

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	13
1.1	Penicillin – ein Wundermittel gegen Infektionen?	15
1.2	Die Bakterienzellwand	18
1.2.1	Aufbau des Mureins	18
1.2.2	Murein-Biosynthese	20
1.3	Penicillin Recognizing Enzymes	21
1.3.1	Einteilung der PREs	21
1.3.1.1	Penicillin Binding Proteins (PBPs)	21
1.3.1.2	β -Lactamasen	23
1.3.2	Struktur	25
1.3.2.1	Primärstruktur	25
1.3.2.2	Sekundär- und Tertiärstruktur	27
1.3.2.3	Aktives Zentrum von TEM1	29
1.4	β-Lactam-Antibiotika	31
1.4.1	Strukturen und Einteilung	31
1.4.2	Reaktivität gegenüber PBPs	32
1.4.3	Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika	34
1.5	Kinetik	35
1.6	Reaktionsmechanismus der Klasse A β-Lactamasen	36
1.6.1	Acylierung	36
1.6.1.1	Lys73 als <i>General Base</i>	38
1.6.1.2	Glu166 als <i>General Base</i>	40
1.6.1.3	Weitere Mechanismushypothesen	41
1.6.1.4	Protonierung des β -Lactamstickstoffs	42
1.6.2	Deacylierung	43
2	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	45
3	METHODEN	49
3.1	Das CHARMM-Kraftfeld	51
3.1.1	Fixieren und <i>Restrainen</i> von Atomen	51
3.1.2	<i>Cutoff</i> und Dielektrizitätskonstante	52
3.1.3	Energien von Wasserstoffbrücken	52
3.1.4	„Shake“-Algorithmus	52

3.2	Geometrieoptimierungen und Moleküldynamik-Simulationen	53
3.3	Root-Mean-Square-Wert	54
3.4	QM/MM – Kombinierte quantenmechanische/molekularmechnische Methoden	54
3.4.1	Möglichkeiten der QM/MM-Anwendungen	54
3.4.2	Methodik	56
3.4.2.1	Partitionierung des Systems	56
3.4.2.2	Der System-Hamiltonian	58
3.4.2.3	Link-Atome	61
3.5	Energie-Korrekturen von AM1	64
3.6	Modellierung von Reaktionen	65
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Vorgehensweise	71
4.1.1	Auswahl der Klasse A β -Lactamase	71
4.2	Moleküldynamik-Simulationen des aktiven Zentrums	72
4.2.1	RMSD-Wert Analyse	73
4.2.2	Wasserstoffbrücken des aktiven Zentrums	75
4.2.2.1	Ser70-Lys73 (neutral) Wasserstoffbrücke	76
4.2.2.2	Wasserstoffbrücken des katalytischen Wassers (Wat307)	76
4.3	Elektrostatistisches Umfeld von Lys73	78
4.4	Validierung der AM1-Methode für Benzylpenicillin	80
4.4.1	Ringgeometrie	81
4.4.2	sp^2 - Stickstoffgeometrie	83
4.4.3	Korrekturrechnungen der AM1-Energien	84
4.5	Aufbau des QM/MM-Systems	85
4.5.1	Kristallstruktur	86
4.5.2	Rückmutation der E166N-Mutante	86
4.5.3	Wasserstoffatome	87
4.5.4	Optimierung des katalytischen Wassers(Wat290) und der Wasserstoffatome	87
4.5.5	QM-Region	88
4.5.6	Solvatisierung und Formung des Systems	89
4.5.7	Relaxation und Vollminimierung	91
4.6	Michaelis-Menten Komplex	95
4.6.1	Wechselwirkungen: Benzylpenicillin – aktives Zentrum	96
4.6.2	Wechselwirkungen: Aktives Zentrum	98

4.7	Berechnung der Acylierungsreaktion	99
4.7.1	Acylierung 1. Schritt: Bildung des tetrahedralen Zwischenprodukts.....	99
4.7.1.1	Aktivierung von Ser70.....	100
4.7.1.2	Nucleophiler Angriff und Ser70-Deprotonierung.....	105
4.7.1.3	Nucleophiler Angriff, Ser70 Deprotonierung und Protonentransfer zu Glu166.....	109
4.7.2	Acylierung 2. Schritt: Bildung des Ser70-Enzym-Esters.....	114
4.7.2.1	Protonierung des Thiazolidinstickstoffs und Ser130-Reprotonierung.....	115
4.7.2.2	β -Lactamringspaltung und Protonierung des Thiazolidinstickstoffs.....	118
4.7.2.3	β -Lactamringspaltung und Protonenverschiebung von Lys73 über Ser130 zu dem Thiazolidinstickstoff.....	120
4.7.2.4	Protonentransfer von Glu166 zu Lys73.....	126
4.8	Aminosäuren-Dekompositionsanalyse	130
4.8.1	Met69, Ser70, Gly236, Ala237 - <i>Oxyanion Hole</i>	134
4.8.2	Asn132.....	138
4.8.3	Asn170.....	142
4.8.4	Lys234, Ser235, Arg244 und Arg275.....	145
5	DISKUSSION	153
5.1	General Base	155
5.2	Molekularer Reaktionsmechanismus	158
5.3	Einfluss der Proteinumgebung	164
5.4	Vergleich von Ergebnissen	167
5.4.1	Ergebnisse experimenteller Untersuchungen.....	167
5.4.2	Ergebnisse theoretischer Untersuchungen.....	168
6	ZUSAMMENFASSUNG	171
7	LITERATUR	175
8	ANHANG	189