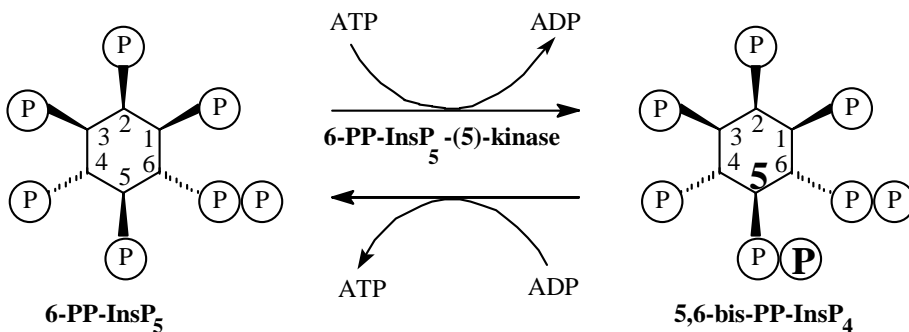


10.3.12 Biochemie und Analytische Chemie der Bergischen Universität - Gesamthochschule Wuppertal: Konformationsanalyse von Diphosphoinositolphosphaten

Vor ca. 10 Jahren wurde eine neue Klasse von „energiereichen“ Verbindungen in *Dictyosteliden* entdeckt. Diese Diphosphoinositolphosphate (PP-InsPs) besitzen Pyrophosphatgruppen neben Monophosphatgruppen. Allein aufgrund ihrer Strukturelemente sind sie sehr interessante Moleküle, die in dieser Form recht selten vorkommen und noch nicht theoretisch berechnet wurden. Offensichtlich sind diese Verbindungen ubiquitär in der Natur verbreitet. Es sind ungewöhnliche Moleküle mit einem hohen Phosphatgruppenübertragungspotential ähnlich dem von ATP. Physiologische Funktionen der PP-InsPs sind bislang nicht bekannt. Diskutiert wird eine Beteiligung bei der Kontrolle des Vesikeltransports und der Endocytose.

Die strukturelle Aufklärung durch 2D-NMR-Spektroskopie ist bereits 1996 im Arbeitskreis Biochemie gelungen.

Ein am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligtes Enzym wurde inzwischen aus *Dictyostelium discoideum* angereichert und weitgehend charakterisiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass dieses Enzym die Phosphorylierung von InsP_7 zu InsP_8 sowie die Rückreaktion unter Beteiligung von ATP bzw. ADP katalysiert.



Neben den Diphosphoinositolphosphaten wird auch InsP_6 als Substrat genutzt. Die bisherigen Untersuchungen lieferten kinetische Daten, aus denen sich die Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Reaktionen berechnen lassen. Außerdem konnten die Gleichgewichtskonstanten experimentell bestimmt werden. Daraus lassen sich die freien Energien der Reaktionen und damit das Phosphatgruppenübertragungspotential der unterschiedlichen Moleküle ermitteln. Um diese Daten zu verifizieren ist es sehr interessant, die absoluten Konformationen und Energien der Moleküle InsP_6 , InsP_7 und InsP_8 zu berechnen und diese theoretischen Werte dann mit den experimentellen Daten zu vergleichen.

Die absoluten Konformationen könnten einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Substratspezifitäten des Enzyms liefern. Desweiteren kann man aufgrund der dreidimensionalen Strukturen der Substrate Rückschlüsse auf das aktive Zentrum des Enzyms ziehen, indem die Veränderungen der Strukturen und gemeinsame Strukturmerkmale berücksichtigt werden. Da sich das Enzym nur in sehr geringen Mengen aus dem untersuchten Organismus gewinnen läßt, ist der Weg über eine Röntgenstrukturanalyse, die Struktur und den Aufbau der Bindungstasche zu ermitteln, zum jetzigen Zeitpunkt des Projektes nicht möglich.

Zur Strukturberechnung der Inositolphosphate wurden zu Beginn molekular-mechanische Unter-

suchungen von InsP_6 durchgeführt. Als Startgeometrie wurden die von Cyclohexan bekannten und energetisch günstigen Sessel-Konformationen gewählt. Die bei molekular-mechanischen Berechnungen oft für Proteine und Nucleinsäuren verwendete AMBER-Methode bestätigte die gewählten Strukturen.

Mit der in GAUSSIAN98 integrierten Standard-Dichtefunktionaltheorie B3LYP/6-31+G(d,p) wurde eine Optimierung dieser Strukturen angestrebt. Hierbei wurde der Basissatz stufenweise von 3-21G zu 6-31+G(d,p) geändert. Die Berechnungen der Inositolphosphate InsP_6 , InsP_7 und InsP_8 mit B3LYP/6-31+G(d,p) waren zum Zeitpunkt dieses Berichtes noch nicht für alle Moleküle abgeschlossen. In Abb.1 sind aus diesem Grund die berechneten B3LYP/6-31G(d,p)-Geometrien dargestellt.

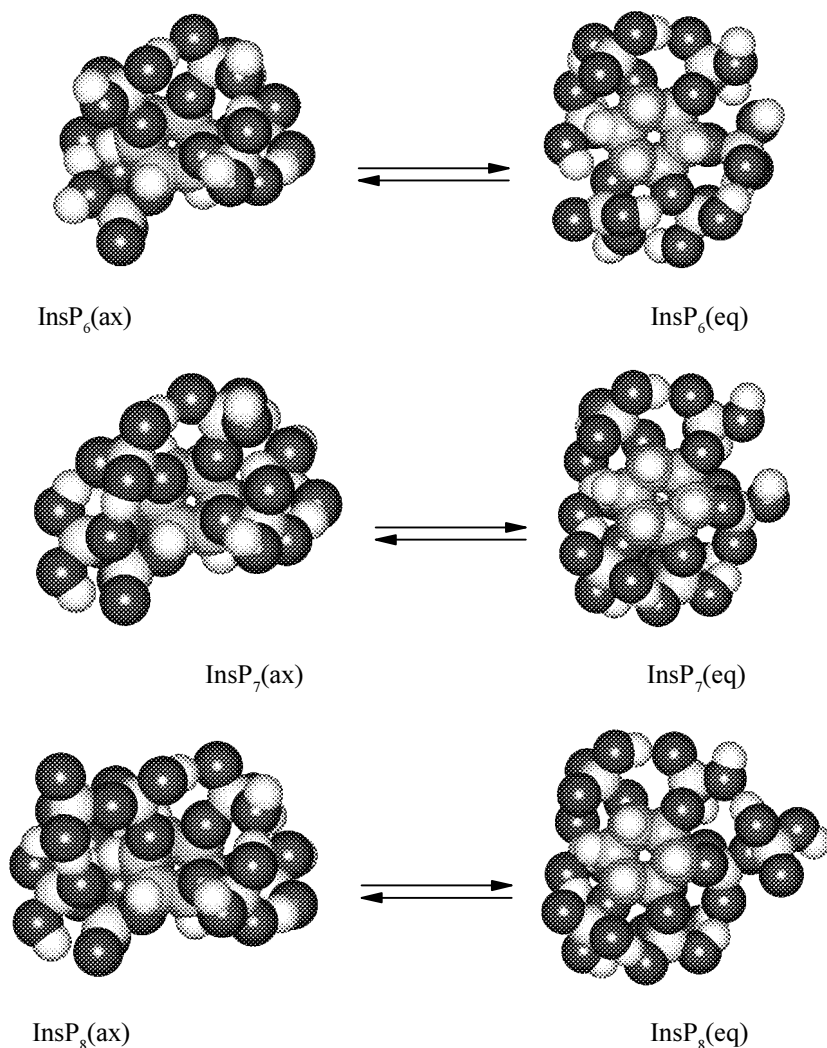
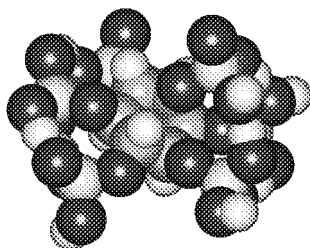


Abb. 1: Berechnete Strukturen der Sesselkonformere von InsP_6 , InsP_7 und InsP_8 mit B3LYP/6-31G(d,p).

Die Betrachtung der elektronischen Energiedifferenzen ΔE_{elec} zwischen den axialen (ax) und äquatorialen (eq) Konformeren sowie eine thermodynamische Analyse der InsP_6 -Konformere mit B3LYP/6-311G verstärkte die Vermutung, dass das Gleichgewicht zwischen ax \leftrightarrow eq vollständig auf der Seite der äquatorialen Konformeren liegt. Weiterhin sind die räumliche Anordnung der Phosphatgruppen um den jeweiligen Kohlenstoffring und die zahlreichen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen auffallend. Der Kohlenstoffring der äquatorialen Konformere ist im Gegensatz zur axialen Konformation nur einseitig durch die Phosphatgruppen abgeschirmt.

Bei einer nachträglichen Untersuchung der beiden Sessel- InsP_6 -Konformere mit der semi-empirischen AM1-Methode konnte eine zusätzliche Twist-Konformation $\text{InsP}_6(\text{tw}_{ax})$ (Abb. 2) ausgehend von $\text{InsP}_6(\text{ax})$ ermittelt werden.



$\text{InsP}_6(\text{tw}_{ax})$

Abb. 2: Berechnete Struktur der Twist-Konformation von $\text{InsP}_6(\text{tw}_{ax})$ mit B3LYP/3-21G

Diese Twist-Konformation wurde anschließend mit B3LYP/3-21G zur Berücksichtigung der Wasserstoffbrückenbindungen optimiert und mit den elektronischen Energien aus der entsprechenden Optimierung von $\text{InsP}_6(\text{ax})$ und $\text{InsP}_6(\text{eq})$ verglichen. Beim Gleichgewicht ax \leftrightarrow tw_{ax} beträgt die elektronische Energiedifferenz $-37,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, bei $\text{tw}_{ax} \leftrightarrow \text{eq}$ $-12,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Im Gegensatz zu der von Cyclohexan abgeleiteten klassischen Vorstellung, wonach die potentiellen Energien von Twist-Konformeren höher liegen als Sessel-Konformere, befindet sich $\text{InsP}_6(\text{ax})$ aufgrund der sterisch anspruchsvollen Phosphat-Gruppen energetisch oberhalb von $\text{InsP}_6(\text{tw}_{ax})$. Dennoch befindet sich das Gleichgewicht von $\text{tw}_{ax} \leftrightarrow \text{eq}$ zu etwa 99,5 % auf der Seite von $\text{InsP}_6(\text{eq})$.

Um eine endgültige Aussage über die Gleichgewichtsenergien der Inositolphosphate InsP_6 , InsP_7 und InsP_8 treffen zu können, müssen zu einem späteren Zeitpunkt thermodynamische Berechnungen der Konformere nach beendeter Optimierung mit B3LYP/6-31+G(d,p) erfolgen. Weiterhin sollen Berechnungen in Wasser zeigen, ob diese mit den in Vakuum berechneten Energien vergleichbar sind.

(Christine Trautwein, E-Mail: trautw@uni-wuppertal.de,

Axel Patrick Ligon, E-Mail: ligon@uni-wuppertal.de,

Lehrstuhl Prof. Dr. Gäb)