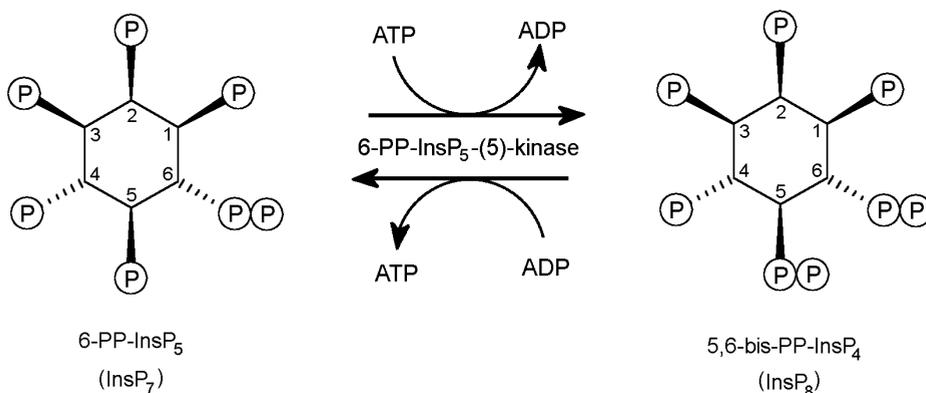


10 Biochemie und Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal:

Konformationsanalyse von Diphosphoinositolphosphaten (Teil II)

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.

Ein am Stoffwechsel der Diphosphoinositolphosphate beteiligtes Enzym wurde inzwischen aus *Dictyostelium discoideum* weitgehend charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, 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.

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.

Wie bereits im Bericht für das Jahr 2000, Seite 267-278, für InsP_6 erläutert, wurden jeweils drei

Konformere für InsP_6 , InsP_7 und InsP_8 gefunden. Neben der axialen (ax) und äquatorialen (eq) Konformation bzw. Hauptanordnung der Phosphat-Gruppen, wurde eine zusätzliche Twist-Konformation (tw_{ax}) ausgehend von der axialen Konformation ermittelt.

Zur Beurteilung der Konformationsgleichgewichte konnten nur die elektronischen Molekülenergien ermittelt werden, da eine thermodynamische Berechnung aufgrund fehlender Rechenkapazität nicht möglich war. In Abb. 1 sind aus diesem Grund nur die elektronischen Energiedifferenzen ΔE_{elec} bezogen auf die jeweilige äquatoriale Konformation, dargestellt.

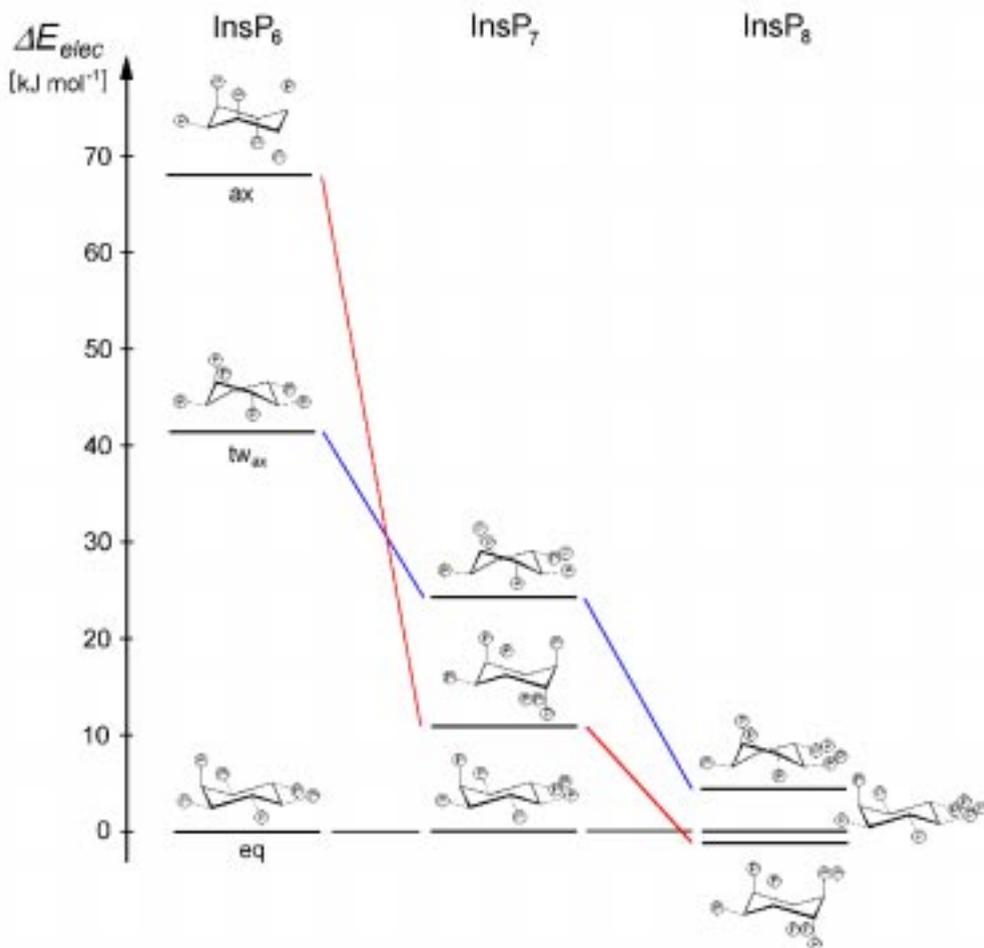


Abb. 1 : Schematische Darstellung der berechneten elektronischen Energiedifferenzen ΔE_{elec} der Inositolphosphat- Konformere InsP_6 , InsP_7 , und InsP_8 bezogen auf die äquatoriale Konformation mit B3LYP/6-31+G(d,p).

Bei der in Abb. 1 gewählten Darstellungsform ist eine Betrachtung der elektronischen Energiedifferenz nur innerhalb eines Inositolphosphates (z.B InsP_6) erlaubt. Ein Vergleich der elektronischen Energien über alle Inositolphosphate einer Konformation ist nicht sinnvoll, da die äquatoriale Konformation als Bezugskonformation gewählt wurde.

Im Gegensatz zu der von Cyclohexan abgeleiteten klassischen Vorstellung, wonach die potentiellen Energien von Twist-Konformeren höher liegen als die von Sessel-Konformeren, befindet sich $\text{InsP}_6(\text{ax})$ aufgrund der sterisch anspruchsvollen Phosphat-Gruppen energetisch oberhalb von $\text{InsP}_6(\text{tw}_{\text{ax}})$. Beim Gleichgewicht $\text{ax} \leftrightarrow \text{tw}_{\text{ax}}$ beträgt die elektronische Energiedifferenz $26,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, bei $\text{tw}_{\text{ax}} \leftrightarrow \text{eq}$ $41,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Das Gleichgewicht befindet sich zu 100 % auf der Seite von $\text{InsP}_6(\text{eq})$ (Abb. 2)

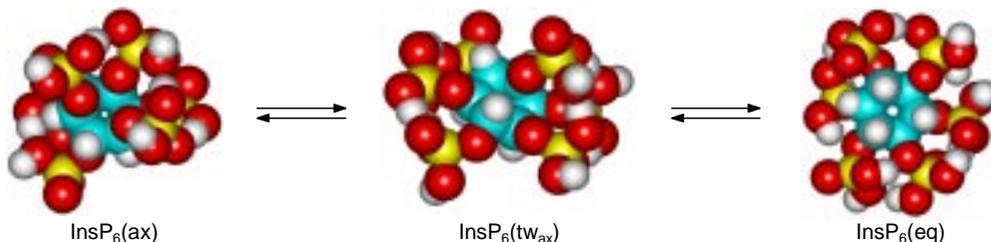


Abb. 2: Berechnete Strukturen der InsP_6 -Konformere ax , tw_{ax} und eq mit $\text{B3LYP}/6\text{-}31\text{+G}(\text{d},\text{p})$.

Ähnliches gilt für InsP_7 . Auch hier befindet sich das Gleichgewicht zu 100 % auf der Seite von $\text{InsP}_7(\text{eq})$. Die axiale Konformation ist hier energetisch günstiger als die Twist-Konformation.

Bei InsP_8 kam es bei den Berechnungen zu einer Überraschung: $\text{InsP}_8(\text{ax})$ ist energetisch günstiger als $\text{InsP}_8(\text{eq})$ (Abb. 3).

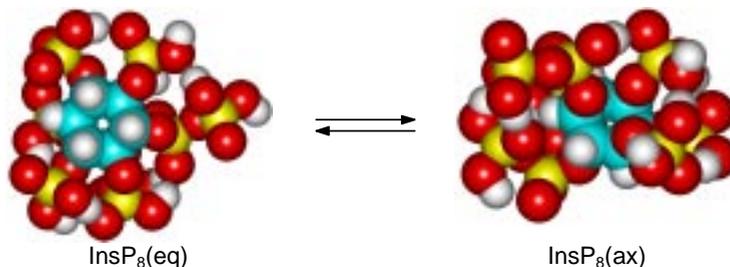


Abb. 3: Berechnete Strukturen der InsP_8 -Konformere eq und ax mit $\text{B3LYP}/6\text{-}31\text{+G}(\text{d},\text{p})$.

Die elektronische Energiedifferenz von $\text{ax} \leftrightarrow \text{eq}$ beträgt hier $-1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Dies entspricht einem Gleichgewicht von $63,6 \%$ $\text{InsP}_8(\text{ax})$ zu $36,4 \%$ $\text{InsP}_8(\text{eq})$.

Für diese Berechnungen war es wichtig, einen anspruchsvollen Basissatz wie den $6\text{-}31\text{+G}(\text{d},\text{p})$ zu wählen, da ein Auftreten von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen berücksichtigt werden musste. Bei der Verwendung des Basissatz $3\text{-}21\text{G}$ (Bericht für das Jahr 2000, Seite 267-278) betrug die elektronische Energiedifferenz des Gleichgewichtes $\text{tw}_{\text{ax}} \leftrightarrow \text{eq}$ nur $12,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, welche um $29,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ kleiner ist als die berechnete Energiedifferenz mittels $6\text{-}31\text{+G}(\text{d},\text{p})$. Dieses Ergebnis ist nicht weiter überraschend, da im Basissatz $3\text{-}21\text{G}$ für die Kernschalen kontrahierte Orbitale aus drei primitiven Orbitalen verwendet werden, für die Valenzschale hingegen ein lokalisierter Satz von kontrahierten Orbitalen aus zwei primitiven Orbitalen und ein delocalisierter Satz von

unkontrahierten Orbitalen. Eine Schwäche dieser split-valence-Basissätze besteht in der Beschreibung einer stark anisotropen Ladungsverteilung. Daher werden in den Polarisations-Basissätzen in der Valenzschale zusätzliche primitive Orbitale mit höherer l-Quantenzahl berücksichtigt. So sind im Basissatz 6-31G+G(d,p) neben sechs d-artigen Orbitalen für alle Atome ab der zweiten Periode zusätzlich drei p-artige Orbitale für die Valenzschale des Wasserstoff-Atoms enthalten.

Zusammenfassend lässt sich aus den Berechnungen schließen, dass mit zunehmender Phosphorylierung der Inositolphosphate die elektronische Energiedifferenz zwischen der axialen und äquatorialen Konformation abnimmt und gegen Null strebt. Ursachen dürften die räumliche Anordnung der Phosphatgruppen um den jeweiligen Kohlenstoffring sowie die zahlreichen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen sein.

Den gewährten Unterstützungen durch das Regionale Rechenzentrum der Universität zu Köln (RRZK) gilt ein besonderer Dank. So war es ohne eine störende Limitierung der CPU-Rechenzeit möglich, größere Berechnungen über 30 Tage hinaus durchzuführen. Bei anderen leistungsstärkeren Servern wie der CRAY J90 am FZ-Jülich oder der Linux-Cluster ALiCE der Universität-Wuppertal wurde diese Unterstützung entweder nicht gewährt oder es mangelte an der benötigten Software oder Rechenzeit.

*(Axel Patrick Ligon, E-Mail: ligon@uni-wuppertal.de;
Christine Trautwein, E-Mail: trautw@uni-wuppertal.de)*