich funktioniert das Verfahren auch für große transmembrane Proteine, sofern experimentelle Daten den Ort und den Kippwinkel der Helices festlegen. Einige Ergebnisse sind allerdings nicht eindeutig. Hier müssen experimentellen Daten oder auch Überlegungen hinsichtlich der Konservierung bestimmter Aminosäuren zwischen den verschiedenen Konformationen zur Unterscheidung der Konformationen herangezogen werden. Problematisch bei der vorgestellten Berechnungsweise ist, dass von der Kristallstruktur, also nicht von idealen Helices, ausgegangen wurde. Dadurch sind Änderungen der internen Freiheitsgrade wie z.B. Knicke in den Helices automatisch mit berücksichtigt worden. Außerdem ist der Kippwinkel exakt richtig, was für echte Modellierungsstudien unrealistisch ist und die Ergebnisse zum positiven verfälscht. Weitere

Untersuchungen müssen zeigen, ob ähnlich gute Ergebnisse auch erzielt werden, wenn von idealen Helices mit nur annäherungsweise richtigen Kippwinkeln ausgegangen wird. Für zukünftige Studien bieten sich EM-Aufnahmen von Bakteriorhodopsin an, die als Ausgangsmaterial für eine reale Simulation ideal geeignet sind.

**TABELLE 8.2:**

*Rotations- und Translationswerte nach Betrachtung der Parameterverteilung in Abhängigkeit von der Wechselwirkungsenergie.*

<b>Protein</b>	<b>Helix</b>	<b>Rotation</b>	<b>Translation</b>
<b>ar1</b>	1	<b>-125</b>	-1.5
	2	1.1	1.5
	3	14	2
	4	-4	-3
	5	-6	2.5
	6	2	1.5
	7	-2	1.5
	8	-8/-111	1.5
	9	-11/175	-3
	10	5	3.5
	11	-18	1
	12	-2.3	1.5
<b>RMSD[Å]</b>		<b>2.5</b>	
<b>brd</b>	1	-1.6	-1
	2	-1.6/-145	1.5
	3	-1	1.5
	4	64	1
	5	12	-1.5
	6	3/127	-3
	7	-12	-2.5
<b>RMSD[Å]</b>		<b>2.0</b>	
<b>occ</b>	1	8	-1.5
	2	-6	-0.5
	3	-8/-73	0
	4	-2	1
<b>RMSD[Å]</b>		<b>0.7</b>	

## 9. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transmembranproteine mit steigender Komplexität erfolgreich modelliert. Zuerst wurden mögliche Konformationen des transmembranen Heterodimers des  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  Integrins durch eine systematische Absuche des Konformationsraumes des Helixpaares berechnet. Dadurch konnten neue Erkenntnisse der komplexen Bewegungen bei der Signatransduktion von Integrinen gewonnen werden. Ein Mechanismus der Signaltransduktion wurde entwickelt, der im Einklang mit bisherigen Mechanismen steht, jedoch einen weiteren Zustand aufweist. Der bekannte Zwei-Stufen Mechanismus wurde zu einem Drei-Stufen Mechanismus erweitert. Neuere Untersuchungen bestätigen die Existenz mehrerer Stufen und sind in gutem Einklang mit dem hier vorgeschlagenen Modell.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, ein Vier-Helix-Bündel zu modellieren. Zunächst wurde, aufbauend auf einen Vorschlag von Adams und Brunger bei Arbeiten an Phospholamban, das Vier-Helix-Bündel in vier Zwei-Helix-Paare aufgeteilt und von jedem dieser Helixpaare der Konformationsraum systematisch abgesucht. Als Testsystem wurde ein Ausschnitt der Oxidoreduktase gewählt, der ein Vier-Helix-Bündel bekannter Struktur bildet. Mit dem vorgeschlagenen Verfahren konnte das Vier-Helix-Bündel nicht gut modelliert werden, weshalb ein neues Verfahren entwickelt wurde. Dieses Verfahren sucht den Konformationsraum des gesamten Bündels, nicht von Teilstrukturen, mit Hilfe einer Bibliothek von Zufallskonformationen ab. Nur mit Hilfe der Wechselwirkungsenergie als Unterscheidungskriterium konnten so vier mögliche Konformationen ermittelt werden. Eine dieser Konformationen weist einen RMSD zur experimentellen Struktur von 2 Å auf. Damit ist dies die bisher erste Arbeit, die ein Vier-Helix-Bündel ohne experimentelle Daten erfolgreich modellieren konnte.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde die Struktur des aus vier Helices bestehenden Transporters EmrE modelliert. EmrE formt ein Homodimer aus zwei Vier-Helix-Bündeln. Durch Hinzunahme von Mutationsstudien, NMR-Ergebnissen und *crosslinking* Daten ist es gelungen, ein Modell des Transporters zu entwickeln, das in sehr gutem Einklang mit allen bisher vorhandenen biochemischen Daten steht. Um aus diesem Modell einen Transportmechanismus abzuleiten, sind weitere Studien nötig.

---

Eine Modellierung größerer transmembraner Proteine ohne weitere experimentelle Daten ist mit den bisherigen Mitteln nicht möglich. Daher wurde für Bakteriorhodopsin untersucht, welche experimentellen Daten für eine erfolgreiche Modellierung nötig sind. Durch Berechnung von Helix-Helix-Wechselwirkungen wurde festgestellt, dass sowohl die Helixrotation als auch eine Translation vertikal und lateral zur Membranebene von Helix-Helix Wechselwirkungen bestimmt werden, wohingegen der Kippwinkel der Helix nahezu unabhängig von Helix-Helix Wechselwirkungen ist. Daher ist die Kenntnis zumindest der Kippwinkel der einzelnen Helices für die Modellierung komplexer Transmembranproteine unabdingbar.

Es wurde im weiteren gezeigt, dass bei Kenntnis von Kippwinkel und Position der Helix der Rotationswinkel und die Vertikaltranslation mit Hilfe der vorgestellten Rechenmethode optimiert werden können. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Strukturen.

Die vorgestellten Arbeiten liefern ein Instrumentarium, mit dem Helixbündel bis zu vier Helices nahezu ohne experimentelle Daten modelliert werden können. Für komplexere Proteine sind Daten mit niedriger Strukturauflösung, wie z. B. elektronenmikroskopische Aufnahmen, unabdingbar. Der schnelle Fortschritt in dieser Technik lässt vermuten, dass in naher Zukunft eine Reihe von 2-dimensionalen Strukturen von transmembranen Proteinen bekannt sein werden, die mit Hilfe der hier vorgestellten Methoden gut in 3-dimensionale Modelle überführt werden können.

## 10. Rechenmethoden

Sämtliche Rechnungen wurden im Vakuum durchgeführt. Dies stellt eine erhebliche Reduzierung und Vereinfachung des Systems dar. Die Vereinfachung führt zu Ungenauigkeiten insbesondere bei der Behandlung der elektrostatischen Eigenschaften. Die Rechenzeiterparnis rechtfertigt jedoch die vorgenommene Reduzierung des Systems, zumal meist nur die vollständig in der Membran liegenden helikalen Abschnitte des Proteins betrachtet wurden, die an der Membran-Wasser Grenzschicht liegenden *loops* jedoch außer Acht gelassen wurden.

### 10.1 Globale Suche des Konformationsraumes der Integrine

Die Sequenzen der transmembranen und zytosolischen Domänen der Integrine stammen von der swissprot Datenbank (<http://www.expasy.ch/sprot/>) und wurden mit dem Programm ClustalW angeordnet.<sup>[179]</sup>

Der Konformationsraum der TM Domänen der Integrine wurde systematisch abgesucht. Dabei wurden die Rotationswinkel  $\omega$  und  $\theta$  (siehe Abbildung 1.4) von  $0^\circ$ - $360^\circ$  in  $45^\circ$  Schritten unabhängig voneinander inkrementiert. Die Startstrukturen hatten Kreuzungswinkel von jeweils  $25^\circ$  und  $-25^\circ$  relativ zur Membrannormalen. Anfänglich war der Vertikalshift auf  $0 \text{ \AA}$  gesetzt. Vier *simulated annealing/molecular dynamics* Rechnungen mit verschiedenen zufälligen Startgeschwindigkeiten der Atome wurden für jede Startstruktur mit Hilfe des Programms CNS (Version 0.5)<sup>[10]</sup> durchgeführt. Dabei konnten sich alle Freiheitsgrade verändern. Als Kraftfeld dienten die OPLS-Parameter<sup>[180]</sup> mit impliziten Wasserstoffatomen außer für polare oder atomare Gruppen, bei denen die Wasserstoffatome explizit behandelt wurden. Zuerst wurde das System 5000 Schritte mit einer Schrittweite von 0.001 ps bei 600 K, dann 5000 Schritte mit einer Schrittweite von 0.002 ps bei 300 K simuliert.

Die 512 resultierenden Strukturen wurden in Cluster unterteilt. Ein Cluster hat mindestens 10 Mitglieder mit einem RMSD von unter  $1.0 \text{ \AA}$  zwischen einer Struktur im Cluster und zumindest einer anderen. Es gab kein Energie *cut-off* für die Cluster. Die gemittelte Struktur eines jeden Clusters wurde errechnet und der gleichen Simulation unterworfen wie die ursprünglichen Strukturen. Während der Rechnungen wurde die Helizität durch entsprechende Abstandsrestrains zwischen N(i) und O(i+4)

erhalten. Auch wurde der maximale Abstand zwischen den geometrischen Zentren der Helices auf 10.5 Å begrenzt. Die nichtbindenden Energien wurden nur bis zu einem Abstand der interagierenden Atome von 13 Å berechnet. Für die Berechnung des Signalweges wurden die entsprechenden Strukturen 5000 Schritte mit einer Schrittweite von 0.001 ps bei 600 K und weitere 5000 Schritte mit einer Schrittweite von 0.002 ps bei 300 K simuliert. Es wurden hier pro Startstruktur 150 Strukturen berechnet.

## 10.2 Docking Studien an Integrin $\alpha_v\beta_3$

### 10.2.1 Homologie Modelling

Die Strukturen der I-Domäne des Integrins  $\alpha_2$  und der  $\beta_A$ -Domäne des Integrins  $\beta_3$  wurden mit der *MagicFit* Funktion des Programmpakets SwissPdbViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/>)<sup>[181]</sup> bestmöglich übereinander gelegt. Die strukturelle Ähnlichkeit diente als Grundlage für das Sequenz-*alignment*. Die Struktur des entsprechenden loops von  $\beta_3$  wurde dann mit Hilfe des Programms Modeller<sup>[182]</sup> an die Struktur der  $\alpha_2$ - Domäne angepasst. Hierzu wurde das durch die Strukturähnlichkeit bestimmte Sequenz-*alignment* und die *simulated annealing* Routine des Programms Modeller<sup>[182]</sup> mit Standarteinstellungen benutzt. Die Seitenkettenrotamere der betroffenen Aminosäuren wurden mit dem *mean-field* Ansatz des Programms Confmat<sup>[183]</sup> nachoptimiert. 20 iterative Zyklen zur Minimierung der *mean-field* Energie wurden durchlaufen. Konvergenz der Energie wurde überprüft. Nach Optimierung der Seitenkettenrotamere wurde das System mit harmonisch eingeschränkten Rückgradatomen 250 Schritte mit einer Powell-Minimierung mit Hilfe des Programms CNS und den Kraftfeldparametern des OPLS-Kraftfeldes<sup>[180]</sup> energieminimiert. Das Programmpaket Sybyl 6.6 (Tripos Inc., St. Louis) wurde dann benutzt, um polare Wasserstoffe optimal hinzuzufügen, Partialladungen neu zu berechnen und eine erneute Geometrirelaxation des Proteins durchzuführen.

### 10.2.2 Docking des Inhibitors

Der Inhibitor wurde in einer Gitter-Box mit den Ausmaßen von 38x40x40 Å, die um die MIDAS-Region zentriert war, an das Protein mit Hilfe des automatisierten Docking-Programms AutoDock<sup>[184]</sup> mit freien Torsionswinkel der rotierbaren Bindungen gedockt. Die Abstände der Punkte in dem Gitter waren 0.375 Å. Der Ligand wurde 50 Docking-Rechnungen ausgesetzt. Es wurde dabei der in AutoDock vorgesehene Lamarck'sche genetische Algorithmus angewandt. Jede der 50 Docking-Rechnungen wurde mit 50 zufällig ausgesuchten Startpositionen initiiert. Bis zu 300 lokale Optimierungssuchen wurden durchgeführt.

### 10.3. Modellierung des 4-Helixbündels der Cytochrome C Oxidase durch Aufteilung in Helixpaare.

Das globale Absuchen des Konformationsraumes wurde wie in Kapitel 10.1 beschrieben durchgeführt. Die weitere Auswertung erfolgte interaktiv an der graphischen Oberfläche des Programms InsightII (MSI, Berkley).

### 10.4 Erstellung einer Zufallsbibliothek von Konformationen eines Helixbündels

Die Zufallsbibliotheken der Konformationen wurden mit Hilfe des Programms CNS (Vers. 0.5)<sup>[10]</sup> erstellt. Die Längsachse, um die rotiert wurde, wurde durch einen Vektor definiert, der seinen Ursprung im geometrischen Zentrum der Rückgradatome der ersten sieben Seitenketten in der Helix hat und in die Richtung des geometrischen Zentrums der Rückgradatome der letzten sieben Seitenketten der Helix zeigt. Die Rotation erfolgte von 0-360 Grad. Mit Hilfe eines Histogramms aller Rotationswinkel wurde eine Gleichverteilung der Rotationswinkel sicherhergestellt. Die Vertikaltranslation erfolgte entlang des gleichen Vektors um 4 Å in Richtung des N-Terminus wie auch um 4 Å in Richtung des C-Terminus, also um 8 Å insgesamt. Die Lateraltranslation erfolgte entlang des Vektors, der seinen Ursprung im geometrischen Zentrum aller Rückgradatome hat und in die Richtung des geometrischen Zentrums der Rückgradatome der translatierten Helix zeigt. Die Translation erfolgte um 3 Å in

Richtung des Ursprunges des Vektors und um 5 Å in Richtung des Kopfes des Vektors. Der Kippwinkel wurde definiert als der Winkel zwischen der angenommenen Membrannormalen und dem Vektor der Längsachse der Helix. Dieser Winkel wurde von 0-40 Grad für occ und um 7-47 Grad für EmrE variiert. Für alle Freiheitsgrade wurde die Gleichverteilung der Parameterwerte in der Strukturbibliothek überprüft und sichergestellt.

Nach Änderung der Strukturparameter wurde eine Powell-Energieminimierung mit 50 Schritten mit Hilfe des Programms CNS (Vers. 0.5) bei fixierten Rückgradatomen durchgeführt. Die van-der-Waals und elektrostatischen Anteile der Wechselwirkung einer jeden Helix mit dem Rest des Proteins wurden getrennt bis zu einem Abstand von 13 Å berechnet und später aufsummiert. Eine abschließende *simulated annealing/molecular dynamics* Rechnung erfolgte nicht. Für saemmtliche Rechnungen wurde das OPLS-Kraftfeld benutzt.

## 10.5 Dimerisierung von EmrE

Vor der Dimerisierung wurde der *loop* zwischen Helix 2 und Helix 3 interaktiv mit Hilfe des Programms SwissPdbViewer eingefügt. Es erfolgte eine Geometrieoptimierung des *loops* mit dem Programm CNS (Version 0.5), für die zuerst eine MD/SA Rechnung von 1000 Schritten bei einer Temperatur von 600 K mit einer Schrittgröße von 0.001 ps, gefolgt von einer MD Simulation bei 300 K mit 1000 Schritten und einer Schrittweite von 0.002 ps sowie einer Powell-Minimierung mit 1000 Schritten durchgeführt wurde. Hierbei waren die helikalen Abschnitte des Proteins fixiert.

Für die Dimerisierung wurden *simulated annealing/molecular dynamics* Rechnungen mit einer Torsionsdynamik durchgeführt, die den Vorteil hat, dass schnelle, durch Bindungslängen-Änderungen hervorgerufene Schwingungen eingefroren werden. Dadurch kann das System bei höheren Temperaturen und mit größeren Zeitschritten gerechnet werden. Das System wurde nach 1000 Schritten Hochtemperaturdynamik bei 50000K mit einer Schrittweite von 0.015 ps von 50000 K auf 1000 K ebenfalls mit einer Torsionsdynamik abgekühlt und danach mit 1000 Schritten energieminiert. 200 Strukturen mit zufälligen Anfangsgeschwindigkeiten für die einzelnen Atome wurden berechnet. Die 50 Konformationen mit der

---

niedrigsten Energie wurden mit dem Programm NMRclust<sup>[185]</sup> ohne vorgegebenen RMSD *cutoff* für die Clusterbildung in Cluster aufgeteilt. Die Strukturen im höchstpopulierten Cluster wurden gemittelt und energieminiert.

## 10.6 Helix-Helix-Wechselwirkungen in Bakteriorhodopsin

Die Vektoren für Rotation, Translationen und Kippwinkel sind ermittelt worden wie in Kapitel 10.4 beschrieben. Die Rotation erfolgte von  $-100^\circ$  bis  $+100^\circ$  um die Längsachse der Helices in  $10^\circ$  Schritten, die longitudinale Translation um  $4 \text{ \AA}$  in beide Richtungen in  $1 \text{ \AA}$  Schritten, der Kippwinkel in  $5^\circ$  Schritten  $20^\circ$  in beide Richtungen, die Translation in Richtung des Vektors (Schwerpunkt Helixbündel  $\rightarrow$  Schwerpunkt Helix) in  $1 \text{ \AA}$  Schritten bis zu einem Abstand von  $8 \text{ \AA}$ . Nach der Änderung der Koordinaten wurde zunächst eine 100 Schritte Powell-Minimierung mit harmonisch beschränkten Rückgradatomen durchgeführt. Anschließend folgten Dynamik-Rechnungen mit 1000 Schritten bei  $600 \text{ K}$  und mit weiteren 1000 Schritten bei  $300 \text{ K}$  mit einer Schrittweite von  $0.001 \text{ ps}$  bei  $600 \text{ K}$  und  $0.002 \text{ ps}$  bei  $300 \text{ K}$ . Auch hier wurden die Rückgradatome auf ihren Positionen mit einem harmonischen Potential festgehalten. Eine abschließende Minimierung von 1000 Schritten wurde durchgeführt und die verschiedenen Wechselwirkungsanteile getrennt voneinander berechnet.

## 10.7 Modellierung transmembraner Proteine mit Strukturdaten niedriger Auflösung

Die Rechnungen erfolgten wie in Kapitel 10.4 beschrieben. Es wurden jedoch nur die Vertikaltranslation und Rotation verändert. Als Startstruktur für die Rechnungen diente die Röntgenstruktur.

---

## 11. Literatur

- [1] A. Neumaier, *SIAM Rev.* **1997**, *39*, 407.
- [2] L. Jaroszewski, W. Li, A. Godzik, *Protein Sci* **2002**, *11*, 1702.
- [3] L. Jaroszewski, L. Rychlewski, B. Zhang, A. Godzik, *Protein Sci* **1998**, *7*, 1431.
- [4] J. Skolnick, A. Kolinski, D. Kihara, M. Betancourt, P. Rotkiewicz, M. Boniecki, *Proteins* **2001**, *45*, 149.
- [5] I. K. Roterman, K. D. Gibson, H. A. Scheraga, *J Biomol Struct Dyn* **1989**, *7*, 391.
- [6] I. K. Roterman, M. H. Lambert, K. D. Gibson, H. A. Scheraga, *J Biomol Struct Dyn* **1989**, *7*, 421.
- [7] B. Brooks, R. Bruccoleri, B. Olafson, S. D., S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187.
- [8] A. T. Brunger, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, M. Karplus, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 3801.
- [9] G. M. Clore, M. Nilges, A. T. Brunger, M. Karplus, A. M. Gronenborn, *FEBS Lett* **1987**, *213*, 269.
- [10] A. T. Brunger, P. D. Adams, G. Clore, W. Gros, R. Grosse-Kunstleve, J. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. Pannu, R. Resd, L. Rice, T. Simonson, G. Warren, *Acta Cryst. D* **1998**, *54*, 905.
- [11] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, John Wiley and Sons, **1995**.
- [12] S. H. White, W. C. Wimley, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1999**, *28*, 319.
- [13] J. L. Popot, D. M. Engelman, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4031.
- [14] J. L. Popot, D. M. Engelman, *Annu Rev Biochem* **2000**, *69*, 881.
- [15] G. von Heijne, C. Manoil, *Protein Eng* **1990**, *4*, 109.
- [16] G. von Heijne, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1994**, *23*, 167.
- [17] G. von Heijne, *Q Rev Biophys* **1999**, *32*, 285.
- [18] G. von Heijne, *Genet Eng* **1992**, *14*, 1.
- [19] K. G. Fleming, D. M. Engelman, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 14340.
- [20] P. D. Adams, D. M. Engelman, A. T. Bruenger, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1996**, *26*, 257.

- 
- [21] P. D. Adams, I. T. Arkin, D. M. Engelman, A. T. Brunger, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 154.
- [22] P. D. Adams, A. T. Brunger, in *Membrane Protein Assembly* (Ed.: G. van Heijne), R. G. Landes Company, London, **1997**, p. pp 251.
- [23] J. A. Briggs, J. Torres, I. T. Arkin, *Proteins* **2001**, *44*, 370.
- [24] K. M. Ottemann, W. Xiao, Y.-K. Shin, D. E. Koshland, Jr., *Science* **1999**, *285*, 1751.
- [25] M. J. Humphries, *Biochemical Society Transactions* **2000**, *28*, 311.
- [26] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14461.
- [27] R. R. Hantgan, M. Rocco, C. Nagaswami, J. W. Weisel, *Protein Sci* **2001**, *10*, 1614.
- [28] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington, *Cell* **2000**, *101*, 47.
- [29] R. C. Liddington, L. A. Bankston, *Exp. Cell Res.* **2000**, *261*, 37.
- [30] X. Du, M. Gu, J. W. Weisel, C. Nagaswami, J. S. Bennett, R. Bowditch, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **1993**, *269*, 23087.
- [31] T. M. Leisner, J. D. Wencel-Drake, W. Wang, S. C.-T. Lam, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12945.
- [32] S. Levy-Toledano, *Haemostasis* **1999**, *29*, 4.
- [33] L. J. Green, M. J. Humphries, *Adv. Mol. Cell Biol.* **1999**, *28*, 3.
- [34] S. Dedhar, G. E. Hannigan, *Curr. Op. Cell Biol.* **1996**, *8*, 657.
- [35] M. E. Hemler, *Curr. Op. Cell Biol.* **1998**, *10*, 578.
- [36] S. Liu, D. A. Calderwood, M. H. Ginsberg, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3563.
- [37] P. M. Hwang, H. J. Vogel, *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 83.
- [38] O. Vinogradova, T. Haas, E. F. Plow, J. Qin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2000**, *97*, 1450.
- [39] J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339.
- [40] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151.
- [41] P. Frchet, A. Duperray, E. Delachanal, G. Marguerie, *Biochemistry* **1992**, *31*, 117.

- 
- [42] J. A. Peterson, G. P. Visentin, P. J. Newman, R. H. Aster, *Blood* **1998**, *92*, 2053.
- [43] T. S. Ulmer, B. Yaspan, M. H. Ginsberg, I. D. Campbell, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7498.
- [44] R. Li, C. R. Babu, J. D. Lear, A. J. Wand, J. S. Bennett, W. F. DeGrado, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 12462.
- [45] C. Lu, J. Takagi, T. A. Springer, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 14642.
- [46] P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6571.
- [47] T. A. Haas, E. F. Plow, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6017.
- [48] T. A. Haas, E. F. Plow, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1395.
- [49] L. Vallar, C. Melchior, S. Plancon, H. Drobecq, G. Lippens, V. Regnault, N. Kieffer, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 17257.
- [50] J. P. Scott, III, J. P. Scott, II, Y.-L. Chao, P. J. Newman, *Thromb. Haemostasis* **1998**, *80*, 546.
- [51] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785.
- [52] J. Takagi, H. P. Erickson, T. A. Springer, *Nat. Struc. Biol.* **2001**, *8*, 412.
- [53] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi, T. A. Springer, *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 282.
- [54] K. R. MacKenzie, J. H. Prestegard, D. M. Engelman, *Science* **1997**, *276*, 131.
- [55] M. A. Lemmon, J. M. Flanagan, H. R. Treutlein, J. Zhang, D. M. Engelman, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12719.
- [56] W. P. Russ, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, *96*, 863.
- [57] B. Brosig, D. Langosch, *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1052.
- [58] A. Senes, M. Gerstein, D. M. Engelman, *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 921.
- [59] Y. Duan, P. A. Kollman, *Science* **1998**, *282*, 740.
- [60] S. C. Harvey, H. A. Gabb, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1167.
- [61] O. S. Smart, *Chem. Phys. Letts.* **1994**, *222*, 405.
- [62] R. Czerminski, R. Elber, *Int. J. Quantum Chem., Quantum Chem. Symp.* **1990**, *24*, 167.
- [63] J. Schlitter, M. Engels, P. Krueger, *J. Mol. Graphics* **1994**, *12*, 84.
- [64] M. A. E. C. El-Kettani, J. Durup, *Biopolymers* **1992**, *32*, 561.

- 
- [65] A. G. Ladurner, L. S. Itzhaki, V. Daggett, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1998**, *95*, 8473.
- [66] V. S. Pande, D. S. Rokhsar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, *96*, 9062.
- [67] F. S. Cordes, A. Kukol, L. R. Forrest, I. T. Arkin, M. S. Sansom, W. B. Fischer, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1512*, 291.
- [68] S. Sukharev, M. Betanzos, C.-S. Chiang, H. R. Guy, *Nature* **2001**, *409*, 720.
- [69] S. Sukharev, S. R. Durell, H. R. Guy, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 917.
- [70] D. Boettiger, F. Huber, L. Lynch, S. Blystone, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 1227.
- [71] D. Boettiger, L. Lynch, S. Blystone, F. Huber, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31684.
- [72] J. Wippler, W. C. Kouns, E. J. Schlaeger, H. Kuhn, P. Hadvary, B. Steiner, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 8754.
- [73] E. C. Tozer, R. C. Liddington, M. J. Sutcliffe, A. H. Smeeton, J. C. Loftus, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21978.
- [74] Y. Takada, T. Kamata, A. Irie, W. Puzon-McLaughlin, X. P. Zhang, *Matrix Biol.* **1997**, *16*, 143.
- [75] J. C. Loftus, C. E. Halloran, M. H. Ginsberg, L. P. Feigen, J. A. Zablocki, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2033.
- [76] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033.
- [77] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2586.
- [78] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045.
- [79] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709.
- [80] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233 .
- [81] K. E. Gottschalk, R. Gunther, H. Kessler, *Chembiochem* **2002**, *3*, 470.
- [82] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinkas, J. W. Venslavsky, C. C. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S. M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, et al., *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22.

- 
- [83] S. Honda, Y. Tomiyama, N. Pampori, H. Kashiwagi, T. Kiyoi, S. Kosugi, S. Tadokoro, Y. Kurata, S. J. Shattil, Y. Matsuzawa, *Blood* **2001**, *97*, 175.
- [84] J. D. Humphries, J. A. Askari, X. P. Zhang, Y. Takada, M. J. Humphries, A. P. Mould, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20337.
- [85] A. P. Mould, J. A. Askari, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20324.
- [86] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9459.
- [87] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461.
- [88] G. Hölzemann, *IDrugs* **2001**, *4*, 72.
- [89] E. Plancker, H. Kessler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [90] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
- [91] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50.
- [92] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler, *Protein Sci* **2002**, *11*, 1800.
- [93] D. L. Farrens, C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell, H. G. Khorana, *Science* **1996**, *274*, 768.
- [94] A. D. Jensen, F. Guarnieri, S. G. Rasmussen, F. Asmar, J. A. Ballesteros, U. Gether, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 9279.
- [95] U. Gether, *Endocr Rev* **2000**, *21*, 90.
- [96] U. Gether, B. K. Kobilka, *J Biol Chem* **1998**, *273*, 17979.
- [97] U. Gether, S. Lin, P. Ghanouni, J. A. Ballesteros, H. Weinstein, B. K. Kobilka, *Embo J* **1997**, *16*, 6737.
- [98] S. Subramaniam, R. Henderson, *Nature* **2000**, *406*, 653.
- [99] A. Bohm, R. Gaudet, P. B. Sigler, *Curr Opin Biotechnol* **1997**, *8*, 480.
- [100] M. A. Wall, D. E. Coleman, E. Lee, J. A. Iniguez-Lluhi, B. A. Posner, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Cell* **1995**, *83*, 1047.
- [101] M. A. Wall, B. A. Posner, S. R. Sprang, *Structure* **1998**, *6*, 1169.
- [102] C. K. Miranti, J. S. Brugge, *Nat Cell Biol* **2002**, *4*, E83.
- [103] P. D. Adams, A. S. Lee, A. T. Brunger, D. M. Engelman, *Ann NY Acad Sci* **1998**, *853*, 178.
- [104] Z. Ahmed, D. G. Reid, A. Watts, D. A. Middleton, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1468*, 187.

- 
- [105] I. T. Arkin, P. D. Adams, K. R. MacKenzie, M. A. Lemmon, A. T. Brunger, D. M. Engelman, *EMBO J.* **1994**, *13*, 4757.
- [106] I. T. Arkin, K. R. MacKenzie, L. Fisher, S. Aimoto, D. M. Engelman, S. O. Smith, *Nat Struct Biol* **1996**, *3*, 240.
- [107] I. T. Arkin, P. D. Adams, A. T. Brunger, S. Aimoto, D. M. Engelman, S. O. Smith, *J Membr Biol* **1997**, *155*, 199.
- [108] I. T. Arkin, P. D. Adams, A. T. Brunger, S. O. Smith, D. M. Engelman, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1997**, *26*, 157.
- [109] R. L. Cornea, J. M. Autry, Z. Chen, L. R. Jones, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 41487.
- [110] S. Frank, R. A. Kammerer, S. Hellstern, S. Pegoraro, J. Stetefeld, A. Lustig, L. Moroder, J. Engel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 6825.
- [111] P. Herzyk, R. E. Hubbard, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1203.
- [112] C. Karim, J. Stamm, J. Karim, L. Jones, D. Thomas, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12074.
- [113] R. Kovacs, M. Nelson, H. Simmerman, L. Jones, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 18364.
- [114] H. Li, M. J. Cocco, T. A. Steitz, D. M. Engelman, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6636.
- [115] R. J. Mortishire-Smith, H. Broughton, V. M. Garsky, E. J. Mayer, R. G. Johnson, Jr., *Ann N Y Acad Sci* **1998**, *853*, 63.
- [116] P. Pollesello, A. Annala, M. Ovaska, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1784.
- [117] P. Pollesello, A. Annala, *Biophys J* **2002**, *83*, 484.
- [118] M. S. Sansom, G. R. Smith, O. S. Smart, S. O. Smith, *Biophys Chem* **1997**, *69*, 269.
- [119] H. Simmerman, Y. Kobayashi, J. Autry, L. Jones, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5941.
- [120] S. O. Smith, T. Kawakami, W. Liu, M. Ziliox, S. Aimoto, *J Mol Biol* **2001**, *313*, 1139.
- [121] J. Torres, P. D. Adams, I. T. Arkin, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 677.
- [122] J. Torres, A. Kukol, I. T. Arkin, *Biophys J* **2001**, *81*, 2681.
- [123] W. Ying, S. E. Irvine, R. A. Beekman, D. J. Siminovitch, S. O. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11125.

- 
- [124] S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, *J Bioenerg Biomembr* **1998**, *30*, 7.
- [125] Y. Pilpel, N. Ben-Tal, D. Lancet, *J Mol Biol* **1999**, *294*, 921.
- [126] S. Schuldiner, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, *J Exp Biol* **1997**, *200*, 335.
- [127] E. A. Emini, D. J. Graham, L. Gotlib, J. H. Condra, V. W. Byrnes, W. A. Schleif, *Nature* **1993**, *364*, 679.
- [128] P. Borst, *Nature* **1984**, *309*, 580.
- [129] H. Nikaido, *Science* **1994**, *264*, 382.
- [130] I. T. Paulsen, M. H. Brown, R. A. Skurray, *Microbiol Rev* **1996**, *60*, 575.
- [131] M. D. Marger, M. H. Saier, Jr., *Trends Biochem Sci* **1993**, *18*, 13.
- [132] I. T. Paulsen, R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier, Jr., R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, L. L. Grinius, *Mol Microbiol* **1996**, *19*, 1167.
- [133] L. L. Grinius, E. B. Goldberg, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 29998.
- [134] H. Yerushalmi, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J Biol Chem* **1995**, *270*, 6856.
- [135] I. T. Arkin, W. P. Russ, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7233.
- [136] M. Schwaiger, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, M. Coles, A. Groger, C. Schwarz, S. Schuldiner, H. Kessler, *Eur J Biochem* **1998**, *254*, 610.
- [137] H. Yerushalmi, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *J Biol Chem* **1996**, *271*, 31044.
- [138] C. G. Tate, E. R. Kunji, M. Lebendiker, S. Schuldiner, *Embo J* **2001**, *20*, 77.
- [139] H. Yerushalmi, S. Schuldiner, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14711.
- [140] C. Glaubitz, A. Groger, K. Gottschalk, P. Spooner, A. Watts, S. Schuldiner, H. Kessler, *FEBS Lett* **2000**, *480*, 127.
- [141] H. Yerushalmi, S. Schuldiner, *FEBS Lett* **2000**, *476*, 93.
- [142] H. Yerushalmi, S. Schuldiner, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 5264.
- [143] T. R. Muth, S. Schuldiner, *Embo J* **2000**, *19*, 234.
- [144] H. Yerushalmi, S. S. Mordoch, S. Schuldiner, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 12744.
- [145] J. Wu, D. Hardy, H. R. Kaback, *J Mol Biol* **1998**, *282*, 959.
- [146] R. M. Glaeser, J. Baldwin, T. A. Ceska, R. Henderson, *Biophys J* **1986**, *50*, 913.
- [147] E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau, *Science* **1997**, *277*, 1676.
- [148] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, *J Mol Biol* **1990**, *213*, 899.

- 
- [149] N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin, R. Henderson, *J Mol Biol* **1996**, 259, 393.
- [150] T. A. Ceska, R. Henderson, J. M. Baldwin, F. Zemlin, E. Beckmann, K. Downing, *Acta Physiol Scand Suppl* **1992**, 607, 31.
- [151] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, *Biochem Soc Trans* **1990**, 18, 844.
- [152] M. P. Krebs, T. A. Isenbarger, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2000**, 1460, 15.
- [153] E. Pebay-Peyroula, R. Neutze, E. M. Landau, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2000**, 1460, 119.
- [154] H. Luecke, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2000**, 1460, 133.
- [155] S. Subramaniam, R. Henderson, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2000**, 1460, 157.
- [156] M. Kataoka, H. Kamikubo, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2000**, 1460, 166.
- [157] T. Marti, *J Biol Chem* **1998**, 273, 9312.
- [158] M. Kataoka, T. W. Kahn, Y. Tsujiuchi, D. M. Engelman, F. Tokunaga, *Photochem Photobiol* **1992**, 56, 895.
- [159] T. W. Kahn, D. M. Engelman, *Biochemistry* **1992**, 31, 6144.
- [160] W. Xiao, L. S. Brown, R. Needleman, J. K. Lanyi, Y.-K. Shin, *J. Mol. Biol.* **2000**, 304, 715.
- [161] G. Schreiber, *Curr Opin Struct Biol* **2002**, 12, 41.
- [162] T. Selzer, G. Schreiber, *Proteins* **2001**, 45, 190.
- [163] H. I. Petrache, A. Grossfield, K. R. MacKenzie, D. M. Engelman, T. B. Woolf, *J. Mol. Biol.* **2000**, 302, 727.
- [164] P. Braun, G. von Heijne, *Biochemistry* **1999**, 38, 9778.
- [165] J. A. Killian, G. von Heijne, *Trends Biochem Sci* **2000**, 25, 429.
- [166] M. Monne, I. Nilsson, M. Johansson, N. Elmhed, G. von Heijne, *J Mol Biol* **1998**, 284, 1177.
- [167] M. Yeager, V. M. Unger, A. K. Mitra, *Methods Enzymol* **1999**, 294, 135.
- [168] F. A. Kovacs, T. A. Cross, *Biophys J* **1997**, 73, 2511.
- [169] S. Moltke, I. Wallat, N. Sakai, K. Nakanishi, M. F. Brown, M. P. Heyn, *Biochemistry* **1999**, 38, 11762.

- 
- [170] F. M. Marassi, S. J. Opella, P. Juvvadi, R. B. Merrifield, *Biophys J* **1999**, *77*, 3152.
- [171] F. A. Kovacs, J. K. Denny, Z. Song, J. R. Quine, T. A. Cross, *J Mol Biol* **2000**, *295*, 117.
- [172] C. Glaubitz, G. Grobner, A. Watts, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1463*, 151.
- [173] A. Naito, T. Nagao, K. Norisada, T. Mizuno, S. Tuzi, H. Saito, *Biophys J* **2000**, *78*, 2405.
- [174] F. M. Marassi, S. J. Opella, *J Magn Reson* **2000**, *144*, 150.
- [175] J. Wang, J. Denny, C. Tian, S. Kim, Y. Mo, F. Kovacs, Z. Song, K. Nishimura, Z. Gan, R. Fu, J. R. Quine, T. A. Cross, *J Magn Reson* **2000**, *144*, 162.
- [176] J. Torres, A. Kukol, I. T. Arkin, *Biophys J* **2000**, *79*, 3139.
- [177] J. Torres, I. T. Arkin, *Biophys J* **2002**, *82*, 1068.
- [178] C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **1997**, *94*, 10547.
- [179] J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 4673.
- [180] W. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657.
- [181] N. Guex, M. C. Peitsch, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714.
- [182] A. Sali, T. L. Blundell, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779.
- [183] P. Koehl, M. Delarue, *J. Mol. Biol.* **1994**, *239*, 249.
- [184] D. S. Goodsell, G. M. Morris, A. J. Olson, *J Mol Recognit* **1996**, *9*, 1.
- [185] L. A. Kelley, S. P. Gardner, M. J. Sutcliffe, *Protein Eng* **1996**, *9*, 1063.