

Strukturbasiertes computergestütztes
Wirkstoffdesign an flexiblen Proteintargets:
Aldose Reduktase und Hsp70

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ulrich Peinz
aus Peine

Würzburg 2016



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am: _____

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Für Ina und meine Eltern

Vorwort

Publikationen

Die vorliegende Dissertation basiert auf computergestützten Untersuchungen, die im Zeitraum von Januar 2008 bis Juni 2011 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christoph A. Sotriffer durchgeführt wurden.

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Posterbeiträgen auf nationalen und internationalen Kongressen präsentiert:

Peinz, U., Sotriffer, C. A.: Considering protein flexibility in computational drug design: Aldose Reductase as test case. International Symposium SFB 630, Würzburg, 2009.

Peinz, U., Sotriffer, C. A.: Targeting HSP70 – Computational analyses and structure-based inhibitor design. 3rd EuCheMS Chemistry Congress, Nürnberg, 2010.

Peinz, U., Sotriffer, C. A.: Targeting HSP70 – Computational analyses and structure-based inhibitor design. GDCh Jungchemiker-Forum Chem-SyStM, Würzburg, 2010.

Danksagung

Während meiner Promotionszeit habe ich von verschiedenen Seiten vielfältige Unterstützung erhalten ohne diese die Erstellung dieser Dissertation so nicht möglich gewesen wäre.

In erster Linie möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christoph A. Sotriffer für seine immerwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragen, für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen sowie für die Gewährung von Freiräumen für die Entwicklung und die Möglichkeit der Umsetzung eigener Projektideen bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich auch ausdrücklich für seine stets freundliche und respektvolle Art bedanken, durch die eine positive Arbeitsatmosphäre geschaffen wurde.

Daneben möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe für die sehr gute und stets angenehme Zusammenarbeit sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken. Herrn Dr. Clemens Grimm bin ich ebenfalls für die spannende Kooperation und gute Zusammenarbeit, für sein Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme der Aufgaben des Drittprüfers im mündlichen Promotionskolloquium dankbar.

Der Klinischen Forschergruppe 216 (KFO 216) danke ich für die sehr gute und kollegiale interdisziplinäre Zusammenarbeit sowie für die finanzielle Unterstützung. Ein besonderer Dank geht in diesem Zusammenhang an Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Dr. Andreas Hartung, an Herrn Prof. Dr. Ralf Bargou und Dr. Mannik Chatterjee sowie ihrer Mitarbeiterin Elisabeth Müller.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe sowie seinen Mitarbeitern Dr. Cornelia Koch und Dr. Andreas Heine danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der experimentellen Untersuchungen an der Zielstruktur Aldose Reduktase.

Darüber hinaus möchte ich mich bedanken bei:

Meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis Sotriffer Dr. Martin Sippel, Dr. Daniel Cappel, Dr. Monika Nocker, Dr. Benjamin Schaefer, Dr. Armin Welker, Dr. Christine Topf, Dr. Constanze Waltenberger, Dr. David Zilian, Dr. Michael Hein, Steffen Wagner und Manuel Krug für das gute Arbeitsklima, viele interessante Diskussionen und die gegenseitige Unterstützung.

Allen Assistenten des 6. Semesters für die gute Zusammenarbeit während der Praktika.

Dr. Bernd Reyer für seine Hilfe bei diversen Computerproblemen.

Dem Sekretariat in Person von Frau Möhler und Frau Ebner für ihre Unterstützung bei der Abwicklung organisatorischer Angelegenheiten.

Der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) für das Reisestipendium zur Teilnahme am 3rd EuCheMS Chemistry Congress in Nürnberg.

Kay für seine Hilfe bei technischen Fragestellungen und weiterführende Diskussionen.

Meinen Eltern für ihre dauerhafte Unterstützung.

Meiner Frau für ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Verständnis und vor allem dafür, dass sie so ist, wie sie ist und mein Leben tagtäglich bereichert.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
I.1	Strukturbasiertes computergestütztes Wirkstoffdesign	1
I.2	Proteinflexibilität.....	3
I.3	Zielsetzungen	9
II	Methoden und Verfahren des computerbasierten Wirkstoffdesigns	11
II.1	Aufklärung dreidimensionaler Proteinstrukturen	11
II.2	Computergestützte Bindetaschenanalyse - Identifizierung von hot spots.....	14
II.3	Virtuelle Datenbanksuche	17
II.3.1	Datenbanksuche anhand von Pharmakophormodellen	17
II.3.2	Ligandbasierte Datenbanksuche mit FeatureTreesXL	19
II.4	Dockingsimulationen und Scoringfunktionen	20
II.4.1	Eigenständige Scoringfunktionen	27
II.5	Molekulardynamik Simulationen.....	28
III	Gezielte Stabilisierung einer neuen MD-generierten Bindetaschenkonformation der Aldose Reduktase	33
III.1	Das Modellsystem Aldose Reduktase.....	33
III.1.1	Klassifizierung	33
III.1.2	Struktureller Aufbau der Aldose Reduktase	33
III.1.3	Katalytischer Mechanismus	35
III.1.4	Physiologische Bedeutung.....	37
III.1.5	Pathophysiologie: Bedeutung der Aldose Reduktase bei der Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen.....	39
III.1.6	Inhibitoren der Aldose Reduktase.....	42
III.1.7	Bindetaschenflexibilität und Bindetaschenformen der Aldose Reduktase.....	44
III.2	Aufgabenstellung	48
III.3	Hintergrundinformationen	49
III.3.1	Charakterisierung der MD-generierten Bindetaschenkonformation.....	52
III.4	Vorgehensweise, Ergebnisse und Diskussion	55
III.4.1	Vergleichende Dockingstudien von AR-Pyridazinon-Inhibitoren.....	55
III.4.2	Computergestützte Identifizierung neuer Inhibitoren der Aldose Reduktase für eine gezielte Stabilisierung einer neuen Bindetaschenkonformation	60

III.4.2.1	Proteinbasierter Ansatz	62
III.4.2.1.1	Vergleichende Strukturanalyse verschiedener AR-Ligand-Komplexe ..	62
III.4.2.1.2	Analyse der Bindetasche hinsichtlich günstiger Interaktionspunkte	66
III.4.2.1.3	Pharmakophorhypothesen und virtuelle Datenbanksuchen	71
III.4.2.2	Ligandbasierter Ansatz	76
III.4.2.2.1	Aufbau einer Pyridazinon-Moleküldatenbank	77
III.4.2.2.2	Ligandbasierte Datenbanksuchen mittels FeatureTreesXL.....	77
III.4.2.3	Zusammenfassung der virtuellen Datenbanksuchen.....	79
III.4.3	Dockingsimulationen der virtuell identifizierten Verbindungen:	
	Untersuchung der Bindemodi und Bindungsaffinitäten	80
III.4.3.1	Re-Scoring der Dockinglösungen mit SFCscore.....	84
III.4.4	Untersuchung der Selektivität durch Cross-Dockingexperimente.....	86
III.4.5	Finale Molekülauswahl.....	89
III.4.6	Experimentelle Bestimmung des Inhibitionspotenzials und	
	Röntgenstrukturanalyse	97
III.4.7	Schlussfolgerung.....	99
IV	Targeting Hsp70 – Design einer neuen Inhibitorklasse	100
IV.1	Hitzeschockprotein 70: Vorstellung der Zielstruktur	100
IV.1.1	Klassifizierung	100
IV.1.2	Struktureller Aufbau von Hsp70	101
IV.1.3	Katalytischer Mechanismus	107
IV.1.4	Physiologische Bedeutung.....	111
IV.1.5	Pathophysiologie: Hsp 70 – ein therapeutisches Target.....	113
IV.1.6	Hsp70-Inhibitoren	117
IV.2	Aufgabenstellung	122
IV.3	Vorgehensweise, Ergebnisse und Diskussion	123
IV.3.1	Computergestützte Suche nach der Hsp70-Bindestelle von Apoptozol	
	mittels Cross-Dockingverfahren	123
IV.3.2	Liganden des Interdomäneninterfaces -	
	Design neuartiger Hsp70-Inhibitoren	138
IV.3.2.1	Identifizierung von Kandidatenmolekülen durch virtuelles Screening	138
IV.3.2.1.1	Proteinbasierter Ansatz.....	138

IV.3.2.1.2	Ligandbasierter Ansatz	146
IV.3.2.1.3	Dockingsimulationen an der Interdomänenkavität	147
IV.3.2.1.4	Re- und Consensus-Scoring.....	147
IV.3.2.1.5	Auswahl der Kandidatenmoleküle für experimentelle Analysen	148
IV.3.2.1.6	Experimentelle Untersuchungen der Kandidatenmoleküle	157
IV.3.2.2	Adressierung des Interdomäneninterfaces mit TMAO-Derivaten	160
IV.3.3	Erweiterung der Substratbindedomäne einer Hsc70-Zweidomänenstruktur	
	mit Hilfe eines Homologiemodelansatzes.....	167
IV.3.4	Molekulardynamische Untersuchungen von Hsp70	172
IV.3.4.1	Rationale und Zielsetzung	172
IV.3.4.2	Durchführung der Molekulardynamik Simulationen	173
IV.3.4.3	Ergebnisse und Diskussion	175
IV.3.4.3.1	Molekulardynamik Simulation von Hsc70.....	175
IV.3.4.3.2	Molekulardynamik Simulation von HM-Hsc70.....	185
IV.3.4.3.3	Molekulardynamik Simulation einer Hsc70-Az-Komplexstruktur	192
IV.3.4.4	Zusammenfassung	199
V	Zusammenfassung und Ausblick / Summary and Outlook	201
V.1	Zusammenfassung und Ausblick	201
V.2	Summary and Outlook.....	205
VI	Anhang.....	209
VI.1	Selektivitätsrangliste	209
VI.2	Multisequenzanalyse	212
VI.3	Übersicht über in der PDB publizierte Hsp70-Tertiärstrukturen	215
VI.4	Ergebnisse der computergestützten Suche nach der Hsp70-Bindestelle	
	von Apoptozol mittels Cross-Dockingverfahren.....	217
VI.4.1	Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an der Nukleotid-.....	
	bindetasche von Hsc70.....	217
VI.4.2	Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an der Substrat-.....	
	bindetasche von Hsc70.....	219
VI.4.3	Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an dem Interdomänen-.....	
	interface von Hsc70.....	220

VI.4.4	Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an der Zweidomänen- struktur von Hsc70	221
VI.4.5	Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an einer erweiterten Zweidomänenstruktur von Hsc70	225
VI.5	Affinitätsrangliste auf der Grundlage eines Consensus-Scorings	229
VI.6	Ergebnisse der RMSD-Wert Analysen der MD Simulationen	231
VI.6.1	Molekulardynamik Simulation von Hsc70	231
VI.6.2	Molekulardynamik Simulation von HM-Hsc70	232
VI.6.3	Molekulardynamik Simulation einer Hsc70-Az-Komplexstruktur	233
VI.7	Abkürzungsverzeichnis.....	234
VII	Literaturverzeichnis.....	238

I Einleitung

I.1 Strukturbasiertes computergestütztes Wirkstoffdesign

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung verschiedenster Krankheiten und die kontinuierliche Verbesserung bekannter Arzneistoffe sind die zentralen Aufgaben der pharmazeutischen Forschung. Ein von Pharmaunternehmen routinemäßig angewendetes Verfahren bei der Suche nach neuen, biologisch aktiven Verbindungen, sogenannten *hits*, gegenüber therapeutisch relevanten makromolekularen Zielstrukturen (Targets) zur Identifizierung von neuen Leitstrukturen ist das *High Throughput Screening* (HTS).¹ Das HTS besteht in der automatisierten Analyse von Substanzen umfangreicher Molekülbibliotheken bezüglich ihrer pharmakologischen Aktivität gegenüber therapeutisch interessanten Targets mittels biochemischer *in vitro* Assays. Erfüllen die biologisch aktiven Verbindungen bestimmte Voraussetzungen (u.a. *in vivo* Aktivität, Abwesenheit chemisch reaktiver Gruppen, keine Anzeichen für Toxizität, Patentierbarkeit), eignen sie sich als Leitstrukturen. Aus Leitstrukturen können durch chemische Modifizierungen für eine gezielte Optimierung der Affinität und Selektivität gegenüber einem Zielprotein sowie für eine Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften, wie Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik, schließlich Wirkstoffe entstehen. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen in äußerst geringen Erfolgsquoten, einem hohen Kosten- und Zeitaufwand sowie der Limitierung auf vorab synthetisierte Verbindungen.

Eine in den letzten Jahrzehnten an Bedeutung gewonnene Alternative und Ergänzung zum HTS für die Identifizierung und Entwicklung neuer Arzneistoffe stellt das strukturbasierte computergestützte Wirkstoffdesign in Form des virtuellen Screenings (VS) dar.^{2,3} Das VS ist ein Verfahren, bei dem große Moleküldatenbanken computergestützt nach geeigneten niedermolekularen Liganden für therapeutische Targets durchsucht werden. Allerdings bezieht sich der Begriff in der Regel nicht ausschließlich auf die reine Datenbanksuche, sondern umfasst generell alle angewandten computerbasierten Analysemethoden bis hin zur abschließenden Molekülauswahl.

Basierend auf den verfügbaren Daten und in Abhängigkeit vom jeweiligen Wissensstand können verschiedene Strategien gewählt werden. Grundsätzlich wird zwischen protein- und ligandbasierten Ansätzen unterschieden, je nachdem welche strukturellen Informationen (dreidimensionale Proteinstrukturen oder Strukturen biologisch aktiver Liganden) dem VS zugrunde liegen. Existieren bereits aufgeklärte Proteinstrukturen eines Targets, für das keine aktiven Liganden bekannt sind, so erfolgt ein *de novo*-Design, die Entwicklung neuer

Wirkstoffe ohne signifikante Ähnlichkeiten zu bereits existierenden Leitstrukturen. Dabei werden die gesuchten Liganden entweder Schritt für Schritt in der Bindetasche eines Rezeptors aufgebaut (*Building*) oder es werden zunächst mehrere Molekülfragmente innerhalb der Bindetasche unabhängig voneinander platziert und anschließend miteinander verknüpft (*Linking*).⁴ Damit sowohl eine starke, als auch selektive Bindung resultiert, ist eine weitgehende strukturelle und chemische Komplementarität zwischen Liganden und Zielprotein erforderlich. Fehlen dreidimensionale Strukturen des Zielproteins, ist es dennoch möglich, ein proteinbasiertes VS durchzuführen, wenn aufgeklärte Strukturen homologer Proteine mit vorzugsweise hoher Sequenzidentität verfügbar sind. Auf deren Grundlage können dann die Proteinstrukturen des zu adressierenden Targets mit bestimmten Computerprogrammen als Homologiemodelle konstruiert werden.

Existieren anstelle von aufgeklärten Proteinstrukturen bereits aktive Liganden für ein pharmakologisches Target, sind häufig ligandbasierte virtuelle Ähnlichkeitssuchen und Versuche, mit Hilfe von Ligandenserien Struktur-Wirkungsbeziehungen (*Structure-Activity Relationships*) abzuleiten, das Mittel der Wahl. Im Idealfall existieren bereits Strukturen entsprechender Protein-Ligand-Komplexe, die als Ausgangspunkte für eine rationale, strukturbasierte Arzneistoffentwicklung verwendet werden können. Diese Gegebenheit erleichtert die Suche nach neuen Liganden erheblich, da hierbei neben den einseitigen strukturellen Informationen der Bindetasche oder eines Liganden zusätzliche Hinweise über ausgebildete Wechselwirkungen sowie über beteiligte Aminosäuren erlangt werden können. Neben den Templatstrukturen an sich, sind darüber hinaus für ein erfolgreiches Screening auch alle weiteren verfügbaren Informationen für ein besseres Verständnis des jeweiligen Proteins von Interesse und können gezielt bei der Suche nach neuen Leitstrukturen einbezogen werden. Eine wichtige Methode für die Entwicklung neuer Liganden durch *de novo*-Designstudien, als auch bei der Optimierung bekannter Wirkstoffe, stellt die Identifizierung günstiger Wechselwirkungsbereiche innerhalb der zu adressierenden Rezeptorbindetasche dar, die mit Hilfe spezieller Computerprogramme berechnet werden können. Anhand derartiger Informationen lassen sich bestimmte Richtlinien bezüglich der chemischen Konstitution potenzieller Leitstrukturen ableiten, die als Suchanfragen, z.B. in Form von Pharmakophormodellen, für virtuelle Datenbanksuchen genutzt werden können. Im Anschluss an die Identifizierung potenziell geeigneter Liganden erfolgen im Rahmen des VS häufig Untersuchungen vermeintlicher Bindeposen und Bindungsaffinitäten der Kandidatenmoleküle am jeweiligen Zielprotein durch Dockingsimulationen. Weiterhin ist für den Erfolg eines virtuellen Screeningverfahrens eine valide Vorhersage der zu erwartenden Bindungsaffinitäten maßgeblich entscheidend. Um die Vorhersagekraft hinsichtlich der

berechneten Affinität zu erhöhen, kann die Durchführung eines *Consensus-Scorings*, der Anwendung verschiedener Bewertungsfunktionen, möglicherweise von Vorteil sein.

Nach der Auswahl der vielversprechendsten Kandidatenmoleküle erfolgt die Synthese oder Bestellung der *in silico* identifizierten Verbindungen bei kommerziellen Anbietern für die abschließende experimentelle Bestimmung der tatsächlichen pharmakologischen Aktivität mittels *in vitro* bzw. *in vivo* Assays, die in der Regel den Abschluss eines VS bildet. Die resultierenden Erkenntnisse der experimentellen Analysen, idealerweise einhergehend mit der Strukturaufklärung entsprechender Protein-Ligand-Komplexstrukturen, können einerseits zur Verbesserung der erstellten Computermodelle und andererseits als Startpunkte für nachfolgende Screeningzyklen dienen.

Zahlreiche Beispiele der letzten Jahre über die erfolgreiche Anwendung virtueller Screeningverfahren zur Identifizierung neuer Proteinliganden bestätigten zweifelsfrei die Eignung sowie die vielversprechenden Möglichkeiten dieser Wirkstoffdesignstrategie.⁵ Aufgrund der unverzichtbaren abschließenden experimentellen Überprüfung der durch Computermethoden berechneten Bindungsaffinitäten von ausgewählten Verbindungen, ist das VS kein alleiniger Ersatz für ein HTS. Vielmehr rückt seit einigen Jahren die komplementäre Verwendung beider Strategien zunehmend in den Vordergrund, um resultierende Synergien für eine Zeitersparnis und Kostensenkung zu nutzen. So ist ein Einsatz des VS z.B. für die Vorauswahl leitstrukturähnlicher (*leadlike*)⁶ bzw. wirkstoffähnlicher (*druglike*)^{7,8} Moleküle, Abschätzung der Bioverfügbarkeit⁹, sowie für die gezielte Zusammenstellung targetspezifischer Molekülbibliotheken mit Hilfe computerbasierter Methoden sinnvoll.¹⁰

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden virtuelle Screeningverfahren zur Identifizierung neuer Inhibitoren der Enzyme Aldose Reduktase und Hitzeschockprotein 70 durchgeführt. Ein Überblick über das dabei verwendete Methodenspektrum des computergestützten Wirkstoffdesigns erfolgt in Kapitel II.

I.2 Proteinflexibilität

Theorien zur Proteinflexibilität

Das strukturbasierte computergestützte Wirkstoffdesign beschäftigt sich mit der Identifizierung und Entwicklung niedermolekularer Verbindungen, die die Funktionen biologischer Zielstrukturen (Targets) gezielt beeinflussen. Bei diesen Targets handelt es sich überwiegend um Proteine, die bei bestimmten pathophysiologischen Vorgängen eine zentrale Rolle spielen. Die mit Abstand größte Targetklasse derzeit auf dem Markt befindlicher Wirkstoffe repräsentieren Enzyme, die als Biokatalysatoren fungieren und die

Geschwindigkeiten biochemischer Reaktionen durch Absenkung der freien Aktivierungsenthalpie erhöhen.¹¹

Damit die im Rahmen von Wirkstoffdesignstudien entwickelten Moleküle ihre pharmakologische Wirkung ausüben können, müssen sie zuvor in geeigneter Weise an die entsprechenden Rezeptoren binden. Somit ist es bei der Liganden- bzw. Wirkstoffentwicklung von entscheidender Bedeutung, dass sämtliche verfügbare Informationen über das jeweilige Proteinverhalten bei der Bindung eines Liganden, wie z.B. der jeweilige Bindungsmechanismus und strukturelle Veränderungen, berücksichtigt werden. Entgegen den ersten Hypothesen, haben mittlerweile zahlreiche experimentelle Untersuchungen deutlich zeigen können, dass es sich bei Proteinen um dynamische Systeme handelt, deren strukturelle Flexibilität essenziell für die Ausübung der biologischen Funktionen ist. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnten in der Vergangenheit Vergleiche zwischen nativen, ungebundenen Proteinstrukturen und Protein-Ligand-Komplexstrukturen durchgeführt werden, die übereinstimmend zeigten, dass Proteine während der Bindung von Liganden bestimmten Umstrukturierungen verschiedener Intensivität unterliegen. Diese können einerseits nur geringe strukturelle Veränderungen, die lediglich die Aminosäuren der Bindestelle betreffen, sein, andererseits aber auch Umlagerungen ganzer Proteindomänen umfassen.^{12,13} Weiterhin konnten Eisenmesser *et al.*¹⁴ mittels NMR-spektroskopischen Untersuchungen belegen, dass bestimmte, für den katalytischen Mechanismus notwendige, Proteinbewegungen auch bereits im ungebundenen Zustand auftreten und somit zu den intrinsischen Eigenschaften eines Enzyms zählen.

Für die Beschreibung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen sowie morphologischen Veränderungen im Rahmen der Ligandenbindung wurden über die Jahre verschiedene Hypothesen postuliert. Eine der ersten Theorien stammte von Emil Fischer aus dem Jahr 1894, wonach das Protein und der Ligand wie Schloss und Schlüssel zueinander passen müssen, um gegenseitig intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden zu können (Schlüssel-Schloss-Prinzip).¹⁵ Durch Linus Pauling wurde diese Theorie später (1946) auf den aktivierten Komplex, den Übergangszustand, übertragen.¹⁶ Zu dieser Zeit wurden Proteine demnach als rigide Strukturen betrachtet, die es jedoch keinesfalls sind, wie oben bereits erläutert wurde.

Folgerichtig wurde der Modellvorstellung des rigiden Makromoleküls 1958 durch die von Koshland postulierte Hypothese der induzierten Anpassung (*induced fit*) widersprochen, wonach das Protein bei der Bindung eines Liganden in Folge gegenseitiger Wechselwirkungen bestimmten Konformationsänderungen unterliegt.¹⁷ Die *induced fit* Hypothese deckt sich einerseits mit kristallographischen und NMR-spektroskopischen Beobachtungen, andererseits konnten jedoch damit längst nicht alle beobachteten Bindungsphänomene

erklärt werden. Aus diesem Grund entspricht auch diese Theorie allein nicht mehr dem heutigen Stand der Wissenschaft.

Im Gegensatz zu diesen früheren Modellvorstellungen, werden heute Proteine nicht mehr als rigide Strukturen betrachtet, die sich nur in Folge intermolekularer Wechselwirkungen, wie z.B. bei der Bindung eines Liganden, strukturell verändern. Es hat sich vielmehr die Theorie durchgesetzt, dass die meisten Proteine komplexe Energiehyperflächen besitzen, die durch das Auftreten zahlreicher Konformere verschiedener Energiezustände charakterisiert sind. Folglich wird auch der energetisch günstigste Zustand, das globale Minimum, eines Proteins anstatt durch eine einzige Proteinkonformation vielmehr durch ein Ensemble morphologisch ähnlicher und energetisch nahezu entarteter Konformationen repräsentiert. Aus dieser Vielfalt co-existierender Konformationen selektieren die Liganden die für ihre Bindung jeweils günstigste Proteinstruktur, die somit durch einen Liganden stabilisiert wird, wodurch das Gleichgewicht in Richtung dieser ausgewählten Konformation verschoben wird.^{18,19} Darüber hinaus kann es nach der Bindung des Liganden in Folge der Optimierung intermolekularer Wechselwirkungen zu einigen moderaten strukturellen Anpassungen im Bereich der Bindetasche kommen.

Weiterhin lässt sich zwischen günstigen Konformationen des freien, nativen Proteins und der günstigsten Konformation eines Proteins im komplexierten Zustand, im Verbund mit gebundenem Ligand, unterscheiden. Die durch einen Liganden adressierte Proteinkonformation muss dabei nicht zwangsläufig dem energetisch günstigsten Zustand des nativen Proteins entsprechen, da die durch intermolekulare Wechselwirkungen resultierende freie Bindungsenergie zur Überwindung von Energiebarrieren und zur Stabilisierung energetisch ungünstigerer Konformationen genutzt werden kann. Der für derartige Konformationsänderungen benötigte Energieverbrauch geht allerdings mit einem Affinitätsverlust einher, weshalb Liganden, um eine optimale biologische Aktivität ausüben zu können, idealerweise mit möglichst hoher intrinsischer Affinität energetisch günstige Proteinkonformationen adressieren sollten.

Die beschriebenen Theorien sollten jedoch nicht separat voneinander betrachtet werden, da es aufgrund der Komplexität und Diversität von Protein-Ligand-Bindungsvorgängen aus heutiger Sicht generell äußerst schwierig erscheint, eine allgemeingültige Theorie für alle beobachtbaren Bindungseffekte aufstellen zu können. Vielmehr scheint für die Interpretation einer Vielzahl untersuchter Bindungsmechanismen die Anwendung einer Kombination aus den beiden letztgenannten Theorien plausibel zu sein.²⁰

Ob es jedoch in Zukunft möglich sein wird, die Manigfaltigkeit der auftretenden Bindungsmechanismen mit einer einzelnen, allgemeingültigen Theorie umfassend beschreiben zu können, scheint derzeit aufgrund der noch vergleichsweise begrenzten Datenlage, der

Komplexität der Bindungsvorgänge sowie der Individualität der unterschiedlichen Proteinklassen, äußerst fragwürdig. Unabdingbar ist jedoch die zukünftige Suche seitens der Grundlagenforschung nach weiterführenden Informationen zu Protein-Ligand-Bindungsvorgängen sowie intrinsischen Proteindynamiken, um die bereits postulierten Theorien durch neue detaillierte Aspekte zu erweitern bzw. um neue Theorien, möglicherweise auch gezielt für einzelne Proteinklassen, zu entwickeln. Zweifelsfrei wären derartige Informationen auch sehr hilfreich für die Entwicklung neuer Liganden und könnten bei entsprechender Berücksichtigung schließlich zu potenteren und spezifischeren Wirkstoffen führen.

Computergestützte Methoden und Verfahren des strukturbasierten Wirkstoffdesigns zur Simulation von Proteinflexibilität

Bis heute ist es üblich und zweckmäßig, der ursprünglichen Praxis zu folgen, die dynamischen biologischen Zielstrukturen von Wirkstoffdesignprojekten als rigide Objekte zu behandeln und sich während der Arzneistoffentwicklung lediglich auf eine einzige Proteinstruktur zu fokussieren. Doch aufgrund der mittlerweile erwiesenen, essenziellen Bedeutung intrinsischer Proteinflexibilität auf die vorhandene Konformationsvielfalt von Proteinen einerseits und auf die Bindung niedermolekularer Liganden andererseits, rückte insbesondere in den letzten Jahren die Entwicklung verschiedenster Methoden und Verfahren zur Berücksichtigung der Proteinflexibilität beim computergestützten Wirkstoffdesign in den Fokus der Forschung. Einen wesentlichen Beitrag an dieser Entwicklung hatte dabei die kontinuierlich zunehmende verfügbare Rechenleistung, die die Ausführung derartiger Programme und ihrer zugrundeliegenden komplexeren Berechnungen und Simulationen erst ermöglichte. Eine der größten Herausforderungen bei der Simulation gewisser Aspekte der Proteinflexibilität besteht aus technischer Sicht in der Handhabung der enormen Anzahl an Freiheitsgraden des Makromoleküls. Deshalb basieren diese Methoden auf bestimmten Annahmen und Simplifikationen, um insgesamt den Rechenaufwand zu begrenzen und dadurch die Programme auch virtuellen Screeningverfahren zugänglich zu machen. Bei dem derzeit verfügbaren Methodenspektrum kann grundsätzlich zwischen Methoden, die ausschließlich lokal begrenzte Proteinflexibilität im Bereich der Bindetaschen simulieren und Verfahren, die globale Proteinbewegungen im gesamten Protein berücksichtigen, unterschieden werden. Im Folgenden werden zunächst drei Ansätze beschrieben, die den Methoden der Simulation lokal begrenzter Proteinflexibilität zuzuordnen sind. Im Anschluss erfolgt die Darstellung etablierter Verfahren, die die Berücksichtigung globaler Proteinflexibilität ermöglichen.

Eine der ersten Methoden, mit der versucht wurde Proteinflexibilität bei Dockingverfahren zu adressieren, repräsentiert das „*Soft docking*“.²¹ Dabei wird das häufig bei kraftfeldbasierten Scoringfunktionen verwendete Lennard-Jones Potenzial, das in der Regel verwendet wird, um näherungsweise van der Waals Kräfte zu beschreiben und dazu führt, dass selbst aus geringen atomaren Kontakten enorme energetische Strafen resultieren, durch eine andere Funktion ersetzt. Diese Funktionen tolerieren in gewisser Weise geringfügige interatomare Überlappungen, als ob es den Proteinatomen möglich wäre, sich während der Docking-simulationen bei der Bindung des Liganden flexibel zu verhalten und sich entsprechend zu distanzieren.

Eine weiterführende Methode zur direkten Simulation flexibler Seitenketten bzw. Proteinatome bei Dockingsimulationen bietet die Verwendung von Rotamerbibliotheken²²⁻²⁴, wobei zunächst die rotierbaren Bindungen der Aminosäuren der Bindetasche identifiziert werden, gefolgt von der Generierung verschiedener Rotamere und Speicherung der unterschiedlichen Konformationen in Form von Bibliotheken. Aufgrund dieser Methodik bietet diese Variante die Möglichkeit der simultanen Untersuchung der für die Bindung eines Liganden vermeintlich günstigsten Konformationen der Aminosäuren einer Bindetasche. Unterschiede zwischen den verfügbaren Programmen, die diese Methode verwenden, bestehen vor allem hinsichtlich des Flexibilitätsgrads, der von dem jeweiligen Programm bei der Erzeugung der Rotamere berücksichtigt wird. Dabei reicht das Spektrum von simplen Rotameren mit lediglich verschiedenen Konformationen der H-Brückendonoren bis hin zu Rotameren, die durch vollständige Rotationen sämtlicher rotierbarer Bindungen erstellt worden sind.

Weiterhin werden auch Energieoptimierungsverfahren^{25,26} verwendet, die im Gegensatz zu separaten, vorab berechneten Seitenkettenkonformeren das gesamte Spektrum potenzieller Proteindynamiken berücksichtigen und dabei neben den Bewegungen der Aminosäuren-seitenketten auch Umlagerungen des Proteinrückgrats simulieren können. Bei diesem Verfahren führen nach dem eigentlichen Dockingprozess geometrische Relaxationsvorgänge zur Optimierung der Position des Liganden sowie der umgebenden Proteinatome der Bindetasche. Derartige lokale Energieminimierungsprozesse werden dabei verwendet, um die resultierenden Proteinanpassungen im Rahmen eines *induced fit* Effektes zu simulieren. Neben bestimmten Energieoptimierungsverfahren werden häufig auch Molekulardynamik Simulationen zur nachträglichen Verbesserung von durch Dockingverfahren erzeugten Bindeposen angewendet.²⁷

Im Gegensatz zu den Methoden, die Proteinflexibilität ausschließlich innerhalb einer bestimmten Region berücksichtigen, wurden auch einige Methoden entwickelt, die die

Berücksichtigung globaler Rezeptorflexibilität ermöglichen und die vorhandenen Limitierungen der lokalen Methoden überwinden. In der Regel basieren derartige Verfahren, anstatt auf einer einzelnen Proteinkonformation, auf mehreren Strukturen, die unterschiedliche Konformationen des Targets repräsentieren. Diese können einerseits experimentellen Ursprungs und mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie bestimmt und andererseits computerbasiert durch Molekulardynamik oder Monte Carlo Simulationen berechnet worden sein.^{28,29} Die zusätzliche Nutzung computergenerierter Proteinstrukturen neben oder anstelle von experimentell bestimmten Strukturen hat sich aus mehreren Gründen in den vergangenen Jahren etabliert, unter anderem weil es mit diesen hypothetischen Strukturen möglich ist, das breite Spektrum potenziell existierender Proteinkonformationen zu analysieren. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte Rezeptormodelle, die für die Entwicklung neuer Leitstrukturen hilfreich sein können, zu nutzen.

Für die Generierung der verschiedenen Proteinkonformationen werden zudem nicht ausschließlich entweder experimentelle oder computergestützte Methoden angewandt, sondern es wurden bereits auch Hybridmethoden entwickelt, die aus Proteinstrukturen experimenteller Herkunft computerbasiert neue Konformationen erzeugen, wie beispielsweise *FlexE*³⁰ (zum Zeitpunkt der Arbeit *FlexX-Ensemble*). Die zugrundeliegende Methode beruht auf einem Algorithmus, der mehrere experimentelle Strukturen miteinander vergleicht, um dabei zwischen konstanten und variablen Regionen zu unterscheiden. Die starren Segmente werden im Weiteren als rigide betrachtet und zu einer Struktur gemittelt, während Proteinbereiche, in denen Abweichungen detektiert worden sind, hingegen als flexibel berücksichtigt werden. Für die Generierung neuer Proteinkonformationen werden schließlich die flexiblen Regionen der verschiedenen experimentell aufgeklärten Strukturen miteinander variiert und jeweils mit der gemittelten Struktur der konstanten Segmente zu neuen Strukturen kombiniert.

Für die Integration globaler Proteinflexibilität bei Dockingsimulationen existieren verschiedene Protokolle. Eine weitverbreitete Strategie repräsentiert das „*Ensemble Docking*“³¹, wobei die Liganden, anstatt in eine einzelne, in ein Ensemble verschiedener Rezeptorstrukturen mit unterschiedlichen Konformationen eingepasst werden. Eine der ersten Methoden mit einer derartigen Berücksichtigung der Proteinflexibilität bei Dockingverfahren lieferte die „*Relaxed Complex Method*“^{32,33}. Um den durch die Adressierung mehrerer Strukturen resultierenden erhöhten Rechen- und Zeitaufwand zu reduzieren, besteht die Möglichkeit, anstatt die Liganden nacheinander in die verschiedenen Rezeptorkonformationen einzupassen, die ausgewählten Konformationen vorab zu einer gemittelten Proteinstruktur zusammenzufassen.³⁴

Eine weitere Methode, um die Bindung von Liganden auf der Grundlage multipler Targetstrukturen vorherzusagen, basiert auf Pharmakophormodellen und wird als „*Dynamic pharmacophore*“ bezeichnet.³⁵ Bei diesem Ansatz werden die Bindetaschen unterschiedlicher Proteinkonformationen hinsichtlich der jeweiligen potenziellen Wechselwirkungsstellen (z.B. Wasserstoffbrückendonoren bzw. –akzeptoren, aliphatische und aromatische Kontaktgruppen) analysiert und charakterisiert. Aus den erhaltenen Informationen wird ein Konsenspharmakophormodell erzeugt, mit dessen Hilfe schließlich Moleküldatenbanken nach Verbindungen mit komplementären Funktionalitäten durchsucht werden können.

Trotz des vergleichsweise kurzen Zeitraumes der Entwicklung computerbasierter Methoden und Strategien zur Berücksichtigung der Proteinflexibilität beim strukturbasierten Wirkstoffdesign steht heute schon ein bemerkenswertes Spektrum verschiedener Verfahren zur Verfügung. Durch die fortschreitende Erforschung der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen und intrinsischen Proteindynamiken von Protein-Ligandenbindungsvorgängen bei pharmakologischen Zielstrukturen, zusammen mit der rasanten Entwicklung immer leistungstärkerer Computer, wird es sicherlich schon in naher Zukunft möglich sein, immer komplexere Methoden zur Simulation von Proteinflexibilität bei der Entwicklung neuer Liganden zu nutzen und somit vermutlich auch die Trefferquoten virtueller Screeningverfahren zu steigern. Möglicherweise wird es sogar irgendwann realisierbar sein, nahezu alle relevanten Aspekte von Protein-Ligand-Interaktionen realitätsgetreu und umfassend mit Hilfe innovativer Programme routinemäßig vorherzusagen und in Wirkstoffdesignstudien zu integrieren.

I.3 Zielsetzungen

Obwohl die letzten Jahre zu enormen Fortschritten in Bezug auf computerbasierte Methoden zur Berücksichtigung bestimmter Proteinflexibilitätsaspekte beim strukturbasierten Wirkstoffdesign führten, stellt die Frage, wie hochflexible pharmakologische Zielstrukturen bei der Wirkstoffentwicklung effektiv adressiert werden können, die Wissenschaft noch immer vor große Schwierigkeiten. Daher bestand die primäre Zielsetzung der vorliegenden Dissertation in der computergestützten Identifizierung neuer Liganden mit inhibitorischer Aktivität gegenüber zwei Enzymen, die eine ausgeprägte intrinsische Proteinflexibilität besitzen und die bei verschiedenen Krankheiten eine pathophysiologische Rolle spielen. Von übergeordnetem Interesse war dabei die Entwicklung von Protokollen virtueller Screeningverfahren, bestehend aus einer Kombination verschiedener computerbasierter Methoden

und Verfahren, die es ermöglichen die Flexibilität von Rezeptoren beim strukturbasierten Wirkstoffdesign adäquat zu berücksichtigen.

Bei der biologischen Zielstruktur, die im ersten Teil der vorliegenden Arbeit adressiert wurde, handelte es sich um das Enzym Aldose Reduktase (AR), das im Zusammenhang mit der Entstehung von Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus steht. Allerdings hatte diese Studie weniger eine pharmakologische Bedeutung, sondern war vorwiegend aus methodischen Gesichtspunkten von Interesse, da die wesentliche Zielsetzung darin bestand, Liganden für eine vermeintlich neue, computergenerierte Proteinkonformation zu identifizieren, die bisher experimentell noch nicht beobachtet werden konnte. In diesem Zusammenhang diente dieser Teil der Arbeit auch dazu, die Aussagekraft computergenerierter Proteinkonformationen sowie die Eignung der weitverbreiteten Methodik, virtuell erzeugte Proteinstrukturen als Template für strukturbasiertes Wirkstoffdesign zu verwenden, zu beurteilen. Darüber hinaus war die Arbeit aufgrund einer möglichen Erweiterung des bekannten Konformationsraumes der AR auch aus strukturbiochemischer Sicht von besonderem Interesse.

Im zweiten Teil der Dissertation geht es um die Identifizierung und Entwicklung von neuen Inhibitoren von biologischen Zielstrukturen, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben, den Mitgliedern der Hitzeschockprotein 70-Familie (Hsp70). Diesen Enzymen wird eine pathologische Relevanz bei einigen Krebserkrankungen sowie diversen weiteren Erkrankungen zugeschrieben. Die in diesem Teil der Dissertation dargestellten Arbeiten an Hsp70 wurden im Rahmen des Teilprojekts „*Design of pharmacological inhibitors of HSF-1/Hsp70 and new anti-cancer drugs from nature for the treatment of multiple myeloma*“ der Klinischen Forschergruppe 216 (*Characterization of the Oncogenic Signaling Network in Multiple Myeloma: Development of Targeted Therapies*) durchgeführt. Deshalb stand hierbei, im Gegensatz zum ersten Teil der Dissertation, vorwiegend die Identifizierung von Liganden mit inhibitorischer Wirkung auf Hsp70 im Vordergrund. Der Fokus richtete sich dabei auf eine Proteinregion, die eine potenzielle Bindetasche ausbildet und einen alternativen Angriffspunkt zur Hemmung der Enzymfunktion repräsentieren könnte. Weiterhin wurde die Arbeit um eine computerbasierte Untersuchung zur Identifizierung der bisher unbekanntenen Bindestelle eines bekannten Hsp70-Liganden ergänzt. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Arbeit an Hsp70 bildete, aufgrund der limitierten strukturbiochemischen Datenlage zu Zweidomänenstrukturen dieser Enzymfamilie, eine detaillierte strukturelle und physiko-chemische Untersuchung der Zielregion, die Simulation und Untersuchung intrinsischer Proteinbewegungen sowie des Konformationsraumes dieser Makromoleküle.

II Methoden und Verfahren des computerbasierten Wirkstoffdesigns

Dieses Kapitel dient der Einführung in die theoretischen Grundlagen der im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendeten Methoden des computergestützten strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Der Fokus liegt dabei insbesondere auf Methoden virtueller Screeningverfahren sowie auf Molekulardynamik Simulationen zur Untersuchung intrinsischer Proteinbewegungen in wässriger Lösung. Hinsichtlich der bearbeiteten Themenstellungen lag ein Schwerpunkt auf einer angemessenen Berücksichtigung der Proteinflexibilität der Zielenzyme, weshalb dieser Aspekt bei den folgenden Ausführungen spezielle Beachtung findet.

II.1 Aufklärung dreidimensionaler Proteinstrukturen

Als Ausgangspunkte für einen proteinbasierten Ansatz im rationalen Wirkstoffdesign dienen dreidimensionale Proteinstrukturen des jeweiligen Targets. Für die Strukturaufklärung der Tertiärstrukturen von Proteinen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, allen voran die Proteinkristallographie, die Bestimmung der räumlichen Anordnung der Atome einer Kristallstruktur durch Beugung bzw. Streuung geeigneter Strahlung am Kristallgitter. Für diese Art der Strukturanalysen wird häufig Röntgenstrahlung verwendet. Als Alternativen stehen Neutronen- oder Synchrotronstrahlung zur Verfügung.^{36,37}

Für die Züchtung der erforderlichen Proteinkristalle macht man sich die Eigenschaft von Proteinen zu Nutze, dass diese unter speziellen Bedingungen im Hinblick auf Salzkonzentration, pH-Wert oder in Gegenwart von Co-Kristallisationsmitteln kristallisieren.⁴ Gelingt es Kristalle ausreichender Größe, Stabilität und Qualität zu züchten, werden diese zur Strukturanalyse beispielsweise mit einem Röntgenstrahl beschossen und die durch Beugung an den Elektronen des Proteinkristalls resultierenden charakteristischen Beugungsbilder mit Hilfe eines automatischen Diffraktometers detektiert. Durch den Einsatz eines mathematischen Verfahrens, der Fouriertransformation, wird aus den Diffraktionsmustern eine dreidimensionale Elektronendichteverteilung ermittelt.³⁸ In die Elektronendichtekarte kann nun die Aminosäuresequenz des Proteins eingepasst werden.³⁹ Durch zahlreiche aufeinanderfolgende Überarbeitungszyklen wird die Proteinstruktur immer wieder verfeinert bis Proteinatome und Elektronendichte eine möglichst hohe Übereinstimmung ergeben.

Bei der Nutzung von Proteinkristallstrukturen für strukturbasierte Wirkstoffdesignprojekte ist es wichtig sich einiger Limitationen bewusst zu sein und bestimmte Aspekte bei der Auswahl von Templatstrukturen zu berücksichtigen.

Ein wesentlicher Nachteil kristallographisch aufgeklärter Proteinstrukturen liegt darin, dass die nach dieser Methode aufgeklärten Proteinstrukturen nicht zwangsläufig den natürlichen, physiologischen Strukturen entsprechen müssen, da die Proteine während der Kristallisation unphysiologischen Bedingungen ausgesetzt und in ein starres Kristallgitter eingebaut sind, wodurch die Flexibilität der Proteine signifikant reduziert oder nahezu vollständig unterbunden wird. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die gewählten Kristallisationsbedingungen einen direkten Einfluss auf die Konformationen der untersuchten Strukturen haben und zu unterschiedlichen Proteinkonformationen führen können.³⁶ Weiterhin kann auch die Ausbildung artifiziieller Kontakte während der Kristallisation (*crystal packing*) erhebliche Auswirkungen auf die Struktur haben.

Vor dem Hintergrund der Berücksichtigung der Proteinflexibilität bei Wirkstoffdesignprojekten liegt ein weiterer wesentlicher Nachteil kristallographisch aufgeklärter Proteinstrukturen darin, dass aufgrund der eingeschränkten Flexibilität der Proteine und in Abhängigkeit von der jeweiligen Auflösung die aufgeklärten Tertiärstrukturen häufig nur eine Momentaufnahme des biologischen Systems in Form einer einzelnen Konformation zeigen. Eine gewisse Ausnahme hierzu stellen hochaufgelöste Kristallstrukturen dar, bei denen prinzipiell die Aufklärung verschiedener Seitenkettenkonformationen möglich ist.⁴⁰ Mit der Höhe der Auflösung nimmt in der Regel auch die Zuverlässigkeit, der bei Kristallstrukturen generell bestehenden Unsicherheiten bezüglich der Lokalisierung und der Identität von Protein- und Ligandatomen der modellierten Strukturen zu.³⁶ Bei der Kristallstrukturanalyse ist es nicht immer möglich alle Atome des untersuchten Systems anhand der Elektronendichte zu lokalisieren, wovon besonders Wasserstoffatome und Solvensmoleküle betroffen sind. Da jedoch die Positionen und Orientierungen der Wasserstoffatome der unmittelbaren Bindestellen als wichtige H-Brückenbindungspartner für Liganden im computergestützten Wirkstoffdesign eine wichtige Rolle spielen, sollten möglichst hochaufgelöste Proteinstrukturen als Templatstrukturen ausgewählt und die modellierten Atompositionen und -orientierungen kritisch überprüft werden. Auch die Protonierungszustände einzelner Aminosäuren des Rezeptors und von Substrukturen der Liganden sollten stets aufgrund des großen Einflusses auf die Ligandenbindung hinterfragt werden. In diesem Zusammenhang sei ebenfalls auf Unsicherheiten bei Tautomeren, wie z.B. bei Histidin und Liganden mit tautomeren Gruppen, hingewiesen.³⁶ In Abhängigkeit vom Auflösungsgrad der experimentellen Daten ist weiterhin zu beachten, dass nicht nur die Modellierung von Wasserstoffatomen eine große Herausforderung darstellt, sondern auch Konformationen und Orientierungen ganzer Aminosäureseitenketten fehlerbehaftet sein können. Ebenfalls können darüber hinaus auch einzelne Proteinabschnitte, wie z.B. flexible Schleifen-segmente, oder sogar ganze Domänen nur geringe oder nicht detektierbare

Elektronendichten liefern.⁴¹ In Bezug auf die Verlässlichkeit der modellierten Atome des Strukturmodells hinsichtlich einer korrekten Lokalisierung sei auf zwei Kenngrößen kristallographisch aufgeklärter Proteinstrukturen verwiesen, den sogenannten B-Faktor, der auch „Temperaturfaktor“ genannt wird, und die Besetzung (engl. *occupancy*) einer Atomposition, die für die einzelnen Atome eines Strukturmodells den publizierten Kristallstrukturdateien entnommen werden können. B-Faktoren werden den Atomen zugewiesen, um die Einflüsse bezüglich statischer und dynamischer Fehlordnung im Kristall zu modellieren und liefern hilfreiche Informationen hinsichtlich der Verlässlichkeit von Segmenten des Strukturmodells.³⁶ Die Besetzung einer Atomposition wird durch eine Zahl zwischen Null und Eins angegeben, die den Besetzungsgrad der Atomposition durch das entsprechende Atom angibt und Hinweise auf alternative Konformationen liefern kann.

Neben Unsicherheiten hinsichtlich der korrekten Lokalisierung von Atomen, kann auch die Identität ganzer Moleküle fehlerbehaftet sein. Probleme bestehen vor allem bei Strukturen, die zueinander isoelektronisch sind. Eine große Herausforderung ist unter anderem die Unterscheidung zwischen Wassermolekülen und Natriumionen über die gemessene Elektronendichte.³⁶ Dieser Aspekt sollte besonders bei Projekten, bei denen Strukturinformationen von Wassermolekülen in Bindestellen von Bedeutung sind, berücksichtigt werden.

Eine alternative Methode zur Strukturbestimmung von Proteinen stellt die NMR-Spektroskopie (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) dar, die als bisher einzige Methode die Strukturbestimmung von Proteinen in Lösung erlaubt, damit mehr den physiologischen Bedingungen entspricht und die Aufklärung realitätsnaher Strukturen ermöglicht. Ein weiterer Unterschied zur Kristallstrukturanalyse besteht darin, dass als Ergebnis nicht eine einzige, sondern, aufgrund der Proteinbewegungen in Lösung, mehrere Strukturen bei derartigen Untersuchungen resultieren. Ein begrenzender Faktor der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie ist das Molekulargewicht, da mit der Größe des Makromoleküls die Breite und Anzahl der detektierbaren Resonanzlinien zunimmt, zu einer Überlappung der Signale führt und dadurch wiederum eine geringe Auflösung resultiert. Allerdings besteht mittlerweile auch die Möglichkeit der Strukturaufklärung großer Proteinkomplexe mit Hilfe der NMR-Spektroskopie durch ein neues 2010 von Simon *et al.*⁴² publiziertes Verfahren.

Abschließend sei an dieser Stelle noch die *Protein Data Bank*⁴³ (PDB) erwähnt, die eine zentrale Bedeutung für die Sammlung und Bereitstellung einer Vielzahl aufgeklärter Proteinstrukturen in Form einer elektronischen Datenbank besitzt. Für die computergestützte Visualisierung von dreidimensionalen Molekülstrukturen stehen heute zahlreiche Computerprogramme, wie z.B. *PyMol*⁴⁴, zur Verfügung. Das Programm *PyMOL* dient neben der

Visualisierung von Molekülen auch, soweit nicht anderweitig angegeben, für die Erstellung der in der vorliegenden Arbeit enthaltenen Abbildungen dreidimensionaler Molekülstrukturen.

II.2 Computergestützte Bindetaschenanalyse - Identifizierung von hot spots

Die Grundlage eines proteinbasierten Wirkstoffdesignansatzes bilden die aufgeklärten dreidimensionalen Proteinstrukturen des jeweiligen Targets. Von besonderem Interesse sind dabei stets die Bereiche intermolekularer Wechselwirkungen, die Proteinbindetaschen. In diesem Abschnitt werden nachfolgend zwei etablierte Programme vorgestellt, mit deren Hilfe im Rahmen der vorliegenden Arbeit physiko-chemische Charakterisierungen von Proteinbindetaschen zur Identifizierung privilegierter Interaktionsstellen bestimmter Atomtypen bzw. funktioneller Gruppen, sogenannter *hot spots*, durchgeführt wurden. Derartige Informationen können prinzipiell zu einem besseren Verständnis der Eigenschaften bzw. Anforderungen der zu adressierenden Bindestellen beitragen und liefern darüber hinaus wichtige Erkenntnisse, die bei der Suche und Entwicklung neuer sowie für die Verbesserung bekannter Liganden einbezogen werden können. Außerdem können die Programme für die Suche nach alternativen Bindestellen sowie für die Interpretation von Protein-Ligand-Interaktionen eingesetzt werden.

GRID

Das Programm *GRID*⁴⁵⁻⁴⁷ nutzt eine gitterbasierte Methode für die Berechnung energetisch begünstigter Wechselwirkungsstellen innerhalb von Proteinbindetaschen (*hot spots*). Die Berechnungen der Wechselwirkungsenergien an den einzelnen Gitterpunkten zwischen einer Sonde eines bestimmten Atomtyps (z.B. eines Sauerstoff-, Schwefel- oder Halogenatoms) bzw. funktioneller Gruppen (z.B. Amine, Carboxylat- oder Methylgruppe) und den Proteinatomen erfolgen anhand eines Kraftfeldes.

Die der Berechnung der nichtbindenden Wechselwirkungsenergie E zugrundeliegende Energiefunktion setzt sich aus insgesamt drei Termen zur Berücksichtigung der van der Waals-Energie, die mit einer Lennard-Jones Funktion berechnet wird, elektrostatischer Effekte sowie von Wasserstoffbrückenbindungsbeiträgen zusammen (Gl. 1). Jeder einzelne Term ist die Summe aller paarweisen Wechselwirkungen.

$$E = \sum E_{LJ} + \sum E_{el} + \sum E_{HB} \quad (\text{Gl. 1})$$

Das Lennard-Jones Potenzial ist eine Funktion des Abstandes d zwischen einem Paar chemisch nicht gebundener Atome mit den zwei element- bzw. atomtypspezifischen Konstanten A und B (Gl. 2).

$$E_{LJ} = \frac{A}{d^{12}} - \frac{B}{d^6} \quad (\text{Gl. 2})$$

Die Berechnung elektrostatischer Interaktionen erfolgt nach Gleichung 3, wobei p und q die Ladungen des Sonden- und Proteinatoms bezeichnen, getrennt durch die Distanz d . K ist eine Kombination geometrischer Faktoren und Naturkonstanten (π , ϵ , siehe Brooks *et al.*⁴⁸). Weiterhin geht die Vergrabenheit eines Atompaars innerhalb des Proteins mit s_p und s_q sowie in Form einer variablen Dielektrizitätskonstante explizit in die Berechnungen mit ein. Die Wahl der jeweiligen Dielektrizitätskonstante richtet sich dabei nach der Anzahl benachbarter Proteinatome innerhalb von 4 Å. Bei einer Anzahl größer gleich 12 liegt der Gitterpunkt im Inneren des Proteins und die Dielektrizitätskonstante ζ ($\zeta = 4$) wird verwendet. Liegt die Anzahl unter 7 wird Konstante ϵ ($\epsilon = 80$) angewandt und der Term $4s_p s_q$ gleich 0 gesetzt.

$$E_{el} = \frac{pq}{K\zeta} \left[\frac{1}{d} + \frac{(\zeta - \epsilon)/(\zeta + \epsilon)}{\sqrt{d^2 + 4s_p s_q}} \right] \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Bestimmung von Wasserstoffbrückenbindungsbeiträgen erfolgt anhand einer richtungsabhängigen Funktion (Gl. 4). Die beiden Variablen C und D bestimmen den Gleichgewichtsabstand zwischen Sonde und Proteinatom, θ den Winkel der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den jeweiligen Schweratomen. Durch den Exponent m wird die Wasserstoffbrückenbindungsstärke winkelabhängig gewichtet.

$$E_{HB} = \left[\frac{C}{d^6} - \frac{D}{d^4} \right] \cos^m \theta \quad (\text{Gl. 4})$$

DrugScore^{CSD}

Bei dem Programm *DrugScore*⁴⁹ handelt es sich um eine wissensbasierte Bewertungsfunktion (Scoringfunktion), die sowohl für die Bewertung von Protein-Ligand-Wechsel-

wirkungen (siehe auch Abschnitt II.4) als auch zur Vorhersage privilegierter Interaktionsbereiche innerhalb von Proteinbindetaschen verwendet werden kann. Die Entwicklung der Funktion erfolgte durch die Bestimmung statistischer Häufigkeiten des Auftretens bestimmter Protein-Ligand-Kontakte anhand von Kristallstrukturen der PDB. Für die Ableitung statistischer Präferenzen, der distanzabhängigen Paarpotenziale, wurden die ermittelten Häufigkeiten auf einen Referenzzustand bezogen, der die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines beliebigen Atom-Atom-Kontaktes beschreibt.

Die Identifizierung von *hot spots* erfolgt anhand eines dreidimensionalen Gitters, bestehend aus einzelnen, periodisch angeordneten Gitterpunkten, das vorab in die Bindetasche eingepasst wird. Bei den anschließenden Berechnungen werden an jedem Gitterpunkt die Wechselwirkungsenergien zwischen einem Sondenatom eines bestimmten Atomtyps und den jeweils umgebenden Aminosäuren ermittelt. Bei den Berechnungen wird der niedrigste Potenzialwert, der an einem Gitterpunkt berechnet wird, als globales Optimum von *DrugScore* mit einem Wert von 100 gleichgesetzt, wonach ein Niveau von 70 bedeutet, dass der resultierende Bereich Funktionswerte von bis zu 30% über dem globalen Optimum für den betrachteten Atomtyp beinhaltet.

Eine Weiterentwicklung des Programms *DrugScore* stellt *DrugScore^{CSD50}* dar, dessen Entwicklung auf denselben ursprünglichen Methoden beruhte, um neue, analoge Potenziale abzuleiten. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass die abgeleiteten Potenziale von *DrugScore^{CSD}* im Gegensatz zu *DrugScore* auf den kristallographischen Daten nicht-bindender Wechselwirkungsbeziehungen kleiner organischer Moleküle beruhen. Die dafür verwendeten Kristallstrukturen stammten aus der *Cambridge Structural Databank⁵¹* (CSD), was sich auch im Namen des Programms widerspiegelt. Die Vielfalt der untersuchten Moleküle, einhergehend mit einer im Vergleich zu Proteinstrukturen höheren Auflösung der Kristallstrukturen der CSD, bildete eine umfangreichere Datenlage, die für eine Verbesserung der Bewertungsfunktion genutzt werden konnte.⁵⁰ Mit Hilfe von *DrugScore^{CSD}* ist es möglich, günstige Wechselwirkungsfelder für bis zu 18 verschiedene Atomtypen, die der Atomtypenbezeichnung des Softwarepakets SYBYL entsprechen, zu berechnen. Für die visuelle Auswertung der identifizierten Wechselwirkungsfelder können die resultierenden *hot spots* als Konturen innerhalb der Bindetasche grafisch dargestellt werden. Um unterschiedliche Interaktionswerte darzustellen, können verschiedene Konturlevel eingestellt werden.

Ebenso wie die durch das Programm *GRID* ermittelten *hot spots* können auch die mittels *DrugScore^{CSD}* berechneten Wechselwirkungsenergien als Interaktionsfelder innerhalb der Proteintemplatstruktur visualisiert werden.

Die mit Hilfe dieser computerbasierten Methoden identifizierten begünstigten Interaktionspunkte liefern, vor allem in Abwesenheit von Protein-Ligand-Komplexstrukturen, wertvolle Informationen für die anschließende Erstellung proteinbasierter Pharmakophormodelle (siehe Abschnitt II.3).

II.3 Virtuelle Datenbanksuche

Ein wichtiges Instrument des computergestützten Wirkstoffdesigns zur Identifizierung neuer Liganden für biologische Zielstrukturen stellen virtuelle Datenbanksuchen dar, wobei umfangreiche Moleküldatenbanken *in silico* anhand von vorab definierten Anforderungskriterien durchsucht werden. Die jeweilige Strategie richtet sich dabei nach den verfügbaren Informationen und den jeweiligen Zielsetzungen, wobei grundsätzlich zwischen protein- und ligandbasierten Ansätzen unterschieden wird.

Als Filterfunktionen stehen verschiedene Methoden zur Auswahl, die nicht nur alternativ, sondern auch iterativ eingesetzt werden, um die Molekülanzahl der zu durchsuchenden Datenbanken gezielt zu reduzieren. So macht es beispielsweise Sinn, die Anzahl an Datenbankmolekülen zunächst auf Verbindungen mit bestimmten strukturellen bzw. physiko-chemischen Eigenschaften, wie z.B. Molekulargewicht, Anzahl an rotierbaren Bindungen, Wasserlöslichkeit oder speziellen Substrukturen mit Hilfe sogenannter Deskriptoren zu begrenzen. Anschließend kann die Suche durch detailliertere und rechenintensivere Verfahren, wie pharmakophorbasierte Datenbanksuchen oder ligandbasierte Ähnlichkeits-suchen, verfeinert werden. Beide Verfahren spielten in der vorliegenden Arbeit eine wesentliche Rolle und werden daher im folgenden Abschnitt näher erläutert.

II.3.1 Datenbanksuche anhand von Pharmakophormodellen

Ein Pharmakophormodell^{3,4} beschreibt eine Hypothese hinsichtlich des Pharmakophors^{52,53} eines Moleküls, d.h. die Gesamtheit aller relevanten sterischen und physiko-chemischen Eigenschaften, die für dessen biologische Aktivität verantwortlich sind. Diese Modelle sind als Abstraktion bzw. Simplifizierung komplexer Wechselwirkungsprofile zwischen einem biologischen Makromolekül und niedermolekularen Liganden unter Berücksichtigung der Konstitution der Liganden hinsichtlich interatomarer Abstände und Winkel, Größe sowie Morphologie, zu verstehen. Die Entwicklung von Pharmakophormodellen kann sowohl auf der Grundlage einer Proteinstruktur bzw. den Ergebnissen einer Bindetaschenanalyse, als auch anhand von Strukturinformationen aktiver Liganden erfolgen. Im Rahmen eines

virtuellen Screenings werden Pharmakophormodelle häufig als Filter eingesetzt, um Moleküldatenbanken gezielt nach neuen möglichen Liganden für ein bestimmtes Target zu durchsuchen.

Erstellung von Pharmakophormodellen mit MOE

Die im Rahmen virtueller Screeningverfahren erstellten Pharmakophormodelle der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des Softwarepakets *MOE*^{54,55} unter Verwendung des implementierten *Pharmacophore Query Editors* erstellt.

Die Definition molekularer Deskriptoren mit bestimmten Wechselwirkungseigenschaften erfolgt in *MOE* anhand der Platzierung von Pseudozentren, den sogenannten *pharmacophore features* (z.B. H-Brückendonator bzw. -akzeptor, aromatischer Rest oder hydrophobe Gruppe), im dreidimensionalen Raum. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die Positionen von potenziellen Wechselwirkungspunkten in Form von *projected features* zu lokalisieren, um so Informationen über geeignete Distanzen und Orientierungen bestimmter Atome der gesuchten Liganden gegenüber den jeweiligen Interaktionspartnern zu berücksichtigen und in ein Pharmakophormodell zu integrieren.

Neben den *pharmacophore features* können zudem drei Arten verschiedener Volumina definiert werden: *Included volumes*, *excluded volumes* und *exterior volumes*. *Included volumes* repräsentieren Regionen, die durch gewisse Ligandatome adressiert werden müssen. Im Gegensatz dazu darf kein einziges Ligandatom innerhalb der *excluded volumes* liegen. *Exterior volumes* wiederum begrenzen Räume, in denen alle Ligandatome lokalisiert sein müssen und aus denen kein Atom herausragen darf. Der Nutzen dieser Pharmakophorelemente besteht darin, Bindetaschenformen zu imitieren, den zugänglichen Raum einer Bindetasche zu begrenzen sowie nach Liganden mit einer spezifischen Form zu suchen.

Das Ziel bei der Erstellung von Pharmakophormodellen ist die Beschreibung relevanter Protein-Ligand-Interaktionen und sollte für die Suche nach neuen Liganden einerseits die notwendigen Ligandeneigenschaften ausreichend spezifisch beschreiben, aber andererseits auch nicht zu restriktiv sein. Eine Möglichkeit der Kompromissfindung zwischen diesen beiden Anforderungen bietet die Festlegung von Toleranzbereichen um die Pseudozentren der einzelnen *pharmacophore features* bzw. *volumes*, die in Form von Sphären dargestellt werden. Die freiwählbaren Radii der Sphären entsprechen dabei der maximal tolerierbaren Abweichung eines Ligandatoms vom jeweiligen Pseudozentrum, um die Anforderungen des jeweiligen Pharmakophorelements noch zu erfüllen.

Für eine Spezifizierung der *pharmacophore features* und *volumes* ist neben den allgemeinen, wählbaren Eigenschaftenbezeichnungen die Beschreibung bestimmter Atome

oder Substrukturen durch SMILES⁵⁶ bzw. SMARTS⁵⁷ möglich. Auch eine Kombination bzw. Verknüpfung mehrerer Eigenschaften in einem *feature* oder *volume* kann durch die Verwendung bestimmter Operatoren (z.B. „und (&), oder (|), nicht (!)“) erfolgen. Schließlich können erstellte Pharmakophormodelle noch durch die Definition zusätzlicher Bedingungen (*constraints*) modifiziert werden, wobei Gruppen einzelner Bestandteile des Modells mit speziellen Ausdrücken, wie z.B. „mindestens, exakt, alle oder keins“, verknüpft werden. Bei einer Auswahl von drei *features* bedeutet z.B. der Begriff „mindestens 2“, dass wenigstens zwei der drei ausgewählten Merkmale von den gesuchten Liganden erfüllt werden müssen. Nach der Erstellung eines geeigneten Pharmakophormodells kann mit *MOE* eine virtuelle Datenbanksuche durchgeführt werden, wobei die Kriterien des Modells als Suchanfrage dienen. Hierbei erlaubt *MOE* die Definition eines Grenzwertes, der die Mindestanzahl zu erfüllender Kriterien (*partial match*) definiert. Um bestimmte bindungsrelevante Strukturelemente hervorzuheben, können diese als „essenziell“ gekennzeichnet werden und müssen daraufhin unbedingt in den potenziellen Liganden enthalten sein, um als Kandidatenmolekül erfasst zu werden. Während des Suchprozesses werden verschiedene, vorab generierte Konformationen der Datenbankverbindungen mit dem Pharmakophormodell abgeglichen. Erfüllt eine untersuchte Verbindungskonformation alle geforderten Kriterien, so wird das Molekül als ein *hit* erkannt und in einer neuen Datenbank abgespeichert.

II.3.2 Ligandbasierte Datenbanksuche mit FeatureTreesXL

Eine weitere Strategie des computerbasierten Wirkstoffdesigns zur Identifizierung neuer Leitstrukturen repräsentieren ligandbasierte Verfahren, wobei Strukturinformationen aktiver Verbindungen bei der Suche verwendet werden. Derartige Verfahren sind besonders bei Projekten, bei denen keine dreidimensionalen Strukturen des Zielproteins vorhanden sind, das Mittel der Wahl. Ein bewährtes Programm für die Suche nach potenziellen Leitstrukturen basierend auf der molekularen Ähnlichkeit zu Referenzliganden ist *FeatureTrees*^{58,59} (*FTrees*). Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Programm *FeatureTreesXL* handelt es sich um die GUI-Version (*Graphical User Interface*) von *FTrees*.

Das Programm *FTreesXL* verwendet für die Untersuchung und Bestimmung der molekularen Ähnlichkeit zwischen zwei niedermolekularen Verbindungen, anstelle der häufig eingesetzten linearen Darstellungsweise von Molekülen (*Fingerprints*, *Bit strings*, Vektoren) komplexere, nicht-lineare Moleküldeskriptoren, sogenannte *feature trees* (*ftrees*). Ein *ftree* beschreibt ein Molekül in Form eines Baumdiagramms, das alle hydrophoben Fragmente und funktionelle Gruppen des jeweiligen Moleküls umfasst und dabei die jeweiligen Verknüpfungen der

einzelnen Fragmente untereinander widerspiegelt. Die einzelnen Molekülfragmente werden innerhalb des *ftrees* durch entsprechende Knotenpunkte dargestellt, die Informationen über die sterischen und physiko-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Substruktur beinhalten. Die Größe eines Fragments wird durch die Atomanzahl und ein genähertes van der Waals Volumen beschrieben, während die Beschreibung physiko-chemischer Eigenschaften durch ein Interaktionsprofil erfolgt, das auf Wechselwirkungen beruht, die ein Fragment mit einem potenziellen Rezeptor auszubilden vermag.

Im Rahmen einer virtuellen Datenbanksuche werden zunächst *ftrees* aller beteiligten Moleküle, von vorab definierten Referenzliganden sowie von den Datenbankverbindungen, anhand der jeweiligen 2D-Strukturen berechnet. Im Anschluss erfolgt die Bestimmung der molekularen Ähnlichkeit zwischen den verwendeten Referenzliganden und den Datenbankmolekülen mittels zwei verschiedener Vergleichsalgorithmen, dem *split-search* und dem *match-search* Algorithmus. Die Angabe der berechneten molekularen Ähnlichkeit zwischen zwei Molekülen wird durch einen Wert zwischen 0 (keine Übereinstimmungen) und 1 (identisch) ausgedrückt. Abschließend besteht die Möglichkeit, die Datenbankmoleküle anhand der Ähnlichkeitswerte zu sortieren und ausgewählte Verbindungen in verschiedenen Dateiformaten (z.B. mol2) herauszuschreiben, um diese z.B. mit Dockingsimulationen hinsichtlich einer Proteinbindung zu untersuchen.

II.4 Dockingsimulationen und Scoringfunktionen

Ein Schwerpunkt computergestützter Methoden im Rahmen strukturbasierter Wirkstoffdesignstudien besteht in der Aufklärung und Bewertung möglicher Bindemodi von niedermolekularen Liganden an den jeweiligen Zielproteinen durch Dockingsimulationen. Die Berechnung potenzieller Bindeposen erfolgt mit Hilfe spezieller Dockingprogramme, die dafür zwei grundlegende Arbeitsschritte ausführen. Der erste Schritt umfasst die Berechnung potenzieller Bindungsgeometrien durch Generierung verschiedener Konformationen und Orientierungen des Ligandenmoleküls innerhalb der Bindetasche (*Sampling, Searching*). Im zweiten Arbeitsschritt kommt es anschließend zu einer Bewertung der Dockinglösungen durch eine implementierte Scoringfunktion (*Scoring*). Die verfügbaren Dockingprogramme operieren entweder mit intakten Gesamtmolekülen oder rekonstruieren die Liganden aus einzelnen Molekülfragmenten innerhalb der Bindestelle. Weiterhin lassen sich die Programme je nach zugrundeliegendem Suchalgorithmus in folgende Kategorien unterteilen:

- **Multikonformerer Docking:** Docking vorab generierter, rigider Konformere eines Liganden (z.B. *Glide*⁶⁰),
- **Stochastische Suchmethoden:** Suche nach Bindungsgeometrien durch simultane Optimierung der Konformation und Orientierung des Liganden innerhalb der Bindetasche mit Hilfe von genetischen Algorithmen (z.B. *AutoDock*⁶¹, *GOLD*⁶²),
- **Aufbauende Methoden:** Platzierung eines Basisfragments mit nachfolgendem inkrementellen Aufbau des Liganden (*Growing*) bzw. Platzierung sämtlicher Molekülfragmente mit anschließender Verknüpfung (*Linking*) zum Gesamtmolekül (z.B. *FlexX*⁶³, *DOCK*^{64,65}).

Bei der Bewertung der erzeugten Bindemodi durch im Dockingprogramm implementierte Scoringfunktionen wird versucht, eine möglichst zutreffende Abschätzung des Bindungspotenzials anhand einer simplifizierten Beschreibung der jeweils ausgebildeten Protein-Ligand-Wechselwirkungen, zu erhalten. Dabei ist es für deren Anwendung in einem virtuellen Screening zunächst nicht unbedingt erforderlich, absolute Werte korrekt vorherzusagen, wichtiger ist hingegen das Potenzial, realitätsnahe Bindeposen von vermeintlich artifiziellen unterscheiden sowie zwischen biologisch aktiven und inaktiven Verbindungen diskriminieren zu können. Die zur Verfügung stehenden Scoringfunktionen lassen sich entsprechend der für deren Entwicklung verwendeten Datengrundlagen in drei übergeordnete Klassen unterteilen:

- **kraftfeldbasierte Methoden,**
- **wissensbasierte Potenziale** und
- **empirische Bewertungsfunktionen.**

Für die Durchführung von Dockingexperimenten steht heute eine Vielzahl an Dockingprogrammen zur Verfügung. Die Auswahl des Programms hängt vor allem von dem beabsichtigten Zweck ab. Wird das Programm im Rahmen eines virtuellen Screenings verwendet, wobei es hauptsächlich darauf ankommt, einen möglichst hohen Durchsatz an Ligandenmolekülen in geringer Rechenzeit zu erreichen, werden in der Regel Programme eingesetzt, die vermehrt mit Simplifikationen der realen physiko-chemischen Gegebenheiten arbeiten. Andererseits ist die Anwendung präziser und daher zeitaufwendigerer Verfahren bei Studien sinnvoll, bei denen es darum geht, möglichst exakte Bindungsvorhersagen für eine überschaubare Anzahl an Liganden zu berechnen. Im Folgenden wird näher auf die

Methodik der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dockingprogramme *AutoDock* und *GOLD* eingegangen, die beide einen genetischen Algorithmus als Suchmethode für das *Sampling* verwenden.

Genetische Algorithmen

Genetische Algorithmen⁶⁶ (GA) repräsentieren heuristische Optimierungsverfahren und gehören zur Kategorie der stochastischen Suchmethoden, deren Grundidee auf biologischen Evolutionstheorien basiert. In Bezug auf deren Anwendung bei Dockingverfahren bedeutet dies, dass bei der Suche nach den optimalen Orientierungen und Konformationen von Liganden in Proteinbindetaschen eine definierte Anzahl (Population) an Ligandenkonfigurationen (Individuen) innerhalb der Bindetasche generiert wird und schließlich diejenigen mit den günstigsten Wechselwirkungsenergien als Dockinglösungen ausgewählt werden (Selektion). Die relevanten Informationen eines generierten Bindungsmodus bezüglich der jeweiligen Konformation des Liganden, des Rotations- und Translationszustands gegenüber dem Rezeptor sowie der Torsionswinkel werden in diesem Zusammenhang in einem „Chromosom“ kodiert.

Die Suche nach dem optimalen Bindemodus eines Liganden folgt iterativen Abläufen, bestehend aus Initialisierung, Evaluation, Selektion, genetischen Operationen und der Beendigung des GA bei Erreichen eines bestimmten Abbruchkriteriums. Im Anschluss an die Generierung einer ausreichend großen Menge an Ausgangsindividuen (erste Generation) erfolgt eine Evaluation aller erzeugten Bindeposen dieser Generation hinsichtlich resultierender Wechselwirkungsenergien mit Hilfe einer implementierten Bewertungsfunktion. Danach kommt es zu einer zufälligen Auswahl von Bindeposen der jeweils aktuellen Generation, wobei jedoch Ligandenkonfigurationen mit günstigeren Wechselwirkungsenergien in Analogie zu der von Charles Darwin postulierten Theorie „*Survival of the fittest*“ mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ausgewählt und anschließend in die nächste Generation übernommen werden. Durch genetische Operatoren (Mutation und Kreuzung) werden die Ligandenkonfigurationen modifiziert (Mutation) und miteinander kombiniert (Kreuzung), wodurch wiederum neue Populationen an Ligandenkonfigurationen (neue Generationen) erhalten werden. Der beschriebene Prozess, mit Ausnahme der Initialisierung, wird bis zum Erreichen eines vorab definierten Abbruchkriteriums, an dem der Algorithmus beendet wird, z.B. dem Erreichen einer maximalen Anzahl an Generationen, fortgesetzt. Nach Erfüllung des Terminierungskriteriums wird schließlich die berechnete Ligandenkonfiguration mit dem günstigsten Wechselwirkungsmuster als Dockinglösung ausgegeben.

AutoDock3.0

*AutoDock3.0*⁶¹ ist ein automatisiertes Dockingprogramm mit dem niedermolekulare Ligandenmoleküle flexibel in die Bindetaschen von Zielproteinen eingepasst werden können. Für die Berechnung potenzieller Bindungsgeometrien beim *Sampling* verwendet das Programm einen speziellen genetischen Algorithmus, die Bewertung der erzeugten Bindemodi erfolgt anhand einer empirischen Scoringfunktion.

Während des Dockingprozesses wird das Protein in Form von dreidimensionalen Affinitätsgittern repräsentiert, die vorab auf der Grundlage einer gegebenen Proteinstruktur nach Ergänzung polarer Wasserstoffatome und Zuweisung entsprechender Atomladungen berechnet werden. Dadurch ist es dem Programm nicht möglich, bestimmte adaptive Effekte seitens des Proteins während der Ligandenbindung in die Berechnungen einfließen zu lassen. Die Gitter bestehen aus einer Vielzahl an regelmäßig, orthogonal angeordneten Gitterpunkten und enthalten Informationen über Wechselwirkungsenergien eines jeden, in den untersuchten Liganden vorkommenden Atomtyps. Die Gitterberechnungen werden mit Hilfe des Programms *AutoGrid* durchgeführt und beruhen auf klassischen Kraftfeldtermen für van der Waals und Coulomb Wechselwirkungen. Dabei werden an jedem Gitterpunkt die auftretenden Wechselwirkungsenergien zwischen einem Sondenatom sowie für die Berechnung elektrostatischer Potentiale einer Punktladung von +1 und den jeweils umliegenden Proteinatomen berechnet. Die Berechnung der Bindungsaffinitäten der einzelnen Bindeposen erfolgt schließlich durch Interpolation der acht Gitterpunkte, die jedes Ligandenatom umgeben. Hierfür wird die in *AutoDock* implementierte Scoringfunktion verwendet, die sich wie folgt zusammensetzt:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{hbond} \right) \\ & + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} S_i V_j e^{\left(-\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \end{aligned} \quad (\text{Gl. 5})$$

Bei dieser Energiefunktion ist die freie Bindungsenthalpie (ΔG) definiert als die Summe aller paarweisen Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit der Distanz r_{ij} . Die Funktion besteht aus insgesamt fünf Termen, wovon drei Terme relevante Interaktionsarten beschreiben: van der Waals Wechselwirkungen (Lennard-Jones 12-6 Potenzial), Wasserstoffbrückenbindungen (gerichtetes 12-10 Potenzial, wobei $E(t)$ eine gerichtete winkelabhängige Gewichtung vornimmt und E_{hbond} für die geschätzte mittlere Energie einer Wasserstoffbrückenbindung

zwischen Wasser und einem polaren Atom steht) und elektrostatische Wechselwirkungen (distanzabhängige Dielektrizitätskonstante $\varepsilon(r_{ij})$) beschreiben. Weiterhin wird auch der Entropieverlust während der Bindung des Liganden berücksichtigt, der sich proportional zu der Anzahl der rotierbaren Ligandenbindungen (N_{tor}) verhält. Der fünfte Term dient der mathematischen Beschreibung der Desolvatisierung sowie des „hydrophoben Effekts“⁶⁷, mit dem Solvationsparameter S_i und V_j als anteiliges Volumen des umgebenden Proteins. Die jeweiligen ΔG -Koeffizienten wurden mittels linearer Regressionsanalyse anhand eines Datensatzes von Protein-Ligand-Komplexen bekannter Affinitäten empirisch bestimmt.⁶¹

Bevor Bindeposen für Ligandenmoleküle generiert werden können, ist es erforderlich diese entsprechend aufzubereiten. Hierfür werden die vollständig protonierten Moleküle nach erfolgter Zuweisung von Gasteiger-Marsili Ladungen⁶⁸ in eine Ligandenstruktur umgewandelt, bei der alle nicht-polaren Wasserstoffatome mit ihren Bindungspartnern fusioniert werden. Diese Umwandlung sowie die Definition der rotierbaren Ligandenbindungen wird in einem Schritt unter Verwendung von *AutoTors* vorgenommen.

Für den eigentlichen Dockingprozess, d.h. die Suche nach geeigneten Wechselwirkungsstellen und möglichen Bindungsgeometrien, bei dem das Ligandenmolekül Translationen, Rotationen und Torsionen entlang der gegebenen Freiheitsgrade unterliegt, verwendet *AutoDock3.0* einen speziellen genetischen Algorithmus, der als *Lamarckian genetic algorithm* (LGA) bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus einem traditionellen genetischen Algorithmus, der für die globale Suche nach potenziellen Bindeposen erforderlich ist, und einer lokalen Suchmethode, basierend auf der Methode von Solis und Wets⁶⁹, zur Optimierung der global gefundenen Bindemodi. Die Bezeichnung LGA ist auf die zugrundeliegende Evolutionstheorie von Lamarck zurückzuführen, da bei dieser Methode resultierende Modifizierungen der Ligandenkonfiguration (Phänotyp) während der lokalen Suche zu Veränderungen der entsprechenden Zustandsvariablen (Genotyp) führen können.

Das Dockingverfahren endet nachdem eine spezifizierbare Anzahl an Dockinglösungen generiert worden ist. Im Anschluss werden die erhaltenen Dockinglösungen entsprechend ihrer Abweichung untereinander, ausgedrückt durch die *root-mean-square deviation* (RMSD)-Werte, gruppiert und gemäß der berechneten Bindungsenergie sortiert. Der RMSD-Wert ist definiert als die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung der Koordinaten aller Schweratome eines Liganden und entspricht dem Abstand korrespondierender Atome. Entgegen den Bestrebungen neuerer Dockingprogramme, bestimmte Aspekte der Proteinflexibilität während des Dockingverfahrens explizit zu berücksichtigen, ist dies dem Programm *AutoDock3.0* *per se* nicht möglich, da die Berechnungen auf der Grundlage einer

vorgegebenen, starren Bindetaschenkonformation basieren. Um dennoch Proteinflexibilität bei Dockingstudien entsprechend zu berücksichtigen, ist es notwendig, separate Dockingsimulationen für mehrere Proteinkonformationen eines Targets durchzuführen. Dieser Vorgang wird als *Cross-Docking* bezeichnet.

In situ Cross-Docking

Eine besondere Form des *Cross-Dockings* repräsentiert ein als „*in situ Cross-Docking*“ bezeichnetes Verfahren, das in der vorliegenden Arbeit für Selektivitätsuntersuchungen ausgewählter Liganden verwendet und mit Hilfe von *AutoDock* durchgeführt wurde. Das *in situ Cross-Docking* (ISCD)^{70,71} stellt ein spezielles Dockingverfahren dar, bei dem mehrere Proteinstrukturen simultan in einem Dockingverfahren adressiert werden können. Bei den gebräuchlichen Dockingverfahren beruhen die Rechnungen häufig nur auf einer einzelnen Konformation eines Proteins, so dass für unterschiedliche Proteinkonformationen bzw. verschiedene Zielstrukturen separate Dockingberechnungen durchgeführt werden müssen, was zu einem enormen Zeitaufwand führen kann. Für die Dockingsimulationen verwendet diese Cross-Dockingvariante eine gitterbasierte Darstellung des Rezeptors und ist demnach mit Programmen, wie z.B. *AutoDock*, kompatibel.

In Analogie zum Vorgehen auf Gittern beruhender Dockingmethoden werden zunächst dreidimensionale Affinitätsgitter für den Bereich der Bindetasche durch Berechnungen entsprechender Wechselwirkungsenergien zwischen verschiedenen Sonden- und den umgebenden Proteinatomen erzeugt. Anschließend werden diese Gitter im dreidimensionalen Raum aneinander gereiht und durch hochenergetische Gitter, die als repulsive Schichten zwischen den Affinitätsgittern der einzelnen aktiven Zentren fungieren, voneinander getrennt. Auf diese Weise sollen artifizielle Dockinglösungen zwischen zwei Gittern vermieden werden. Abschließend werden die einzelnen, aneinandergereihten Gitter noch vor den Dockingsimulationen zu einem einzigen Suchraum vereint.

Aufgrund der gleichzeitigen Berücksichtigung verschiedener Proteinstrukturen während eines Dockingverfahrens repräsentiert diese Methode eine zeitsparende Alternative gegenüber herkömmlichen Cross-Dockingexperimenten und ist sowohl für Selektivitätsuntersuchungen, als auch für Untersuchungen zu Fragestellungen aus dem Bereich der Proteinflexibilität geeignet. Die besondere Eignung für Selektivitätsuntersuchungen resultiert daraus, dass bei dem ISCD die verschiedenen Zielstrukturen in gegenseitiger Konkurrenz zueinander stehen und schließlich der Ligand in diejenige Bindetasche eingepasst wird, die für diese Verbindung am geeignetsten erscheint.

GOLD

In Analogie zu *AutoDock3.0* nutzt auch das Programm *GOLD*^{62,72,73} (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) zur Berechnung von Bindeposen in Proteinbindetaschen einen genetischen Algorithmus. Anstelle einer gitterbasierten Rezeptordarstellung beruhen die Berechnungen auf Wechselwirkungsdeskriptoren, sogenannten *fitting points*. Diese virtuellen *fitting points* stellen potenzielle H-Brückenbindungspartner von Protein und Ligand dar und werden auf der Grundlage jedes während der Initialisierung identifizierten und zugänglichen H-Brückendonoratoms und H-Brückenakzeptoratoms erzeugt. Für die Platzierung des Liganden in der Bindetasche verwendet *GOLD* eine *least-squares fitting*-Methode, die dazu dient, die größtmögliche Anzahl an H-Brückenbindungen auszubilden. Für die Simulationen benötigt das Programm vollständig protonierte Protein- und Ligandstrukturen, denen vorab entsprechende freie Elektronenpaare hinzugefügt wurden. Die explizite Zuweisung von Ladungen ist hingegen nicht erforderlich, da Formalladungen automatisch anhand der jeweiligen Protonierungszustände der Atome abgeleitet werden.

Für die Bewertung der generierten Dockinglösungen stehen in *GOLD* neben der ursprünglichen Scoringfunktion *GOLDScore* noch alternative Funktionen, wie z.B. *ChemScore*⁷⁴, zur Verfügung. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit eine benutzerdefinierte Bewertungsfunktion zu verwenden. Die in dieser Arbeit genutzte Fitness-Funktion *GoldScore* bestimmt anstelle absoluter Bindungsaffinitäten artifizielle Werte und besteht aus der Summe dreier Energiekomponenten:

$$\text{GOLDScore} = -H_Bond_Energy - (\text{Complex_Energy} + \text{Internal_Energy}) \quad (\text{Gl. 6})$$

Die für die Bewertung einer Dockinglösung verwendeten Energiebeiträge umfassen die distanz- und winkelabhängig gewichtete Summe aller H-Brückenbindungsenergien (*H_Bond_Energy*) zwischen Protein und Ligand, die Summe aller paarweisen Interaktionsenergien zwischen Ligand- und Proteinatomen (van der Waals Wechselwirkungen) in Form eines 8-4 Potenzials (*Complex_Energy*) sowie die Summe intramolekularer Energien des Liganden (*Internal_Energy*). Dabei wird die sterische Energie über ein 12-6 Potenzial und die Torsionsenergie über das Torsionspotenzial des Tripos Kraftfelds⁷⁵ berechnet. Je höher der Wert einer Dockinglösung ausfällt, als desto günstiger wird diese beurteilt.

Im Gegensatz zu *AutoDock3.0*, das während der Dockingsimulationen rigide Proteinstrukturen verwendet, können mit *GOLD* bestimmte Aspekte der Proteinflexibilität bei der Ligandenbindung während der Dockingsimulationen durch Definition rotierbarer Seitenketten innerhalb benutzerdefinierter Grenzen, der Vorgabe von Seitenketten-

konformerem sowie der Möglichkeit in verschiedene Proteinstrukturen eines oder verschiedener Proteine zu docken (*ensemble docking*) explizit mit einbezogen werden. Weiterhin ist es möglich bestimmte Anforderungen an den Bindemodus, die eine Dockinglösung erfüllen muss, durch die Festlegung verschiedener Bedingungen (*constraints*), vorzugeben.

II.4.1 Eigenständige Scoringfunktionen

Neben den in Dockingprogrammen implementierten Scoringfunktionen stehen auch eine Reihe eigenständiger Bewertungsfunktionen, wie die in der vorliegenden Arbeit genutzten Programme *DrugScore^{CSD}* und *SFCscore* zur Verfügung.

DrugScore^{CSD}

Die Scoringfunktion des Programms *DrugScore^{CSD50}* gehört aufgrund von deren Entwicklung, basierend auf statistischen Analysen von Kristallstrukturen niedermolekularer Verbindungen (vgl. Abschnitt II.2), zur Kategorie der wissensbasierten Bewertungsfunktionen. Die Auswertung lieferte Informationen bezüglich der Verteilung von Distanzen und Winkeln zwischen verschiedenen Atomtypenpaaren, auf deren Grundlage ein artifizierter Wert für jedes Atomtypenpaar abgeleitet wurde. Ebenso wie die Scoringfunktion GoldScore werden vom Programm *DrugScore^{CSD}* anstelle einer Vorhersage absoluter Bindungsaffinitäten artifizierbare Werte berechnet, die sich aus der Summe aller auftretenden Atompaarwechselwirkungen zusammensetzen.

Die Stärken von *DrugScore^{CSD}* liegen dabei vor allem in der Identifizierung plausibler, d.h. realitätsnaher Bindungsgeometrien aus einer Vielzahl an Dockinglösungen, weshalb sich das Programm besonders für Re-Scoringverfahren eignet. Unter dem Begriff *Re-Scoring* versteht man eine zusätzliche Affinitätsbewertung von Protein-Ligand-Komplexen durch Anwendung einer alternativen Scoringfunktion.

SFCscore

Für eine möglichst genaue Vorhersage potenzieller absoluter Bindungsaffinitäten von zahlreichen niedermolekularen Liganden diente in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus eine Funktion des Programms *SFCscore⁷⁶* (Version 1.0). Die verschiedenen Scoringfunktionen von *SFCscore* berechnen Affinitäten von Protein-Ligand-Komplexen als Summe verschiedener Interaktionsterme (Deskriptoren), deren Gewichtung auf experimentellen

Struktur- und Affinitätsdaten beruht. Aufgrund dessen zählen die acht verfügbaren Funktionen des Programms zur Kategorie der empirischen Bewertungsfunktionen.

Die für die Parametrisierung der Scoringfunktionen verwendeten experimentellen Daten stammten dabei sowohl aus öffentlichen Quellen (*AffinDB database*⁷⁷), als auch von pharmazeutischen Unternehmen, im Rahmen eines sogenannten *Scoring Function Consortium* (SFC), einer Kooperation universitärer Wissenschaftler mit verschiedenen Pharmaunternehmen sowie dem *Cambridge Crystallographic Data Center*. Für die Beschreibung der in Protein-Ligand-Komplexen ausgebildeten Wechselwirkungen zur Berechnung von Bindungsaffinitäten wurden eine Reihe diverser Deskriptoren entwickelt. Das Spektrum dieser Deskriptoren umfasst unter anderem neben Deskriptoren zur Beschreibung des Liganden (z.B. durch Molekulargewicht, Atomanzahl, Anzahl rotierbarer Bindungen) vor allem essenzielle Wechselwirkungsbeiträge (z.B. Anzahl an H-Brückenbindungen, Interaktionen von Ringsystemen, Messungen hydrophober Komplementarität) und Deskriptoren zur Charakterisierung verschiedener Oberflächen. Die ermittelte Bindungsaffinität wird in Form eines pK_i -Wertes angegeben, einer üblichen Beschreibung der Affinität von Enzyminhibitoren, als negativ dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstanten K_i bzw. der Dissoziationskonstanten K_d eines Protein-Inhibitor-Komplexes.

Die Anwendung von *SFCscore* erfolgte in der vorliegenden Arbeit schwerpunktmäßig im Rahmen von *Consensus-Scoring*-Verfahren, wobei Bindungsaffinitäten für Dockinglösungen durch die iterative Anwendung verschiedener Scoringfunktionen berechnet wurden.

II.5 Molekulardynamik Simulationen

Methodik

Bei den biologischen makromolekularen Zielstrukturen von Wirkstoffdesignstudien handelt es sich, wie bereits beschrieben, um dynamische Systeme, deren intrinsische Flexibilität essenziell für ihre physiologischen Funktionen ist. Die vorhandene Proteinflexibilität sowie die jeweils zugrundeliegenden Dynamiken lassen sich anhand von Röntgenstrukturanalysen nicht erfassen, da die Kristallstrukturen jeweils nur eine Konformation des gesamten Ensembles zeigen. Eine Methode, mehrere Konformationen eines Proteins zu erfassen und diese experimentell aufzuklären, bietet hingegen die NMR-Spektroskopie. Für weiterführende Analysen zur detaillierten Untersuchung von Proteindynamiken stehen heute computergestützte Verfahren in Form von Molekulardynamik (MD) und Monte-Carlo Simulationen zur Verfügung. Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für die vorliegende

Arbeit wird die zugrundeliegende Methodik von MD Simulationen in diesem Abschnitt näher erläutert.

Bei MD Simulationen werden Proteinbewegungen durch die Berechnung einer Trajektorie eines Molekülsystems beschrieben, die durch simultane Integration der Newton'schen Bewegungsgleichung aller Atome erhalten wird. Die Newton'sche Bewegungsgleichung (Gl. 7) beschreibt die Bewegung eines Teilchens mit der Masse m_i entlang einer Koordinate \vec{r}_i mit einer Kraft \vec{F}_i , die auf das Teilchen in dieser Richtung wirkt.

$$\vec{F}_i = m\vec{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} \quad (\text{Gl. 7})$$

Für die Beschreibung der verschiedenen Zustände des untersuchten Systems durch Integration der Bewegungsgleichung verwendet das Programm *AMBER*⁷⁸ (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) standardmäßig den sogenannten *Leapfrog*-Algorithmus, wobei die Geschwindigkeiten und Positionen alternierend berechnet werden. Basierend auf der Geschwindigkeit zum Zeitpunkt $t - \frac{1}{2}\Delta t$ wird die Geschwindigkeit für einen zukünftigen Zeitpunkt nach einem bestimmten Zeitintervall berechnet (Gl. 8). Anschließend kann die neue Position zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ bestimmt werden (Gl. 9). Somit ist die Berechnung von $\vec{v}_i(t)$ zu jedem beliebigen Zeitpunkt nach Formel (Gl. 10) möglich.

$$\begin{aligned} \vec{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) &= \vec{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \vec{a}_i(t)\Delta t \\ &= \vec{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \frac{1}{m_i} \left[-\frac{\partial V(\vec{r}_1(t), \vec{r}_2(t), \dots, \vec{r}_n(t))}{\partial \vec{r}_i} \right] \Delta t \end{aligned} \quad (\text{Gl. 8})$$

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) \Delta t \quad (\text{Gl. 9})$$

$$\vec{v}_i(t) = \frac{1}{2} \left[\vec{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) + \vec{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) \right] \quad (\text{Gl. 10})$$

Die Bestimmung interatomarer Wechselwirkungen erfolgt bei MD Simulationen anhand von Kraftfeldern, die sowohl Terme für bindende als auch nicht bindende Interaktionen beinhalten. Die Auswahl eines geeigneten Kraftfeldes richtet sich nach dem untersuchten System (Makromoleküle, wie z.B. Proteine, oder niedermolekulare Verbindungen) und ist für die Aussagekraft der durchgeführten Berechnungen von entscheidender Bedeutung. Ein

geeignetes Kraftfeld für die Simulation von Proteindynamiken repräsentiert beispielsweise das in dieser Arbeit verwendete *AMBER*-Kraftfeld, das durch Gleichung 11 wiedergegeben werden kann.

$$\begin{aligned}
 E_{total} = & \sum_{bonds} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{dihedrals} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & + \sum_{i < j}^{atoms} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] + \sum_{i < j}^{atoms} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}}
 \end{aligned}
 \tag{Gl. 11}$$

Die in diesem Kraftfeld enthaltenen Terme dienen einerseits der Beschreibung von Bindungsdehnung (*bonds*), Winkelbeugung (*angles*), Torsionen (*dihedrals*) und andererseits von nicht-kovalenten Wechselwirkungsarten, wie van der Waals Wechselwirkungen und elektrostatische Interaktionen.

E_{total} ergibt sich aus der Summe aller Einzelbeiträge. Der erste Term dient der Beschreibung der Bindungsdehnung durch Kraftkonstante K_r , der Bindungslänge zwischen zwei Atomen mit dem Abstand r sowie den Gleichgewichtsabstand der Bindung r_{eq} . Die Auslenkung von Winkeln von einem Referenzwert wird in Analogie durch die Proportionalitätskonstante zwischen Auslenkung und Energie K_θ , den Winkel θ und den Referenzwert des Winkels θ_{eq} beschrieben. Der dritte Term, der Torsionsterm, wird charakterisiert durch die Kraftkonstante V_n , der Multiplizität n , dem Winkel ϕ sowie der Phasenverschiebung γ . Die Berücksichtigung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen zwischen zwei Atomen i und j erfolgt in Form von Termen für van der Waals Interaktionen und elektrostatische Kräfte. Zur empirischen Beschreibung von van der Waals Wechselwirkungen wird das Lennard-Jones 12-6 Potenzial verwendet. Bei A_{ij} und B_{ij} handelt es sich um atomtypspezifische Konstanten, R_{ij} gibt den jeweiligen interatomaren Abstand wieder. Die elektrostatischen Kräfte werden mit Hilfe des Coulomb'schen Gesetzes beschrieben, wobei q_i und q_j die jeweiligen atomaren Ladungen darstellen und ϵ der Dielektrizitätskonstante entspricht.

Das in dieser Arbeit verwendete *AMBER*-Kraftfeld berücksichtigt im Gegensatz zu früheren Kraftfeldversionen, die auf *united-atom* Darstellungen basierten, bei denen nichtpolare Wasserstoffe mit den zugehörigen Schweratomen fusioniert dargestellt werden, eine *all-atom* Darstellung, wobei sowohl die Schweratome als auch alle Wasserstoffatome separat modelliert werden.

Setup und Durchführung

Die in dieser Arbeit durchgeführten MD Simulationen zur Untersuchung von Proteindynamiken sowie zur Erforschung des Konformationsraumes von biologischen Zielstrukturen basieren auf der Grundlage dreidimensionaler Proteinstrukturen, die zunächst in einem Lösungsmittel (z.B. Wasser) solvatisiert werden. Um Neutralität zu gewährleisten werden dem System anschließend noch entsprechende Gegenionen hinzugefügt. Für die Simulation des Lösungsmittels stehen prinzipiell zwei verschiedene Modelle zur Verfügung: implizite Modelle, wie z.B. das „*generalized Born/surface area*“-Modell in *AMBER* oder explizite Solvensmodelle, z.B. das in der vorliegenden Arbeit verwendete TIP3P Modell⁷⁹, wobei eine Vielzahl expliziter Wassermoleküle in die Simulation integriert werden. Da aus diesem Grund explizite Solvensmodelle deutlich mehr Rechenzeit benötigen, im Gegenzug aber auch genauere Ergebnisse liefern, richtet sich die Wahl des geeigneten Lösungsmittelmodells nach der Größe des betrachteten Systems sowie nach der Zielsetzung der Untersuchungen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten MD Simulationen wurden explizite Solvensmoleküle verwendet und periodische Randbedingungen gewählt. Dabei wird die erzeugte Solvensbox in alle drei Raumrichtungen unendlich oft repliziert, so dass jedes Solvensmolekül, das während der Simulation die ursprüngliche Box in eine bestimmte Richtung verlässt, an der gegenüberliegenden Seite wieder in sie hinein tritt.

Generell empfiehlt es sich, das gesamte System (Protein und Solvens) vor der Simulation einer Minimierung zu unterziehen, um zu kurze interatomare Abstände und ungünstige Strukturen vorab aufzulösen, die während der Simulation zu unnatürlich hohen Energien führen könnten. Weiterhin erfolgen die Berechnungen von Trajektorien unter definierten Bedingungen sogenannter Ensembles (NVE, NVT, NVP). Bei dem NVE Ensemble handelt es sich um Rahmenbedingungen, bei denen keine Partikel (N) oder Energie (E) mit der Umgebung austauscht werden und das Volumen (V) konstant bleibt. Weiterhin ist es möglich, die Simulationen auch bei konstanter Temperatur (NVT) oder konstantem Druck (NVP) zu analysieren. Für die Regulation der Temperatur verwendet das Programm *AMBER* ein „externes Wärmebad“, das bei Bedarf Wärme an das System abzugeben oder von diesem aufzunehmen vermag. In Analogie lässt sich auch der Druck eines Systems durch ein „Druckbad“ direkt regulieren.

Nach erfolgter Berechnung einer Trajektorie über einen benutzerdefinierten Zeitraum, die für makromolekulare Strukturen (z.B. Proteine) in der Regel im Bereich weniger Nanosekunden liegt, können die simulierten Strukturbewegungen unter verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet werden. Da neben den hauptsächlich interessierenden molekularen Bewegungsabläufen auch eine Vielzahl weiterer Bewegungen auftreten, wie z.B. permanente, temperaturabhängige Fluktuationen, ist es hilfreich, übergeordnete Protein-

dynamiken durch mathematische Verfahren, wie z.B. *Essential Dynamics*⁸⁰, herauszufiltern. Für Untersuchungen des Konformationsraumes von Zielproteinen eignen sich bestimmte Cluster-Algorithmen, womit sich die verschiedenen Molekülkonformationen anhand ihrer jeweiligen Ähnlichkeit gruppieren lassen und einen Überblick über die Vielfalt potenzieller Proteinkonformationen geben. Nach einer derartigen Identifizierung und Sammlung können diese schließlich extrahiert werden und in Wirkstoffdesignprojekten als Templatstrukturen fungieren.

III Gezielte Stabilisierung einer neuen MD-generierten Bindetaschenkonformation der Aldose Reduktase

III.1 Das Modellsystem Aldose Reduktase

In der vorliegenden Arbeit diente das Enzym Aldose Reduktase aufgrund seiner ausgeprägten Proteinflexibilität als Modellsystem für hochflexible biologische Zielstrukturen. In den folgenden Abschnitten wird ein Überblick zu Klassifizierung, Struktur, biologischer Funktion, Bindetaschenflexibilität sowie bekannten Inhibitoren des Proteins gegeben.

III.1.1 Klassifizierung

Aldose Reduktase (EC 1.1.1.21, AKR1B1, ALR2 oder AR) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das als Monomer ubiquitär in nahezu allen humanen Geweben vorkommt und ein Molekulargewicht von ~36 kDa besitzt.⁸¹ Das Protein wurde erstmals 1956 von Hers *et al.*⁸² beschrieben und ist seitdem strukturell sehr gut charakterisiert worden. Bei der AR handelt es sich um eine Oxidoreduktase, die zu der Superfamilie der Aldo-Keto-Reduktasen gehört, genauer gesagt zu der AKR1B Subfamilie, den Säugetier Aldose Reduktasen.⁸³ Das Enzym katalysiert die Reduktion verschiedener aliphatischer und aromatischer Aldehyde zu den entsprechenden Alkoholen und benötigt für die Katalyse den Cofaktor NADPH, der bei der Reaktion als Hydrid-Donor fungiert.

III.1.2 Struktureller Aufbau der Aldose Reduktase

Erste Einblicke bezüglich des strukturellen Aufbaus der AR gelangen Rondeau *et al.* 1992 mit der Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse einer Proteinstruktur des Apoenzyms aus Schweinelinsen.⁸⁴ Noch im gleichen Jahr wurde auch die erste Kristallstruktur des Holozyms der humanen AR publiziert.⁸⁵ Seitdem konnten bis heute zahlreiche weitere Enzymstrukturen, u.a. diverser Protein-Ligand-Komplexe und unterschiedlicher Mutanten der AR, aufgeklärt werden. Mittlerweile wurden über 100 Proteinstrukturen in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt.

Die 315 Aminosäuren der humanen AR bilden ein $(\alpha/\beta)_8$ -TIM-Barrel aus, das zuerst bei der Triosephosphat-Isomerase entdeckt worden ist und daher nach diesem Enzym benannt wurde. Dieses Faltungsmuster setzt sich im Wesentlichen aus acht parallelen β -Faltblatt-

segmenten zusammen, die den Kern des Proteins bilden und miteinander durch acht parallele α -Helices verbunden sind, die wiederum antiparallel zu den β -Faltblättern verlaufen (siehe Abb. 1). Das aktive Zentrum ist in der Nähe des C-Terminus lokalisiert und wird durch drei Loopsegmente begrenzt. Der Cofaktor NADPH bindet in einer geradlinigen Konformation an das Enzym, wobei dessen Nikotinamidrest im Zentrum der fassartigen Struktur platziert wird und das katalytische Zentrum komplettiert.

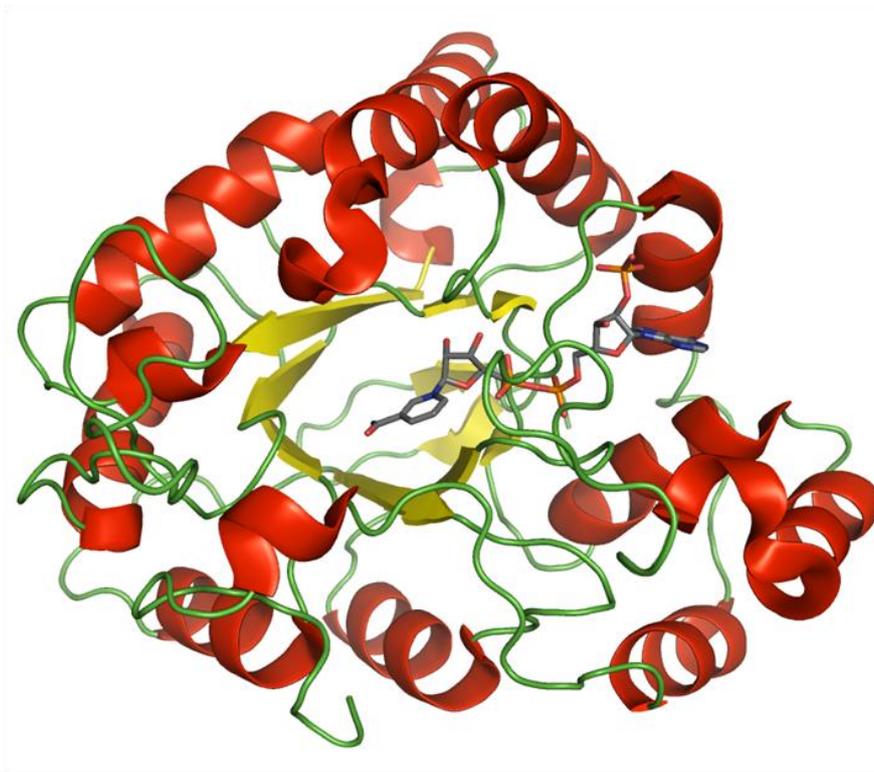


Abb. 1. Tertiärstruktur der AR. Acht α -Helices (rot) umranden acht zentrale β -Faltblätter (gelb), die den Kern des Proteins bilden. Die verbindenden Loopsegmente sind in grün dargestellt. Der Cofaktor NADPH ist im Stick-Modus vornehmlich in grau abgebildet, wobei die Kolorierung den jeweiligen Atomtypen entspricht.

Das aktive Zentrum der hAR besteht hauptsächlich aus 16 Aminosäuren, die eine elliptische Kavität ausbilden (siehe Abb. 2). Diese Bindetasche lässt sich wiederum in zwei Subtaschen mit unterschiedlich ausgeprägter Variabilität unterteilen, in einen konservierten Bereich, die sogenannte „Anionen-Bindetasche“ und in eine Region mit erhöhter Flexibilität, die „Spezifitätstasche“.^{86,87} Die Anionen-Bindetasche setzt sich aus den drei Aminosäuren Tyr48, His110 sowie Trp111 zusammen und ist in Verbindung mit dem Nikotinamidrest des Cofaktors NADPH für die Bindung bestimmter funktioneller Gruppen verantwortlich und direkt an der Katalyse beteiligt. Komplettiert wird diese Region durch Trp20 und Val47. Die überwiegend hydrophobe Spezifitätstasche besteht hingegen aus den sieben Aminosäuren

Trp79, Thr113, Phe115, Phe122, Trp219, Cys303, Tyr309 sowie dem Proteinsegment Val297-Leu300.

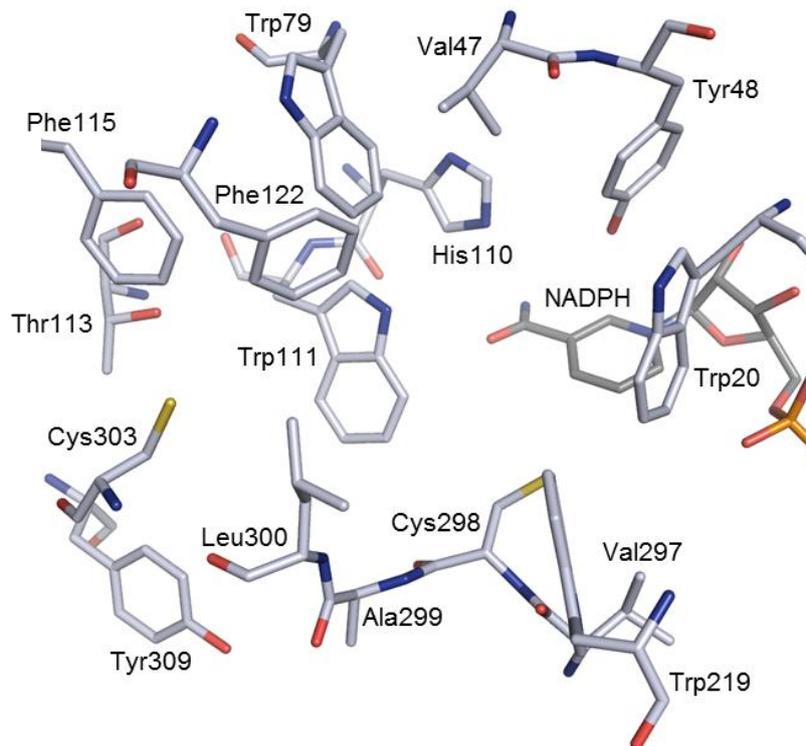


Abb. 2. Darstellung der unmittelbaren Bindetasche der AR mit dem Cofaktor NADPH (PDB-Code 1Z89).

III.1.3 Katalytischer Mechanismus

Aldose Reduktase katalysiert mit Hilfe des Cofaktors NADPH die Reduktion verschiedenster Aldehyde zu den entsprechenden Alkoholen. Bei der Katalyse wird zunächst ein Hydridion vom C4-Atom des Nikotinamids vom NADPH auf das Carbonylkohlenstoffatom der Aldehydfunktion übertragen. Für eine vollständige Reduktion zum Alkohol kommt es anschließend zu einer Protonenübertragung von einer der Aminosäuren des aktiven Zentrums auf das jeweilige Substrat.

Für die Katalyse binden die beteiligten Moleküle nacheinander an das Protein. Dabei kommt es zuerst zur Ausbildung des Enzym-Cofaktor-Komplexes einhergehend mit größeren strukturellen Veränderungen in einem Proteinbereich, der als „*cofactor safety belt*“ (Sicherheitsgurt des Cofaktors) bezeichnet wird und dementsprechend der Fixierung des NADPH dient.^{88,89}

Anschließend erfolgt die Substratbindung unter Entstehung des ternären Komplexes vorwiegend durch die Ausbildung eines H-Brückennetzwerks zwischen dem Substrat und den Aminosäuren der katalytischen Subtasche Tyr48, His110 und Trp111.⁹⁰ Von welcher Aminosäure das zweite Proton stammt, das den Katalysemechanismus abschließt, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Eine detaillierte Modellvorstellung der zugrundeliegenden biochemischen Reaktionen lieferten Cachau *et al.* auf der Basis quantenchemischer Berechnungen.⁹¹ Demnach stammt das zweite Proton von Tyr48. Durch Polarisierung der Hydroxylgruppe von Tyr48 durch das benachbarte positiv geladene Lys77 kommt es zur Übertragung des Protons auf His110, das schließlich durch erneuten Protonentransfer für die Reduktion des Alkoholats verantwortlich ist. Die Hypothese von Tyr48 als Protonenquelle konnte sowohl durch kinetische als auch thermodynamische Analysen bekräftigt werden.^{92,93} Eine schematische Darstellung des postulierten Reduktionsmechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt.

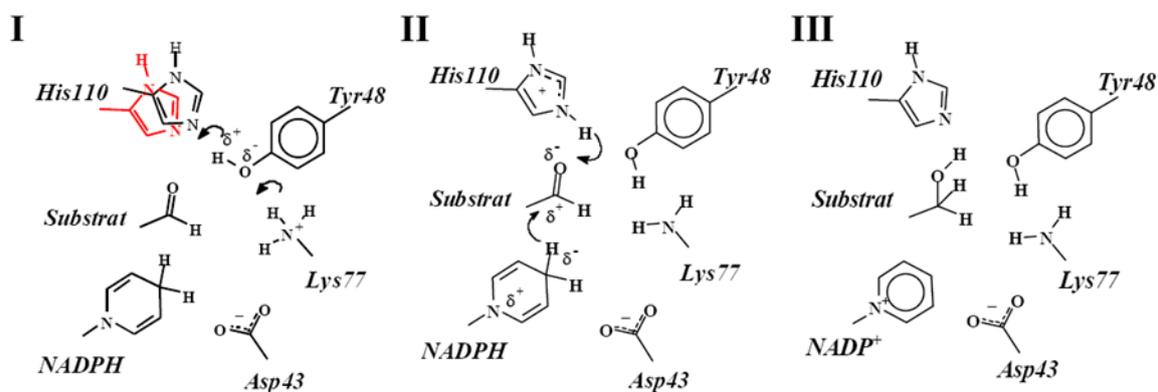


Abb. 3. Postulierter Reaktionsmechanismus der katalysierten Aldehydreduktion durch die AR. Modifiziert nach Cachau *et al.*⁹¹ mit freundlicher Genehmigung von EDP Sciences, Les Ulis Cedex A, Frankreich.

Nach erfolgter Reduktion und Produktfreisetzung ist der Austausch der oxidierten gegen die reduzierte Form des Cofaktors eine essenzielle Voraussetzung für eine erneute Katalyse. Die dafür notwendigen Konformationsänderungen, bei der die bei der NADPH-Bindung induzierten intrinsischen Umstrukturierungen rückgängig gemacht werden, stellt den langsamsten und dadurch geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Katalyseprozesses dar.^{89,94,95}

Eine Studie von Blakeley *et al.* lieferte 2008 eine erweiterte Modellvorstellung des Katalysemechanismus der AR (siehe Abb. 4).⁹⁶ Basierend auf den Ergebnissen hochaufgelöster Kristallstrukturen sowie Neutronendiffraktionsanalysen in Kombination mit quantenmechanischen/molekularmechanischen (QM/MM) Methoden, bekräftigte diese

Studie Tyr48 als Protonenquelle des zweiten Protons und beschreibt darüber hinaus den vermeintlich wichtigen Einfluss von Asp43 und Lys77 auf Tyr48 als ein entscheidendes Interaktionsmuster, das verantwortlich für die katalytischen Eigenschaften des Enzyms zu sein scheint. Beide Hypothesen stimmen überein, dass die initiale Hydridübertragung vom C4-Atom des NADPH Nikotinamidrings erfolgt. Im Unterschied zu dem erstgenannten Mechanismus dient jedoch Tyr48 nach den Erkenntnissen der Autoren nicht nur als Protonenquelle des für eine vollständige Reduktion benötigten Protons, sondern agiert auch als direkter Protonendonator. Eine Beteiligung von His110 bei der Protonenübertragung wird nicht beschrieben. Demzufolge liegt Tyr48 nach der Substratumsetzung in deprotonierter Form vor, was bereits durch weitere unabhängige Ergebnisse kalorimetrischer Untersuchungen belegt werden konnte.⁹⁷ Welcher der beiden postulierten Katalysemechanismen eher den realen Gegebenheiten entspricht, war zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht abschließend geklärt und verblieb als Ziel zukünftiger Forschungsarbeit.

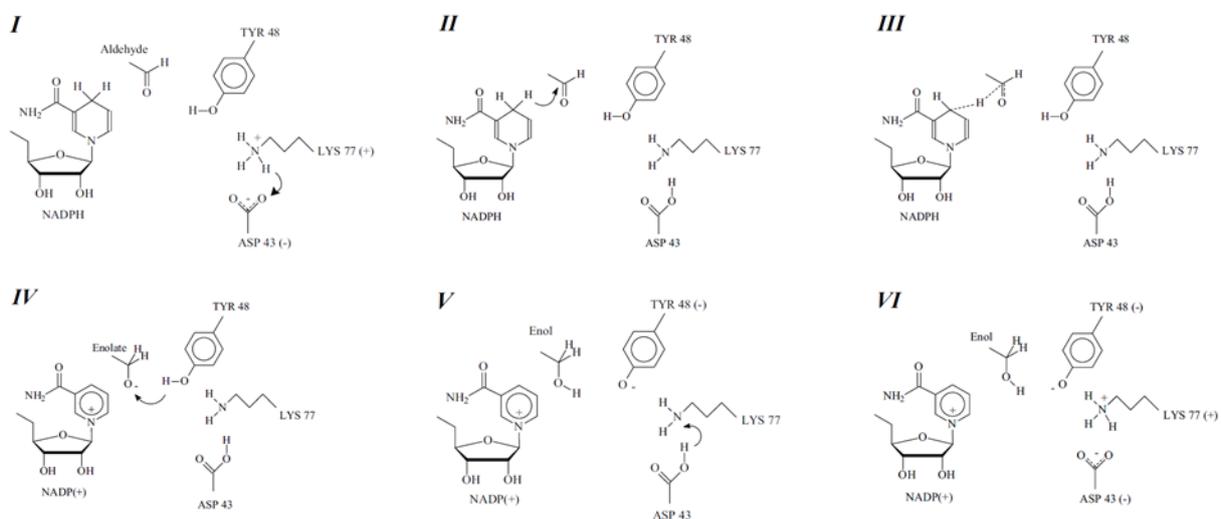


Abb. 4. Postulierter Reaktionsmechanismus der AR-katalysierten Reduktion von Aldehyden zu den entsprechenden Alkoholen. Modifiziert nach Blakeley *et al.*⁹⁶ mit freundlicher Genehmigung von PNAS, Washington, D.C., USA; Copyright (2008) National Academy of Sciences, USA.

III.1.4 Physiologische Bedeutung

Aldose Reduktase katalysiert die Reduktion verschiedener Aldehyde zu den entsprechenden Alkoholen und verfügt als ein äußerst promiskuitives Enzym über eine breite Substratspezifität, die sogar Steroide einschließt.^{98,99} Aufgrund seines breiten Substratspektrums und des nahezu ubiquitären Vorkommens im menschlichen Organismus ist das Protein an zahlreichen Stoffwechselwegen des endogenen Aldehyd-Metabolismus beteiligt. Obwohl die

physiologischen Funktionen der AR bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt wurden, konnte gezeigt werden, dass der AR je nach Gewebe eine unterschiedliche biologische Bedeutung zukommt.

Die höchste Konzentration des Proteins befindet sich im inneren Nierenmark.¹⁰⁰ Nach den Erkenntnissen diverser Studien besitzt die AR dort eine osmoregulatorische Aktivität und ist an der renalen Homöostase beteiligt.^{101,102} Die Produktion von intrazellulärem Sorbitol, als organischem Osmolyt, führt zu einem Ausgleich des osmotischen Drucks, verursacht durch extrazelluläres NaCl. Die resultierenden physiologischen Auswirkungen dieser Enzymfunktion in anderen Geweben sind derzeit noch unbekannt. Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien belegen jedoch eine gesteigerte Expression der AR als Antwort auf hyperosmotische Stressbedingungen.¹⁰³⁻¹⁰⁶

In der Samenblase ist AR an der Produktion von Fructose aus Glucose beteiligt, die den Spermien als Energiequelle dient.⁸² Aufgrund der katalysierten Reduktion bestimmter giftiger Aldehyde, wie beispielsweise dem zytotoxischen Methylglyoxal sowie dem hochreaktiven und mutagenen Acrolein, wird dem Enzym auch eine entgiftende Wirkung zugesprochen.^{98,107-110} Des Weiteren ist die AR sowohl am Steroid- als auch am Catecholamin-Metabolismus beteiligt, wie mehrere Studien zeigen.^{99,111-114}

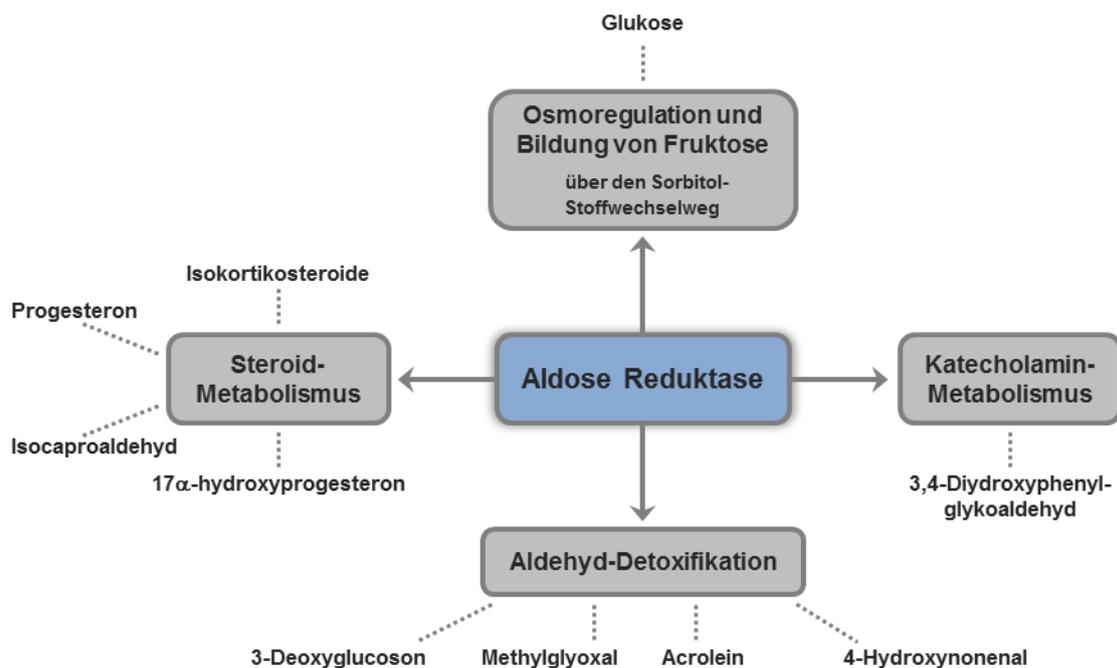


Abb. 5. Mutmaßliche physiologische Funktionen der AR. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Yabe-Nishimura⁹⁸ erstellt.

Für die beiden erstgenannten Funktionen der AR, der Bereitstellung von Sorbitol bzw. Fructose aus Glucose, ist die Beteiligung der AR am sogenannten Sorbitol-Stoffwechselweg von zentraler Bedeutung (siehe Abb. 6).¹¹⁵ Hierbei katalysiert die AR den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, die Reduktion von Glucose zu Sorbitol. Anschließend erfolgt eine Oxidation des Sorbitols zu Fructose durch das Enzym Sorbitol Dehydrogenase (SDH), wobei NAD^+ als Cofaktor dient.^{98,107,108} Nach diesen Erkenntnissen handelt es sich bei der AR ebenfalls um ein Enzym des Glucose-Stoffwechsels. Während das Protein in dieser Hinsicht bei normoglykämischen Blutzuckerwerten offensichtlich eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, ändert sich dies jedoch deutlich bei Hyperglykämie (siehe Abschnitt III.1.5).⁹⁸

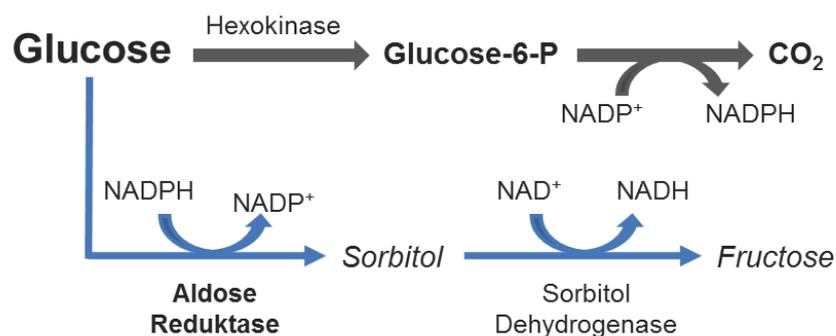


Abb. 6. Glucose-Metabolismus über den Sorbitol-Stoffwechselweg. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Yabe-Nishimura⁹⁸ erstellt.

III.1.5 Pathophysiologie: Bedeutung der Aldose Reduktase bei der Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen

Im menschlichen Organismus wird Glucose bei physiologischen Blutzuckerwerten zunächst, in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp, durch das Enzym Hexokinase bzw. Glucokinase in Glucose-6-phosphat umgewandelt. Das gebildete Glucose-6-phosphat wird anschließend durch Glykolyse oder den Pentosephosphatweg weiter umgesetzt. Aufgrund der niedrigeren Affinität der AR zur Glucose (K_m : 70 mM), im Vergleich zu den anderen beiden Enzymen, wird nur ein geringer Anteil der Glucose über den Sorbitol-Stoffwechselweg zu Fructose umgesetzt.¹¹⁶ Bei Hyperglykämie kommt es jedoch in Zellen mit insulinunabhängiger Glucoseaufnahme zu einer Sättigung der Hexokinasen, einhergehend mit einem gesteigerten Glucosemetabolismus über den AR katalysierten Sorbitol-Stoffwechselweg, wobei bis zu einem Drittel der verfügbaren Glucose umgesetzt wird.¹¹⁷

Durch eine häufige bzw. dauerhafte Verschiebung des Glucosestoffwechsels kommt es zwangsläufig zu Änderungen des Verhältnisses zwischen den Edukten und Produkten der zugrundeliegenden biochemischen Reaktionen. Welche genauen Konsequenzen eine derartige zelluläre Stoffwechsellageverschiebung auf einzelne Organe mit sich bringt, konnte trotz intensiver Untersuchungen zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Arbeit noch nicht abschließend geklärt werden. Es gilt jedoch als unumstritten, dass dem Sorbitol-Stoffwechselweg und damit der AR eine besondere Bedeutung bei der Entstehung diverser diabetischer Folgeerkrankungen, wie Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie, Katarakt und Angiopathie zukommt.^{118-124 98,119-124}

Über die möglichen Ursachen eines gesteigerten Sorbitol-Stoffwechselweges sowie deren Zusammenhang mit der Entstehung von diabetischen Folgeerkrankungen werden mehrere Hypothesen diskutiert. Als zentrale pathogenetische Faktoren stehen vor allem die Zunahme des oxidativen Stresses sowie, in geringerem Maße, die Entstehung osmotischer Stressbedingungen im Fokus.^{98,125,126}

Vor allem der Zunahme an oxidativem Stress wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen beigemessen. Aber wie kommt es durch eine verstärkte Aktivierung des Sorbitol-Stoffwechselweges zur Erzeugung oxidativer Stressbedingungen und welche Auswirkungen gehen damit einher? Ein Grund für die Zunahme oxidativer Stressbedingungen besteht in dem erhöhten Verbrauch der zellulären Vorräte an NADPH und NAD^+ , die bei diesem Metabolismus als Cofaktoren der AR bzw. der SDH benötigt werden. Da NADPH ebenso als Cofaktor der Glutathion Reduktase fungiert, einem Enzym, das für mehrere entscheidende Katalysen, wie der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich ist, kann es zu einer Einschränkung dessen enzymatischer Aktivität und folglich zu einer Verringerung des zellulären Glutathionspiegels kommen.¹²⁷ Bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies, z.B. von Wasserstoffperoxid, entsteht aus zwei Glutathionmonomeren Glutathiondisulfid, das anschließend durch die Glutathion Reduktase wieder zu zwei Glutathionmolekülen reduziert wird, damit es wieder für weitere Reaktionen zur Verfügung steht. Daher ist der Zellschutz vor oxidativem Stress bei gesteigerter Enzymaktivität der AR geschwächt.

Im zweiten Schritt des Sorbitol-Stoffwechselweges kommt es bei der Umsetzung von Sorbitol zu Fructose durch die SDH zur Reduzierung von NAD^+ zu NADH. Das NADH ist ein Substrat der NADH Oxidase, die wiederum zusätzliche ROS produziert.¹²⁸ Außerdem kommt es durch eine Verschiebung des NAD^+/NADH -Gleichgewichts zu einem Anstieg des mitochondrialen Protonengradienten, einhergehend mit einem vermehrten Elektronentransfer auf Sauerstoff, wodurch weitere reaktive Sauerstoffspezies entstehen.¹²⁹ Des Weiteren konnte

nachgewiesen werden, dass erhöhter oxidativer Stress endotheliale Zellschäden verursacht und dadurch an der Entstehung atherosklerotischer Folgeschäden beteiligt ist.¹³⁰

Durch die gesteigerte enzymatische Aktivität der AR und der vermehrten Umsetzung von Glucose zu Sorbitol kommt es, bedingt durch dessen geringe Zellpermeabilität, zu einer intrazellulären Anreicherung des polaren Metaboliten. Diese Problematik betrifft in erster Linie Zellen und Gewebe mit einem geringen Vorkommen der SDH, da das entstehende Sorbitol dort nicht ausreichend zu Fructose oxidiert werden kann. Die resultierende vermehrte zelluläre Wasseraufnahme führt zu einem Anstieg des osmotischen Drucks, der schließlich zu Zellschäden führen kann. Hinsichtlich der Entstehung des diabetischen Katarakts konnte dieser Effekt als entscheidender pathologischer Mechanismus identifiziert werden.¹³¹⁻¹³³ Unklar ist bisher jedoch, ob bzw. inwieweit dieser Mechanismus bei der Entstehung weiterer diabetischer Späterkrankungen beteiligt ist.

Auch die vermehrte Umsetzung von Glucose zu Fructose an sich ist kritisch, da die gebildete Fructose an der Entstehung glycosylierter Endprodukte (AGE) beteiligt ist. Dabei kommt es zu pathologischen Veränderungen von Proteinen, deren Funktionen durch entsprechende kovalente Modifikationen beeinträchtigt werden.¹³⁴⁻¹³⁶

Eine weitere pathologische Ursache bei der Entstehung Diabetes bedingter Spät-komplikationen besteht in der Beeinflussung bestimmter Kinase Kaskaden.¹³⁷ Bei erhöhten Blutzuckerwerten kann es zu einer vermehrten Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) kommen, die besonders an der Entwicklung von Gefäßerkrankungen beteiligt ist.^{138,139} Der Zusammenhang zwischen dem Sorbitol-Stoffwechselweg und einer Aktivierung der PKC besteht dabei im Diacylglycerol (DAG), das die Kinase aktiviert und dessen Konzentration in vielen Geweben bei Hyperglykämie erhöht ist.¹⁴⁰ Die erhöhte Fructosekonzentration in den Zellen ist ebenfalls an der Kinaseaktivierung beteiligt, da dessen Metabolite Vorstufen von DAG darstellen.¹⁴¹ Ebenfalls existieren Hinweise, dass die PKC durch oxidativen Stress aktiviert wird.¹⁴² Wie verschiedene Studien belegen, kann durch eine Inhibition der AR einer unter diabetischen Bedingungen erhöhten Aktivierung der PKC entgegengewirkt werden.^{143,144} Des Weiteren weisen experimentelle Beobachtungen auf eine Beteiligung einer Aktivitätserhöhung der p38-MAP Kinase als Ursache diabetischer Neuropathie hin.¹⁴⁵

Auf der Grundlage dieser Informationen kommt dem Sorbitol-Stoffwechselweg und damit der AR eine Schlüsselrolle in der Entstehung diabetischer Folgeschäden zu, weshalb die AR als potenzielle pharmakologische Zielstruktur in den Fokus des strukturbasierten Wirkstoffdesigns rückte. Die Ergebnisse von Studien liefern zudem deutliche Hinweise für eine Beteiligung der AR an inflammatorischen Erkrankungen, wie Sepsis, Asthma bronchiale, Uveitis und Krebserkrankungen, so dass Inhibitoren der AR auch für derartige Erkrankungen einen therapeutischen Nutzen haben könnten.¹⁴⁶

III.1.6 Inhibitoren der Aldose Reduktase

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung der AR wurde in der Vergangenheit bereits intensiv an der Identifizierung und Entwicklung potenzieller Wirkstoffkandidaten gearbeitet. Dank dieser Forschungsarbeit ist heute eine Vielzahl potenter Inhibitoren der AR (ARI) bekannt, die sich trotz struktureller Vielfalt anhand ihrer Konstitution bzw. ihrer hydrophilen Kopfgruppe in fünf Klassen unterteilen lassen:

- Carbonsäurederivate,
- zyklische Imide (Hydantoine),
- Pyridazinone,
- phenolische Verbindungen und
- Naturstoffe (z.B. Anthrachinone und Flavonoide).^{120,147,148}

Bei der Betrachtung dieser verschiedenen Molekülklassen stellt sich die Frage nach bestimmten Strukturmerkmalen, die niedermolekulare Verbindungen als grundlegende Voraussetzungen enthalten müssen, um an die AR zu binden und in weiterer Folge die Enzymfunktion zu hemmen. Eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Bindung eines Liganden ist das Vorhandensein einer geeigneten polaren Funktionalität, bestehend aus mindestens einer H-Brückenakzeptorfunktion, um innerhalb der Anionen-Bindetasche an das Makromolekül zu binden. Basierend auf den Erkenntnissen zahlreicher Kristallstrukturen von AR-Inhibitor-Komplexen lässt sich zusammenfassen, dass alle bekannten Vertreter durch spezifische Bindung an das aktive Zentrum hemmen. Diese Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Liganden mit den nativen Substraten um dieselbe Bindestelle konkurrieren, was einem kompetitiven Inhibitionsmechanismus entspricht. Für die Carbonsäurederivate ist jedoch bekannt, dass diese die katalytische Reduktion von Aldehyds substraten nicht-kompetitiv hemmen, wie anhand des Inhibitors Alrestatin experimentell gezeigt werden konnte.¹⁴⁹ Die Bindung an den binären AR-NADP⁺-Komplex erfolgt also erst nach der Reduktion des Substrats und der Freisetzung des Produkts. Diese Erkenntnis wird durch die mit 0,66 Å sehr hochaufgelöste Kristallstruktur 1US0 des AR-IDD594-Komplexes bekräftigt, bei der sogar einzelne Protonierungszustände kristallographisch zugeordnet werden konnten.⁴⁰ Aus diesem Grund scheinen, falls dieser Inhibitionsmechanismus sich auch auf die anderen Substanzklassen übertragen lässt, wie der Name Anionen-Bindetasche andeutet, negativ geladene Ankergruppen von Vorteil zu sein. Derartige anionische Substrukturen können neben den notwendigen H-Brücken

zusätzlich elektrostatische Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen Nikotinamidrest des NADP⁺ ausbilden und dabei zu einer höheren Bindungsaffinität beitragen.

Neben einer hydrophilen Kopfgruppe besteht die Mehrzahl der ARI aus einem Linkersegment, welches die Ankergruppe mit einem vorzugsweise aromatischen Ringsystem verbindet. Die größte Ausnahme diesbezüglich stellen die Hydantoinverbindungen dar, bei denen die Kopfgruppe häufig in Form einer Spiroverbindung direkt an das Ringsystem gebunden ist. In Abbildung 7 sind die Strukturformeln bekannter Vertreter verschiedener Inhibitorclassen der AR dargestellt. Eine detaillierte Analyse auftretender Protein-Ligand-Wechselwirkungen findet sich in Abschnitt III.4.2.1.1.

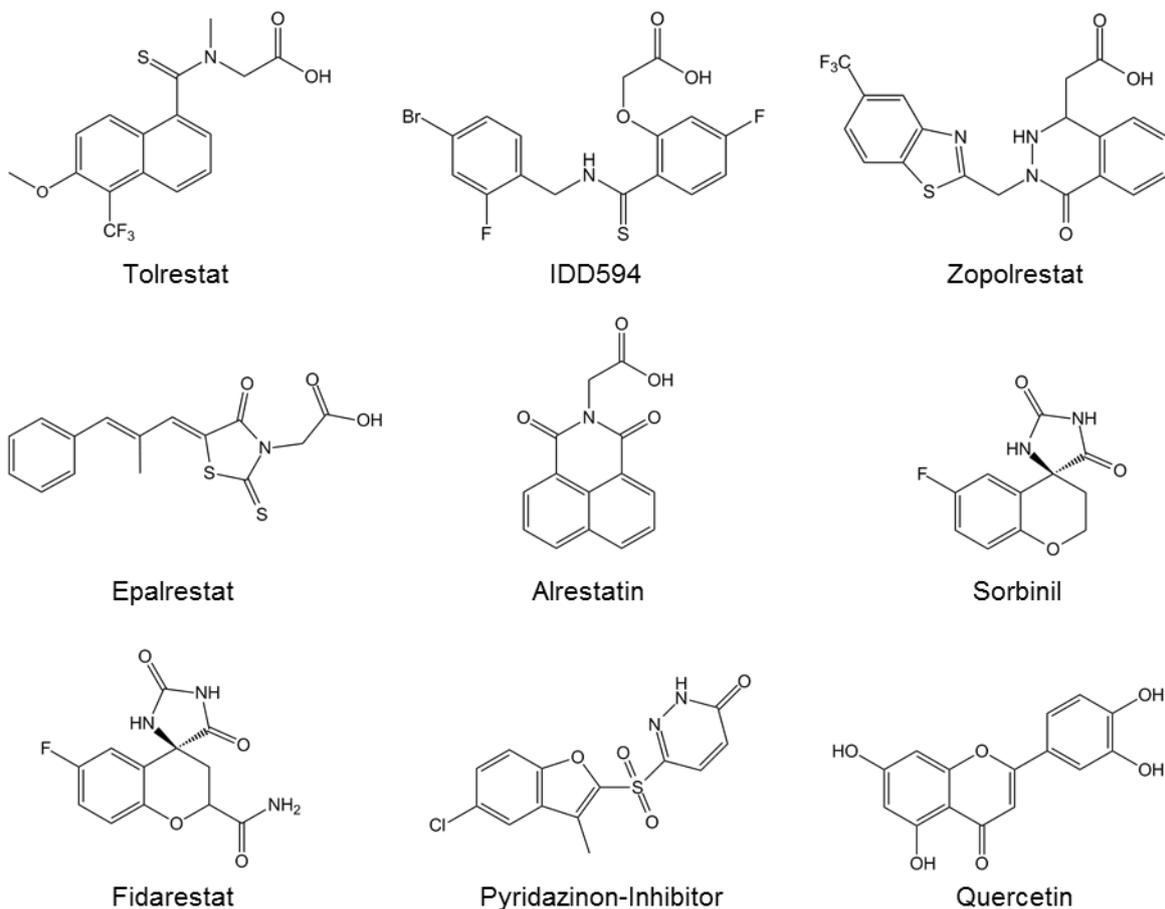


Abb. 7. Strukturformeln von AR-Inhibitoren verschiedener Substanzklassen.

Für die Entfaltung der pharmakodynamischen Wirkung spielen weiterhin die Bioverfügbarkeit sowie die physiko-chemischen Eigenschaften der Inhibitoren eine entscheidende Rolle. Während sowohl die Carbonsäurederivate, als auch die Hydantoinverbindungen vielversprechende Aktivitäten in *in vitro* Assays zeigen, besitzen die Hydantoinverbindungen ein vergleichsweise höheres inhibitorisches Potenzial in *in vivo* Experimenten. Diese Beobachtungen

lassen sich anhand der unterschiedlichen Azidität der beiden Kopfgruppen erklären. Bei physiologischen pH-Werten liegen die Carbonsäuregruppen aufgrund ihrer niedrigen pK_s -Werte nahezu vollständig in deprotonierter Form, als Anionen, vor. Diese Polarität verringert ihre Fähigkeit, biologische Membranen zu passieren. Im Gegensatz dazu liegen die pK_s -Werte von zyklischen Imiden bei ~ 9 , weshalb sowohl die deprotonierte als auch die protonierte Form in erheblichem Umfang *in vivo* vorliegen.¹⁵⁰ Hinsichtlich der Wasserlöslichkeit sind auch die in der Mehrzahl der ARI vorkommenden aromatischen Ringsysteme kritisch zu betrachten, da diese, ohne entsprechende Dekoration mit hydrophilen Substituenten, verantwortlich für eine geringe Wasserlöslichkeit sein können.

Die Resultate mehrerer *in vitro* sowie *in vivo* Studien diverser ARIs in unterschiedlichen Modellsystemen, z.B. unter hyperglykämischen Bedingungen, suggerieren einen deutlichen Nutzen einer therapeutischen Anwendung von Inhibitoren der AR.^{122,148,151-154} Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet und vielfacher Wirkstoffdesignstudien wurde bisher nur ein Inhibitor der AR, der Carboxylat-Inhibitor Epalrestat, als ARI zur Marktreife gebracht und in Japan zur Behandlung der diabetischen Neuropathie zugelassen.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Alle weiteren ARIs scheiterten während der klinischen Prüfung entweder aufgrund mangelhafter pharmakologischer Effizienz oder schwerwiegender Nebenwirkungen.^{120,152,158,159}

Aus diesem Grund besteht weiterhin der Bedarf an neuen Wirkstoffkandidaten, um die Entstehung sowie das Ausmaß möglicher Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus und möglicherweise auch inflammatorischer Erkrankungen zu verhindern bzw. zu reduzieren. Da Nebenwirkungen häufig durch ungewollte Interaktionen des Wirkstoffs mit anderen Proteinen entstehen, sollte bei der Entwicklung von Inhibitoren besonders an einer verbesserten Spezifität gegenüber der AR gearbeitet werden, um eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen.

III.1.7 Bindetaschenflexibilität und Bindetaschenformen der Aldose Reduktase

Die physiologische Aufgabe von Enzymen besteht in der Katalyse biochemischer Reaktionen durch Erniedrigung der Aktivierungsenergien. Dabei unterliegt das Makromolekül während Substratbindung, Katalyse und Produktfreisetzung strukturellen Veränderungen. Bei Enzymen handelt es sich demnach um dynamische Systeme, deren intrinsische Flexibilität essenzielle Voraussetzung für die Ausübung ihrer biologischen Funktionen ist. Die AR repräsentiert ein Protein mit einer ausgeprägten Anpassungsfähigkeit im Bereich der Bindetasche, worauf die hohe Substratpromiskuität zurückzuführen ist.

Die Vielzahl an verfügbaren Kristallstrukturen der AR, sowohl vom Holoenzym als auch von verschiedenen Protein-Ligand-Komplexen, ermöglichte umfassende Untersuchungen der Bindetaschenflexibilität. Eine Studie, die sich mit dieser Thematik auf der Grundlage einer vergleichenden Kristallstrukturanalyse in Kombination mit MD Simulationen beschäftigte, lieferte umfangreiche Einblicke.⁸⁷

Das aktive Zentrum der AR besitzt hinsichtlich der Flexibilität einzelner Aminosäuren einen dualen Charakter, bestehend aus einer rigiden, konstanten Subtasche, der Anionen-Bindetasche, und einem Bereich erhöhter Flexibilität, der Spezifitätstasche. Der Flexibilitätsgrad aller Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche kann Abbildung 8 entnommen werden.

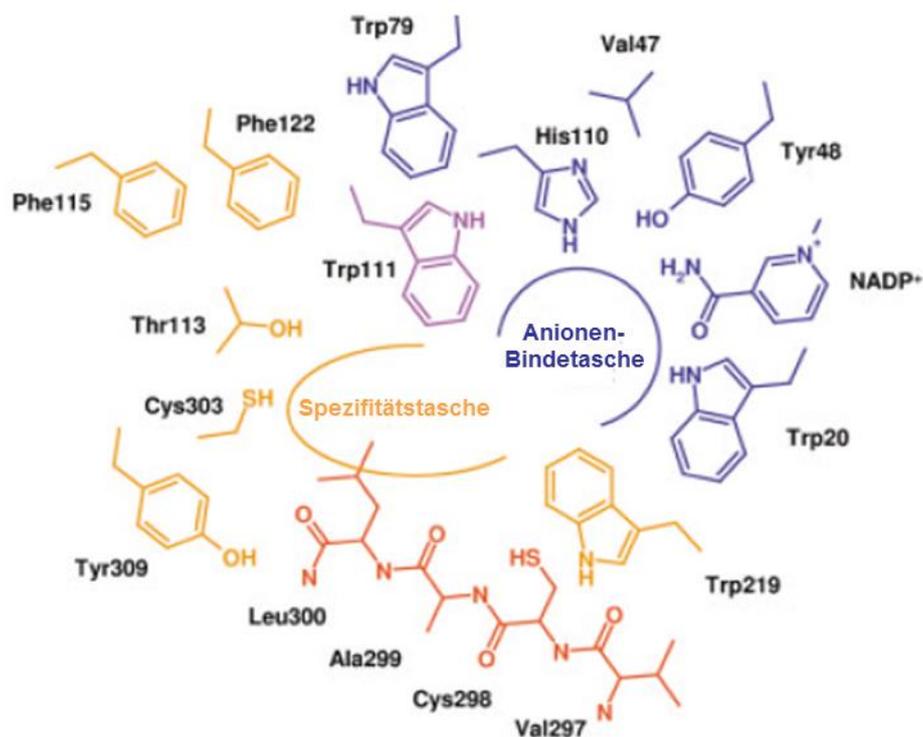


Abb. 8. Schematische Darstellung der unmittelbaren Bindetasche der AR, koloriert nach dem jeweiligen Flexibilitätsgrad. Rigide Aminosäuren sind in blau, sehr variable Reste in rot dargestellt. Modifiziert nach Sottriffer *et al.*⁸⁷ mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

Die ausgeprägten adaptiven Effekte der Bindetasche während der Ligandenbindung werden nur von ungefähr einem Drittel aller Aminosäuren der Bindetasche vermittelt, die ausschließlich innerhalb der Spezifitätstasche lokalisiert sind. Eine entscheidende Rolle kommt dabei dem hochflexiblen Proteinsegment Val297-Leu300 zu. Besonders Leu300, das von allen 16 Resten der unmittelbaren Bindetasche die größte Flexibilität aufweist, hat wesentlichen Einfluss auf die Morphologie der Bindetasche. Je nach Konformation und

Orientierung der Seitenkette vermag Leu300 den Zugang zur Spezifitätstasche zu öffnen oder zu verschließen, weshalb Leu300 eine Funktion als eine Art „Gatekeeper“ zukommt (siehe Abb. 9).

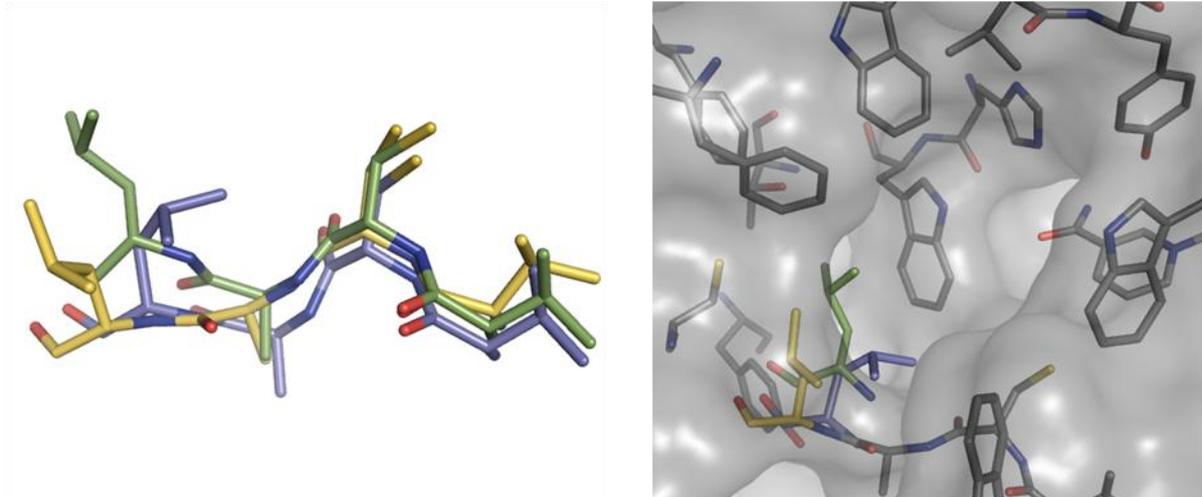


Abb. 9. Konformationsvergleich der Aminosäuren des hochflexiblen Proteinsegments Val297-Leu300 der drei Kristallstrukturen 1AH0 (grün), 1AH3 (blau) sowie 1US0 (gelb). Darstellung der Bindetasche mit geöffneter Spezifitätstasche der Kristallstruktur 1US0 (grau) mit den überlagerten Leu300-Konformationen der beiden anderen Proteinstrukturen (1AH0 und 1AH3).

Zum Zeitpunkt der Arbeit wurde zwischen drei verschiedenen Hauptkonformationen der Bindetasche unterschieden, die sich aus einer Konformation mit geschlossener Spezifitätstasche und zwei Bindetaschenformen mit geöffneter Spezifitätstasche zusammensetzen (siehe Abb. 10).

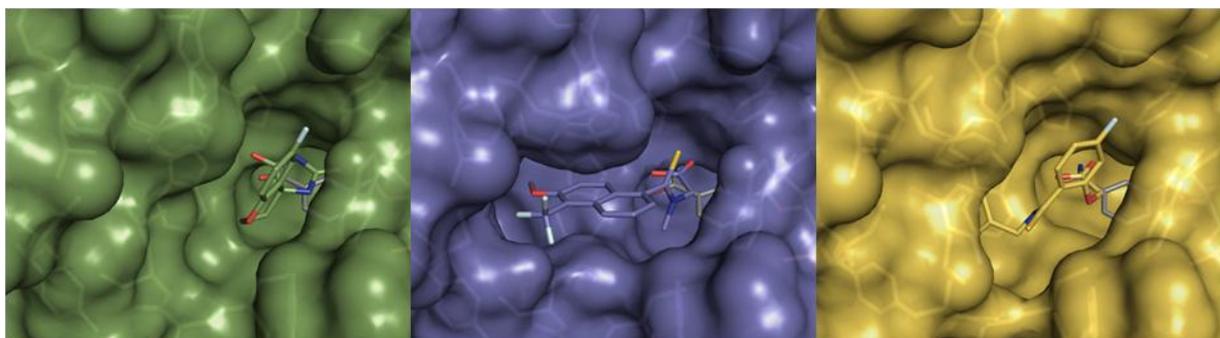


Abb. 10. Vergleichende Darstellung der drei bekannten Bindetaschenkonformationen der AR. Dargestellt sind die Kristallstrukturen der Komplexe der AR mit Sorbiniol (1AH0, grün), Tolrestat (1AH3, blau) und IDD594 (1US0, gelb).

Bei der „Holo“-Konformation der AR, z.B. mit dem PDB-Code 1ADS, bei der kein Ligand gebunden ist, ist das Volumen der Bindetasche gegenüber den anderen beiden Formen

deutlich verkleinert, da die Seitenkette von Leu300 in Richtung Trp79 ragt und dadurch die Spezifitätstasche verschließt. Diese Bindetaschenform kommt jedoch nicht nur bei Kristallstrukturen des Holoenzym vor, sondern ist ebenso bei einigen Strukturen von AR-Ligand-Komplexen zu finden, wie beispielsweise dem AR-Sorbinil-Komplex (1AH0). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Form der Bindetasche als „1AH0“-Konformation bezeichnet.

Die Beobachtung, dass auch die Proteinkonformation mit geschlossener Spezifitätstasche eine kompatible Bindetasche darstellt, also einer Ligandenbindung zugänglich ist und adressiert werden kann, zeigt, dass „*induced fit*“-Effekte keine notwendige Bedingung für eine Ligandenbindung an die AR darstellen. Das Auftreten struktureller Anpassungen hängt vielmehr von der Konstitution und den jeweiligen physiko-chemischen Eigenschaften des gebundenen Liganden ab. So kommt es bei größeren Bindungspartnern, wie z.B. Tolrestat (1AH3) und IDD594 (1US0), aufgrund des erhöhten Platzbedarfs zu einer Öffnung der Spezifitätstasche. Aufgrund der unterschiedlichen Bindemodi, die diese Inhibitoren einnehmen, resultieren verschiedene Morphologien, welche die beiden anderen Hauptformen der Bindetasche, die „1AH3“-Konformation sowie die „1US0“-Konformation, darstellen.

Welche genauen biochemischen Zusammenhänge bei den beobachteten strukturellen Effekten eine wesentliche Rolle spielen, kann trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet noch immer nicht vollständig beantwortet werden. Somit kommt es gelegentlich zu unerwarteten Ergebnissen in Bezug auf die resultierenden Bindetaschenkonformationen neu entwickelter Liganden, deren Kristallstrukturen mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt worden sind. Aus diesem Grund sollten auch weiterhin intensiv Fragestellungen hinsichtlich ausgeprägter Proteinflexibilität an diesem Enzym als Modellsystem untersucht werden, um in Zukunft die genauen Ursachen und Mechanismen verstehen sowie korrekte Vorhersagen machen zu können.

III.2 Aufgabenstellung

Die Zielsetzung des ersten Teils der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Aussagekraft von Proteinkonformationen, die durch Molekulardynamik Simulationen generiert wurden, anhand der Zielstruktur Aldose Reduktase zu untersuchen, einhergehend mit einer Überprüfung der prinzipiellen Eignung MD-generierter Proteinkonformationen als Template bei struktur-basierten Wirkstoffdesignstudien. In diesem Zusammenhang galt es insbesondere zu untersuchen, ob die erzeugten Proteinstrukturen der Realität entsprechen, tatsächlich existieren und adressierbar sind oder ob es sich dabei lediglich um artifizielle Strukturen handelt. Dieser Teil der hier präsentierten Arbeit kann daher als eine Art *Proof-of-Concept* der etablierten Methodik, MD-generierte Proteinkonformationen für strukturbasierte Wirkstoffentwicklung zu nutzen, betrachtet werden.

Für die Erfüllung dieser Zielsetzung wurde eine virtuelle Suche nach neuen Liganden der AR durchgeführt, die als Inhibitoren fungieren und eine neuartige, mit Hilfe von MD Simulationen generierte Bindetaschenkonformation gezielt adressieren. Durch die beabsichtigte Stabilisierung dieser neuen Konformation, die zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht experimentell nachgewiesen werden konnte, sollte diese Bindetaschenform der Kristallisation in Verbindung mit anschließender Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse zugänglich gemacht werden. Im Rahmen des durchgeführten virtuellen Screeningverfahrens wurden zwei unterschiedliche Strategien in Form eines protein- und eines ligandbasierten Ansatzes verfolgt, wobei verschiedene Methoden und Verfahren aus dem Bereich des computergestützten Wirkstoffdesigns genutzt wurden.

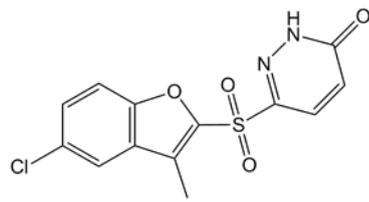
III.3 Hintergrundinformationen

Die vorliegende Arbeit basiert auf Erkenntnissen und Hypothesen der Dissertation von M. Zentgraf¹⁶⁰. In diesem Abschnitt werden alle für die vorliegende Dissertation entscheidenden Informationen zusammengefasst, um einen Überblick über die Ausgangssituation zu geben.

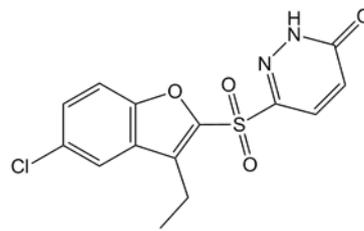
Die Dissertation von M. Zentgraf beschäftigt sich unter anderem mit der Bindetaschenflexibilität der Aldose Reduktase und den resultierenden Auswirkungen auf das strukturbasierte Wirkstoffdesign. Eine zentrale Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand in einer Studie zur Untersuchung des Konformationsraumes der Aminosäuren des aktiven Zentrums und der jeweiligen Folgen für die Morphologie der Bindetasche. Gegenstand der Studie war eine Kristallstrukturanalyse sowie eine vergleichende Analyse von zehn MD Simulationen.

Im Verlauf der Analysen der durchgeführten MD Simulationen konnte eine neuartige Bindetaschenkonformation identifiziert werden, bei der die Spezifitätstasche durch zwei zusätzlich entstandene Subtaschen erheblich erweitert wird. Eine detaillierte Darstellung der neuen Bindetaschenform findet sich in Abschnitt III.3.1. Extrahiert wurde die neue Enzymkonformation, die zudem die Zielstruktur der vorliegenden Arbeit darstellt, aus der MD Simulation des Komplexes, bestehend aus AR und einem hochaffinen Pyridazinon-Inhibitor (Molekül **1**, PDB-Code 1Z89).^{148,161} Weiterhin wurde bereits von M. Zentgraf der Versuch unternommen, neue Inhibitoren der AR zu entwickeln, die diese MD-generierte Bindetaschenkonformation für eine experimentelle Bestimmung stabilisieren sollten, was im Rahmen seiner Arbeit aus mehreren Gründen, u.a. der Synthese von nur einer der acht vorgeschlagenen Verbindungen, noch nicht gelang.

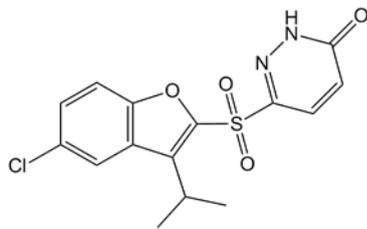
In diesem Zusammenhang sei auch eine von Mylari *et al.* 2005 publizierte Serie weiterer Pyridazinon-Inhibitoren der AR erwähnt, zu der auch der im simulierten Komplex gebundene Ligand **1** gehörte.¹⁶² Die Serie beinhaltet zusätzliche Informationen hinsichtlich weiterer Liganden (siehe Abb. 11 Moleküle **2**, **3** und **4**), die über sterisch anspruchsvollere hydrophobe Substituenten anstelle der Methylgruppe des Liganden **1** verfügen. Für die Moleküle **2-4** wurde bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit noch keine Kristallstruktur bestimmt und publiziert.



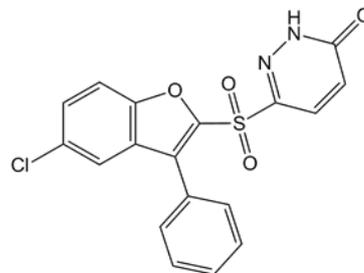
1 IC₅₀: 1 nM



2 IC₅₀: 6 nM



3 IC₅₀: 92 nM



4 IC₅₀: 34 nM

Abb. 11. Strukturformeln von vier potenten Pyridazinon-Inhibitoren der AR. Die angegebenen IC₅₀-Werte stammen aus der Publikation von Mylari *et al.* von 2005.¹⁶²

M. Zentgraf fokussierte sich außerdem in seiner Arbeit auf das Phenyl-Derivat **4**, dessen Bindemodus nicht mit dem des ursprünglich in der Kristallstruktur 1Z89 vorliegenden Methyl-Derivats **1** bzw. generell nicht mit der Bindetaschenkonformation zu vereinbaren schien, da zwangsläufig erhebliche Zusammenstöße zwischen dem Phenylring und den Aminosäuren Cys298/Ala299 bzw. Trp79 und Phe122 resultieren würden (siehe Abb. 12).

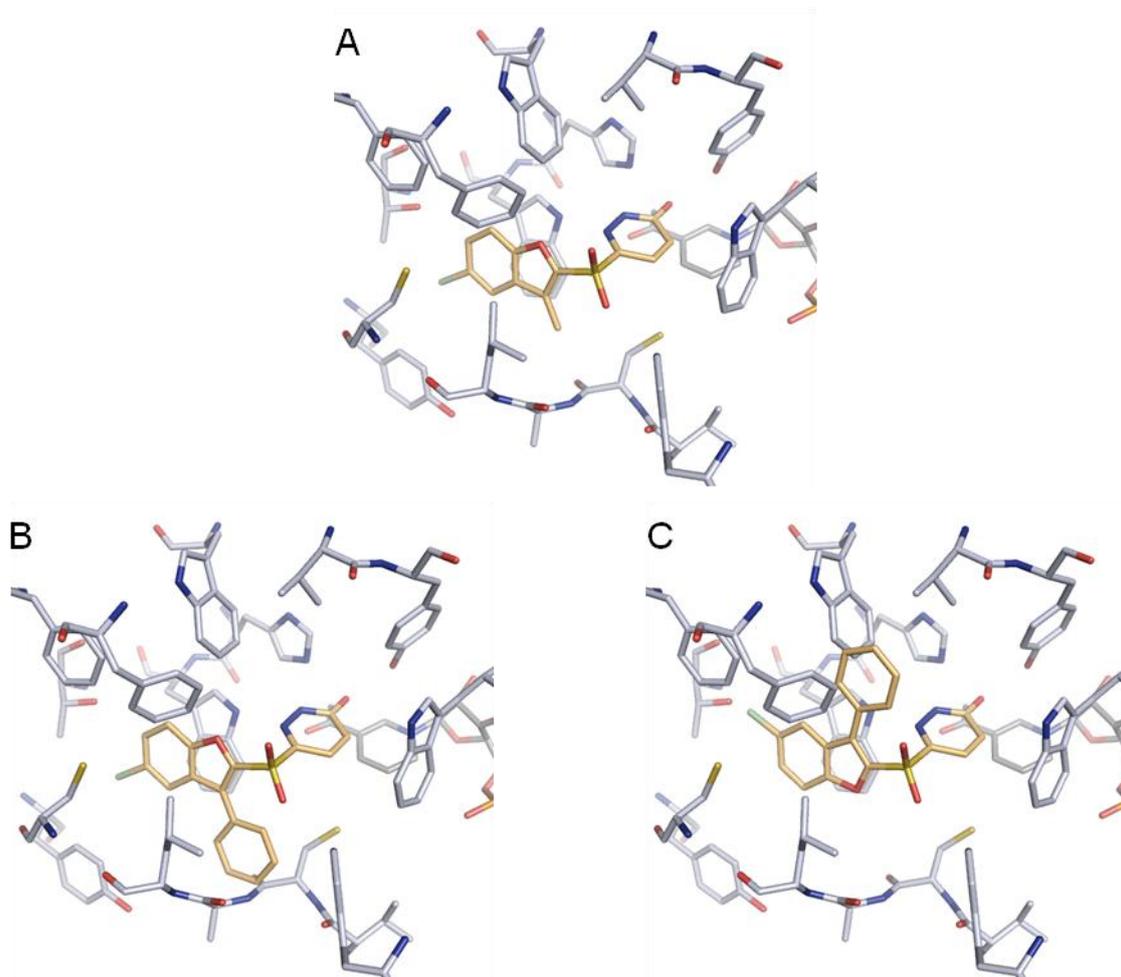


Abb. 12. Darstellung der Bindetasche der Kristallstruktur 1Z89 mit gebundenem Methyl-Derivat **1** (**A**) sowie von zwei hypothetischen Bindemodi des Phenyl-Derivats **4**. Zur Veranschaulichung wurde die Methyl-Gruppe (von Ligand **1**) durch den Phenylring von Molekül **4** innerhalb der Kristallstruktur ersetzt, wodurch es zu offensichtlichen Zusammenstößen (*Clashes*) zwischen Ligand und dem Proteinrückgrat (Cys298/Ala299) kommt (**B**). **C** zeigt einen alternativen Bindemodus von Verbindung **4**, bei dem das aromatische Ringsystem in einer durch Rotation um 180° erhaltenen umgeklappten Orientierung vorliegt und der Phenylring in Richtung Trp79 und Phe122 zeigt, womit ebenfalls intermolekulare Zusammenstöße einhergehen würden.

Um für diese Verbindung einen potenziellen Bindungsmodus sowie eine geeignete Bindetaschenkonformation der AR zu identifizieren, wurden verschiedene Dockingstudien durchgeführt. So wurde das Phenyl-Derivat mit *AutoDock3.0* in die drei Haupt-Bindetaschenkonformationen 1AH0, 1AH3 und 1US0 mittels *in situ* Cross-Dockingsimulationen gedockt. Dabei konnten jedoch keine plausiblen Bindemodi, die die bekannten Interaktionsmuster bisheriger ARIs aufwiesen, gefunden werden.

Weiterhin wurde Verbindung **4** in die Kristallstruktur von Verbindung **1** (1Z89) gedockt, wofür ein möglicher Bindemodus gefunden werden konnte, der mit bisher bekannten Bindeposen zu vereinbaren wäre. Nach M. Zentgraf wären allerdings aufgrund einiger auftretender zu geringer Distanzabstände zwischen Protein und Ligand, u.a. zwischen dem Phenylring und

Atomen der Aminosäuren Cys298/Ala299, für eine tatsächliche Bindung einige strukturelle Anpassungen seitens des Enzyms notwendig.

Abschließend wurde für das Phenyl-Derivat mit Hilfe von Dockingsimulationen nach potenziellen Bindemodi innerhalb der Bindetasche der MD-generierten Proteinkonformation gesucht. Hierbei konnte ebenfalls ein sinnvoller Bindungsmodus von dem Programm *AutoDock3.0* berechnet werden, der der Dockinglösung für die Kristallstruktur 1Z89 ähnelte, bei dem jedoch aufgrund des zusätzlich verfügbaren Volumens der zwei Subtaschen keine zu kurzen Protein-Ligand Atomabstände zu beobachten waren. Daher erschien diese Proteinkonformation für die Aufnahme des Phenyl-Inhibitors geeigneter als die Kristallstruktur 1Z89 bzw. als eine der drei bereits bekannten Bindetaschenformen zu sein. Auf der Grundlage der beschriebenen Beobachtungen postulierte M. Zentgraf die Hypothese, dass das Derivat **4** möglicherweise in der Lage sei, die neue Subtasche, die sich zwischen dem flexiblen Proteinsegment Val297–Leu300 und Tyr309 befindet, zu adressieren und zu stabilisieren.

Des Weiteren versuchte M. Zentgraf bereits Inhibitoren der AR zu entwickeln, die die beiden neuen Subtaschen der MD-generierten Proteinkonformation adressieren sollten. Um dieses Ziel zu erreichen wurden acht niedermolekulare Verbindungen vorgeschlagen, die alle über ein Benzodiazepin-Grundgerüst und eine Carboxylat-Ankergruppe verfügten. Eines der acht Moleküle wurde während seiner Promotionszeit synthetisiert und dessen inhibitorische Aktivität experimentell bestimmt. Das Molekül besaß jedoch mit einem gemessenen IC_{50} -Wert von $\sim 700 \mu\text{M}$ nur eine sehr geringe Aktivität bzw. Affinität. Bis zum Zeitpunkt der Arbeit ist keine entsprechende Proteinstruktur der AR veröffentlicht worden, die die potenzielle, MD-generierte Bindetaschenform zeigt und die von M. Zentgraf aufgestellte Hypothese belegt.

III.3.1 Charakterisierung der MD-generierten Bindetaschenkonformation

Die zu stabilisierende Proteinkonformation, die die Templatstruktur dieser Arbeit darstellt, wurde während einer MD Simulation der Kristallstruktur 1Z89 generiert, in der die humane AR als Komplex mit einem hochaffinen Pyridazinon-Inhibitor (Molekül **1**) vorliegt. Die neue Bindetaschenform dieser Struktur zeichnet sich durch eine offene Spezifitätstasche aus und ähnelt weitestgehend der Bindetasche der Kristallstruktur 1US0. Diese Tatsache ist nicht verwunderlich, da die Ausgangsstruktur 1Z89 auf der die MD Simulation basierte, sich sehr gut mit der Proteinstruktur 1US0 überlagern lässt und nur äußerst marginale Unterschiede

existieren. Diese Beobachtung lässt sich mit einem gemessenen RMSD-Wert von nur 0,53 Å bezüglich der 16 Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche belegen.

Die neue Bindetaschenkonformation weist im Vergleich zu den kristallographisch bestimmten Proteinstrukturen 1US0 bzw. 1Z89 im Wesentlichen drei charakteristische Unterschiede auf, die die Aminosäuren Trp219, Phe122 sowie den Bereich zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 betreffen (siehe Abb. 13 A). Geprägt wird die Morphologie dieser Bindetasche vor allem durch die Existenz zweier Subtaschen, die das Bindetaschenvolumen erheblich vergrößern und Liganden zusätzlichen Raum zur Verfügung stellen könnten. Durch ein Umklappen von Phe122 bildet sich im Bereich der Spezifitätstasche oberhalb der Ligandenbindestelle eine hydrophobe Subtasche aus, welche durch die Seitenketten der drei Aminosäuren Trp79, Phe115 und Phe122 begrenzt wird. Die zweite und für diese Arbeit entscheidende Subtasche ist in dem Bereich zwischen Tyr309 und der C-terminalen, hochflexiblen Loopregion Cys298-Leu300 lokalisiert (siehe Abb. 13 B). Durch eine konzertierte Bewegung der beteiligten Aminosäuren, einer Verschiebung des variablen Peptidrückgrats (Cys298-Leu300) in Richtung Trp219 und einer entgegen gerichteten Verschiebung des Tyr309 kommt es innerhalb der Spezifitätstasche zu einer Aufweitung des Bereichs unterhalb der Ligandenbindestelle. Um die beschriebenen Beobachtungen mit Messwerten belegen zu können, wurden die Distanzen zwischen der Tyr309 Hydroxylgruppe und dem C_α-Atom von Ala299 und Leu300 sowohl innerhalb der Ausgangsstruktur 1Z89, als auch innerhalb der neuen Konformation ermittelt. Im Fall der „1Z89“-Konformation betragen die Abstände 4,07 Å (Tyr309-Ala299) bzw. 4,72 Å (Tyr309-Leu300), wohingegen die entsprechenden Abstände der MD-generierten Bindetaschenkonformation deutlich größer sind und bei 6,90 Å (Tyr309-Ala299) bzw. 6,41 Å (Tyr309-Leu300) liegen, was einer Differenz von 2,83 Å bzw. 1,69 Å entspricht.

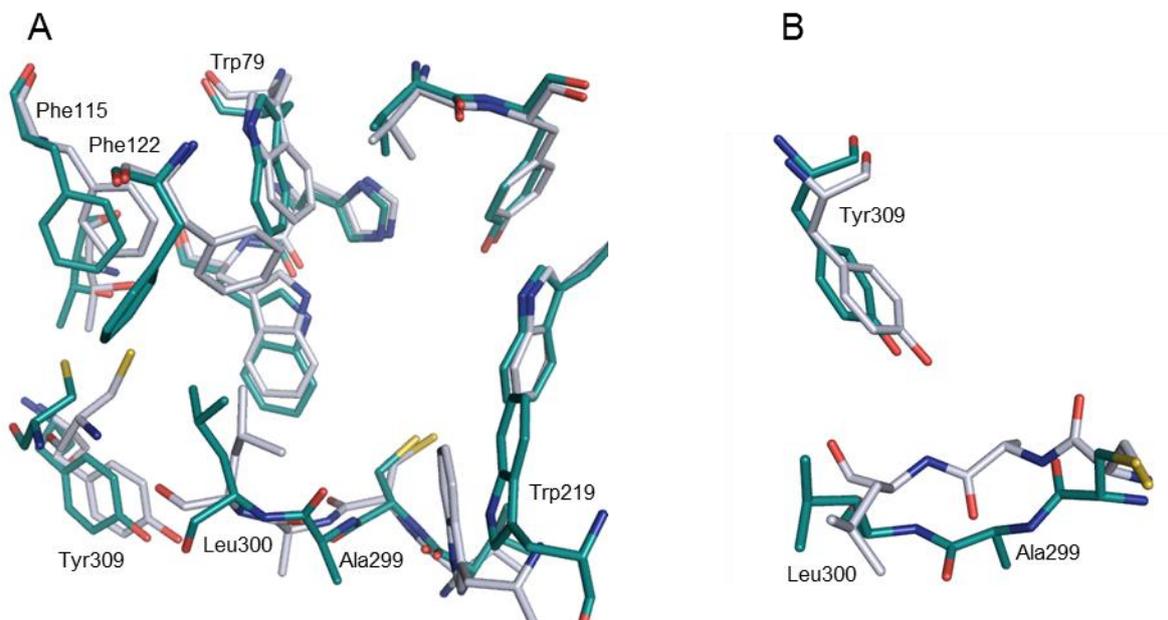


Abb. 13. A) Überlagerung der MD-generierten Proteinkonformation (blaugrün) mit der Ausgangsstruktur 1Z89 (blauweiß) zur Verdeutlichung struktureller Unterschiede. **B)** Isolierte Darstellung der Subtasche unterhalb der Ligandenbindestelle, die durch eine Distanzaufweitung zwischen den Aminosäuren Tyr309 und Ala299/Leu300 entsteht.

Im Rahmen dieser Arbeit ging es ausschließlich um eine selektive Adressierung und Stabilisierung der letztgenannten Subtasche zwischen Tyr309 und Ala299/Leu300. Das Ziel dabei war es, eine entsprechende Proteinstruktur für eine Röntgenstrukturanalyse experimentell zugänglich zu machen, um auf diese Weise die postulierte Hypothese der Existenz dieser Enzymkonformation zu verifizieren.

Zusätzlich zu diesen signifikanten strukturellen Variationen unterscheiden sich die Positionen des Trp219 in den beiden Strukturen deutlich voneinander, da sich Trp219 in der erzeugten Konformation in Richtung Solvens verlagert hat und dadurch den Bereich der katalytischen Subtasche aufweitet. Allerdings ist dieser Unterschied von vergleichsweise geringer Bedeutung, da die Aminosäure nicht an der Ausbildung relevanter Wechselwirkungen bei der Ligandenbindung beteiligt ist.

Abschließend ist festzuhalten, dass die mittels MD Simulation generierte neuartige Bindetaschenkonformation der AR durch zwei zusätzliche Subtaschen innerhalb der Spezifitätstasche möglichen Inhibitoren zusätzlichen Raum zur Verfügung stellen kann. Sofern die Hypothese dieser Konformation experimentell belegt werden kann, könnte eine entsprechende Adressierung der Subtaschen möglicherweise mit einer Affinitätssteigerung und therapeutisch gesehen mit einer möglichen Verbesserung des Nebenwirkungsprofils von derartigen Inhibitoren einhergehen.

III.4 Vorgehensweise, Ergebnisse und Diskussion

III.4.1 Vergleichende Dockingstudien von AR-Pyridazinon-Inhibitoren

Wie bereits in Abschnitt III.3 beschrieben hat M. Zentgraf während seiner Promotion eine mögliche neue Bindetaschenkonformation der AR identifiziert und zudem die Hypothese aufgestellt, dass das Phenyl-Derivat **4** möglicherweise die neue Bindetaschenform adressieren könnte. Um die von M. Zentgraf beschriebenen Dockingergebnisse für dieses Derivat zu reproduzieren und um darüber hinaus mögliche Bindemodi der beiden Inhibitoren **2** und **3** zu untersuchen, für die bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine Kristallstrukturen veröffentlicht worden sind, wurden die drei Moleküle einer Dockingstudie unterzogen. Dabei wurden die Liganden sowohl in das aktive Zentrum der Kristallstruktur 1Z89 als auch in die MD-generierte Bindetaschenkonformation eingepasst.

Bevor jedoch die Verbindungen **2-4** in die beiden Enzymbindetaschen eingepasst werden konnten, wurde ein Re-Dockingverfahren des Methyl-Derivats **1** durchgeführt. Ein Re-Docking dient der Validierung der zu wählenden Einstellungen einzelner Dockingparameter. Dabei werden die Liganden zunächst aus den jeweiligen Protein-Ligand-Komplexstrukturen entfernt, um anschließend mit Hilfe des verwendeten Dockingprogramms wieder in die Bindetasche eingepasst zu werden. Anhand eines Vergleichs der berechneten Dockinglösungen mit dem realen, für die entsprechende Proteinkonformation experimentell bestimmten Bindemodus können die Dockingergebnisse validiert werden. Weiterhin kann dabei durch Änderung einzelner Parameter versucht werden, die Berechnungen dahingehend zu optimieren den tatsächlichen Bindemodus reproduzieren zu können, um für unbekannte Verbindungen zuverlässige Vorhersagen zu erhalten.

Im Rahmen der Dockingsimulationen wurden anschließend alle vier Moleküle in die Bindetaschen der beiden Proteinstrukturen 1Z89 und der MD-generierten Enzymkonformation gedockt. Da die Auflösung der Kristallstruktur 1Z89 von 1,43 Å keine Rückschlüsse auf den Protonierungszustand der Pyridazinongruppe zulässt, wurde sowohl die ungeladene als auch die deprotonierte, negativ geladene Form des Pyridazinons gedockt.

Durchführung der Dockingsimulationen

Die Dockingsimulationen wurden mit dem Programm *AutoDock3.0* durchgeführt. Als Proteinstrukturen diente die Kristallstruktur 1Z89 sowie die MD-generierte Enzymkonformation. Zunächst wurden alle Wassermoleküle, der Cofaktor und der gebundene Ligand aus beiden Proteinstrukturen entfernt. Danach wurden den Proteinstrukturen mit Hilfe des

Programms *Protonate* des *AMBER* Programmpakets^{163,164} polare Wasserstoffatome hinzugefügt. Anschließend diente das interne Tool *add_chrgsol* der Zuweisung von Partialladungen (*Kollman united-atom partial charges*^{165,166}) und Solvatisierungsparametern, die nach der Methode von Stouten *et al.*¹⁶⁷ abgeleitet worden sind.

Die Cofaktormoleküle sind unter Verwendung von *SYBYL 8.0*¹⁶⁸ durch Wasserstoffatome ergänzt worden, den Atomen wurden entsprechende Gasteiger-Marsili Ladungen⁶⁸ zugewiesen und anschließend wurden die Moleküle im mol2-Format abgespeichert. Danach sind beide Moleküle durch das Modul *AutoTors* in das pdbq-Format überführt worden und dem Nikotinamidrest wurden manuell entsprechende Solvatisierungsparameter zugewiesen. Schließlich wurden die Cofaktoren wieder in die Proteinstrukturen integriert.

Für die Berechnungen der benötigten Affinitätsgitter ist jeweils eine kubische Box mit 65 x 65 x 65 Gitterpunkten definiert worden. Die Gitterzentren befanden sich bei Trp111, so dass die berechneten Affinitätsgitter die gesamte Bindetasche umfassten. Als Abstand zwischen den einzelnen Gitterpunkten wurden 0,375 Å gewählt, wodurch die Kantenlängen der Affinitätsgitter 24 Å x 24 Å x 24 Å betragen. Für die Gitterberechnung wurde das Modul *AutoGrid* verwendet.

Die Liganden **2-4** wurden auf Basis von Verbindung **1**, die aus der Kristallstruktur 1Z89 extrahiert worden ist, mit dem Programmpaket *MOE* erstellt und im mol2-Format abgespeichert. Mit *SYBYL 8.0* wurden den Liganden Wasserstoffatome hinzugefügt, wobei für jedes Ligandenmolekül eine vollprotonierte und eine Variante, bei der das der Carbonylfunktion benachbarte Stickstoffatom des Pyridazinons manuell deprotoniert wurde, erzeugt. Anschließend wurden den Liganden Gasteiger-Marsili Ladungen zugewiesen. Um die intramolekulare Energie der Ausgangskonformationen der Ligandenmoleküle in Richtung des jeweiligen globalen Minimums zu reduzieren, wurden die Verbindungen in *SYBYL 8.0* einem Minimierungsprozess unterzogen. Das dabei verwendete Protokoll nutzte das Tripos Kraftfeld, die Methode nach Powell, einen Terminierungsgradienten von 0,005 kcal/(mol*Å), sowie eine maximale Anzahl von 1000 Schritten. Danach sind mit Hilfe des Moduls *AutoTors* die unmittelbaren Dockingfiles (pdbq) der Liganden erstellt worden, wobei innerhalb der Liganden aromatische Ringsysteme detektiert, Torsionsbindungen definiert und die Liganden ausgehend von einer „*all-atom*“ zu einer „*united-atom*“ Darstellung konvertiert wurden.

Das angewandte Dockingprotokoll verwendete eine initiale Populationsgröße von 50, eine Höchstzahl von maximal $3,0 \times 10^6$ Energieevaluierungen, eine Mutationsrate von 0,02, eine Kreuzungsrate von 0,80 und einen Elitismus-Wert von 1. Die Parameter der lokalen Suche, basierend auf dem Optimierungsalgorithmus von Solis und Wets⁶⁹ wurden wie folgt gewählt: die Wahrscheinlichkeit eine lokale Suche für ein Individuum durchzuführen betrug 0,06, es war eine maximale Anzahl an 300 Schritten der lokalen Suche zulässig, die Anzahl der

aufeinanderfolgenden erfolgreichen bzw. erfolglosen Schritten, bevor die Größe des lokalen Suchraumes verändert wurde, betrug 4.

Während des Dockingprozesses sind für jeden Liganden 50 Dockingläufe des genetischen Algorithmus durchgeführt worden. Die berechneten Bindungsposen wurden gemäß einer definierten Toleranz von 1,0 Å gruppiert. Bei dem durchgeführten Re-Dockingverfahren für Molekül **1** in die Kristallstruktur 1Z89 diente der kristallographisch bestimmte Bindemodus des Liganden als Referenzstruktur für die RMS-Berechnung.

Ergebnisse und Diskussion

Vorab ist zu erwähnen, dass der Protonierungszustand des Pyridazinons in den durchgeführten Dockingexperimenten keinen Einfluss auf die Positionierung der Ankergruppe hatte. In beiden Fällen resultierten plausible Bindungsmodi, welche die Ausbildung der relevanten Wasserstoffbrücken innerhalb der katalytischen Subtasche ermöglichten. Aus energetischer Sicht scheint jedoch die deprotonierte Pyridazinonform begünstigt zu sein, da einerseits die Ausbildung der dritten wichtigen H-Brücke mit der Seitenketten NH-Gruppe des Trp111 ermöglicht wird. Zudem können ladungsgestützte Wechselwirkungen zwischen dem negativen Pyridazinonrest und dem positiv geladenen Nikotinamidrest des Cofaktors NADP⁺ eingegangen werden und zu einem weiteren Gewinn an freier Bindungsenergie beitragen. Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse beziehen sich aus diesem Grund auf die Dockinglösungen der deprotonierten Pyridazinonform.

Dockingstudie anhand der Kristallstruktur 1Z89

Die erzielten Resultate des Re-Dockingverfahrens der Verbindung **1** waren äußerst zufriedenstellend. Das verwendete Dockingprogramm *AutoDock3.0* konnte mit den gewählten Einstellungen den Bindemodus von **1** innerhalb der Proteinstruktur 1Z89 durchweg reproduzieren (siehe Abb. 14). Alle 50 Dockinglösungen bildeten ein Cluster wobei die auf Rang 1 geführte Dockinglösung lediglich einen RMSD-Wert von 0,35 Å aufwies.

Auch für Verbindung **2** konnte ein plausibler Bindemodus generiert werden, der dem Bindemodus von **1** entsprach. Die erhaltenen Dockinglösungen für die Moleküle **3** und **4** wiesen hingegen einige Abweichungen zu den Bindemodi von **1** und **2** auf. In Analogie zu dem experimentell bestimmten Bindungsmodus des Liganden **1** nahmen die Dockinglösungen der Moleküle **3** und **4** Bindungsmodi ein, bei denen die Pyridazinon-Kopfgruppen die Anionen-Bindetasche adressierten und dabei essenzielle H-Brücken mit den katalytischen Resten ausbildeten, während die aromatischen Ringsysteme die Spezifitätstasche besetzten. Der vergleichbar größte Unterschied zu den Bindungsmodi von **1** und **2**

bestand in der Positionierung der Sulfonylgruppe, der Verbindung zwischen Ankergruppe und Bicyklus. Dieser Molekülteil war bei **3** und **4** nach oben in Richtung Trp79 verschoben, einhergehend mit einer leichten Neigung des aromatischen Ringsystems, was notwendig war, um den voluminöseren Isopropyl- bzw. Phenylsubstituenten entsprechend zu platzieren. Bei einem Bindemodus analog zu Molekül **1** käme es ansonsten zu einem Zusammenstoß mit der Seitenkette von Leu300.

Der für Verbindung **4** erhaltene Bindemodus entsprach weitestgehend der von M. Zentgraf beschriebenen Dockinglösung, jedoch bestanden geringfügige Unterschiede in der Orientierung sowie Positionierung des Phenylrings. Der Phenylring wurde durch die gewählten Einstellungen günstiger positioniert, weshalb die von M. Zentgraf beobachteten kurzen Abstände zwischen dem Phenylring und Ala299, Trp219 und Cys298 insgesamt größer ausfielen als beschrieben. Bei der auf Rang 1 geführten Dockinglösung besetzte der Pyridazinonrest eine identische Position, verglichen mit den Bindemodi der anderen Liganden, jedoch war dabei das Pyridazinon um einen 45° Winkel verdreht. Eine Interaktion mit Trp111 wurde durch die eingenommene Konformation nicht ermöglicht. Auf den Positionen 7-9 des ersten Clusters (10 Konformere) fanden sich hingegen Bindemodi, die über die korrekte Orientierung der Pyridazinongruppe verfügten und die Ausbildung aller relevanten Wasserstoffbrücken mit Tyr48, His110 und Trp111 ermöglichten.

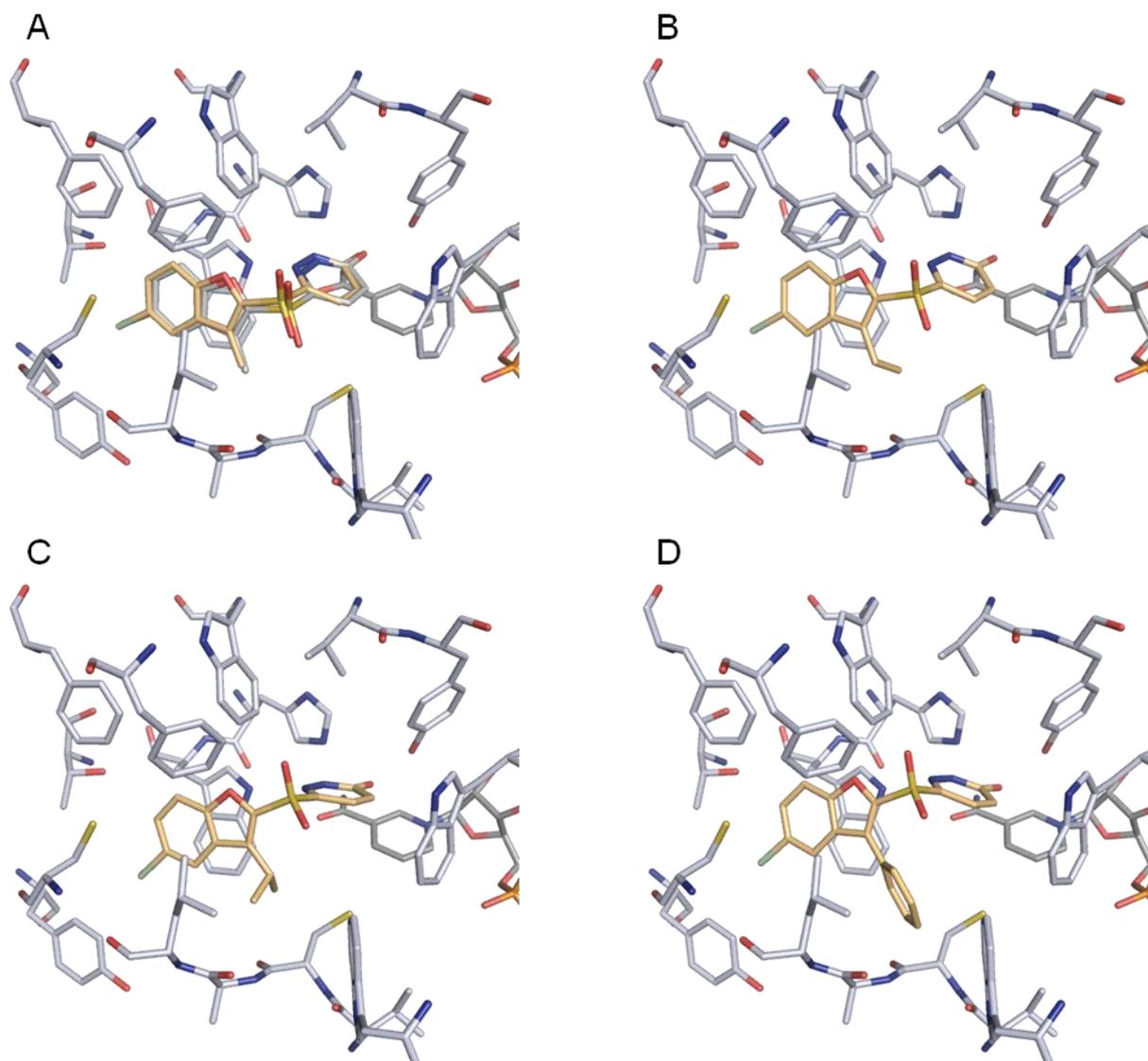


Abb. 14. Dockinglösungen der vier Pyridazinon-Inhibitoren innerhalb der Bindetasche der Proteinstruktur 1Z89. **A)** Überlagerung der Dockinglösung für Verbindung 1 (hellorange) mit dem kristallographisch bestimmten Bindemodus (hellgrau). **B-D)** Darstellung der Dockinglösungen der Inhibitoren 2-4.

Dockingstudie anhand der MD-generierten Enzymkonformation

Die an der MD-generierten Bindetaschenkonformation durchgeführten Dockingexperimente lieferten für die Moleküle **1** und **2** nahezu identische Bindemodi im Vergleich zu denjenigen, die für die Kristallstruktur 1Z89 resultierten. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die berechneten Bindeposen der Verbindungen **3** und **4** von jenen der Kristallstruktur (siehe Abb. 15). Das durch zwei zusätzliche Subtaschen innerhalb der Spezifitätstasche bereitgestellte erhöhte Bindetaschenvolumen dieser Proteinkonformation wurde von beiden Liganden genutzt. Für beide Moleküle konnten plausible Bindemodi generiert werden, wobei der Isopropyl- bzw. Phenylrest genau innerhalb der neuen Subtasche zwischen Tyr309 und

Ala299/Leu300 platziert worden ist. Die Position des Grundgerüsts von **3** entsprach dabei exakt der von Verbindung **1**, die während der MD Simulation erzeugt wurde. In dem von Verbindung **4** eingenommenen Bindemodus war das gesamte Molekül leicht in Richtung Thr114 der Spezifitätstasche verschoben, wodurch der Phenylring optimal innerhalb der Subtasche platziert wurde. Trotz der Molekülverschiebung konnten alle für die Bindung wichtigen H-Brücken zwischen dem Pyridazinonrest und der Anionen-Bindetasche ausgebildet werden.

Diese Dockingergebnisse zugrundeliegend, könnte das Phenyl-Derivat **4** tatsächlich einen Kandidaten darstellen, der die MD-generierte Bindetaschenkonformation adressieren und dabei die zusätzliche Subtasche zwischen Tyr309 und der flexiblen Loopregion Val297-Leu300 besetzen könnte, um diese Proteinstruktur experimentell nachweisbar zu machen. Aus diesem Grund diene dieser Inhibitor in der weiteren Arbeit als Templat für eine ligandbasierte virtuelle Datenbanksuche.

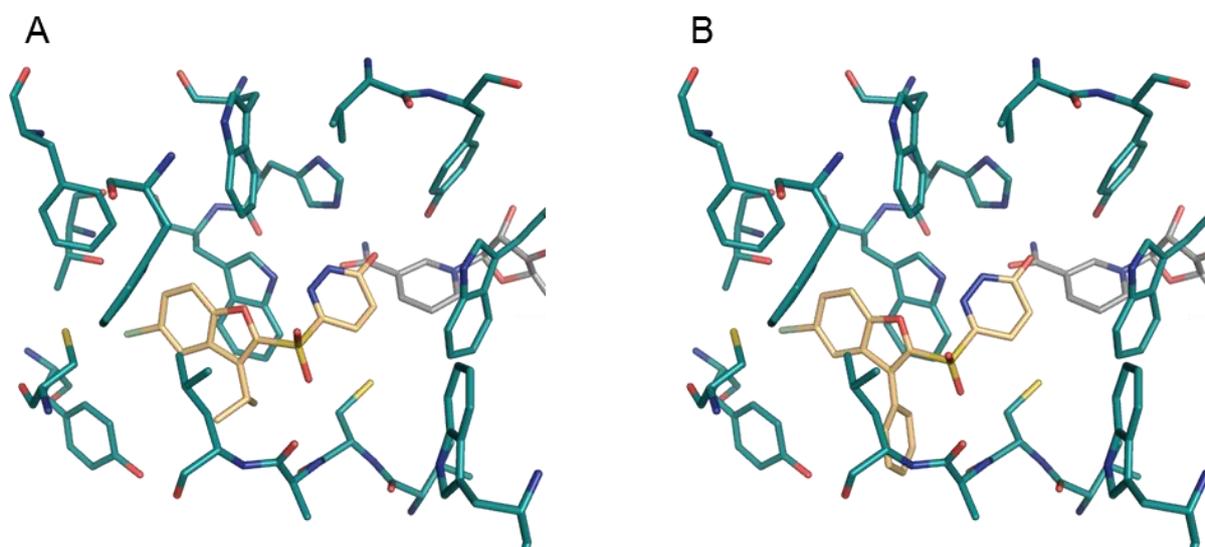


Abb. 15. Dockinglösungen der Pyridazinon-Inhibitoren **3** (A) und **4** (B) innerhalb der MD-generierten Bindetaschenkonformation.

III.4.2 Computergestützte Identifizierung neuer Inhibitoren der Aldose

Reduktase für eine gezielte Stabilisierung einer neuen Bindetaschenkonformation

In diesem Abschnitt soll nun die angewandte Vorgehensweise beschrieben werden, mit der Kandidatenmoleküle aus verschiedenen Moleküldatenbanken identifiziert werden konnten, die strukturell geeignet erschienen, eine neue Bindetaschenkonformation der AR spezifisch

zu adressieren und zu stabilisieren. Für die Identifizierung der niedermolekularen Verbindungen wurden zwei verschiedene, sich gegenseitig ergänzende, Strategien verfolgt. Zunächst wurde ein proteinbasierter Ansatz durchgeführt, bei dem strukturelle und physikochemische Informationen der dreidimensionalen Proteinstruktur zur Ableitung bestimmter Anforderungen an potenzielle Liganden, hinsichtlich der Konstitution und dem Vorhandensein notwendiger Funktionalitäten, verwendet wurden. Anhand dieser Richtlinien wurden Pharmakophormodelle erstellt, die während der virtuellen Datenbanksuche als Filterkriterien fungierten. Zudem wurde ein ligandbasierter Ansatz durchgeführt, bei dem der bekannte ARI, Pyridazinon-Inhibitor **4**, als Referenzligand diente.

Im Anschluss wurden die identifizierten Moleküle mittels Dockingsimulationen auf mögliche Bindemodi sowie ihrer Bindungsaffinitäten bezüglich der neuen Bindetaschenkonformation untersucht. Für eine genauere Affinitätsbeurteilung wurden für jede Verbindung zudem weitere Vorhersagen durch Anwendung einer alternativen Bewertungsfunktion berechnet. Um der ausgeprägten Bindetaschenflexibilität der AR Rechnung zu tragen wurden abschließend alle Moleküle durch Cross-Dockingexperimente bezüglich ihrer Selektivität gegenüber der MD-generierten Konformation analysiert.

Nach eingehender Auswertung der durchgeführten Analysen wurden schließlich die vielversprechendsten, kommerziell verfügbaren Kandidatenmoleküle bei verschiedenen Anbietern für die experimentelle Überprüfung der postulierten Hypothesen bestellt. Eine Übersicht über die angewandte Vorgehensweise liefert Abbildung 16.

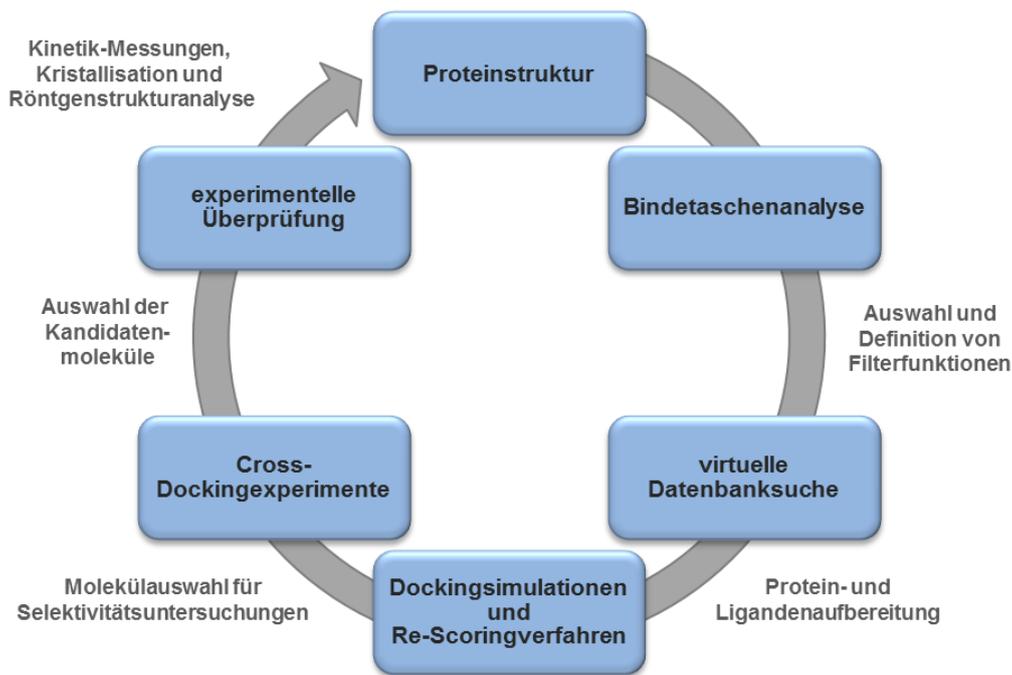


Abb. 16. Überblick über die angewandte Vorgehensweise zur Identifizierung neuer Liganden der Aldose Reduktase mittels virtuellem Screening.

III.4.2.1 Proteinbasierter Ansatz

III.4.2.1.1 Vergleichende Strukturanalyse verschiedener AR-Ligand-Komplexe

Die Folgen und das Ausmaß der erhöhten Rezeptorflexibilität der AR wurden bereits ausführlich durch Kristallstrukturanalysen und molekulardynamische Simulationen untersucht.⁸⁷ Bei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten vergleichenden Proteinstrukturanalyse lag der Fokus hingegen auf der Identifizierung übereinstimmender Bindemotive verschiedener AR-Inhibitoren sowie bestehender struktureller Differenzen zwischen der Bindetasche der Zielkonformation und den anderen bekannten Bindetaschenkonformationen.

Die Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen diente dem Zweck essenzielle Funktionalitäten bzw. bestimmte Substrukturen für die gesuchten Liganden abzuleiten, damit diese zum Einen an das aktive Zentrum der AR binden und zum Anderen einen bestimmten Bindemodus einnehmen, der prinzipiell geeignet ist die neuartige Konformation zu adressieren. Informationen über zusätzliche, neben den offensichtlich vorhandenen Strukturunterschieden zwischen der MD-Struktur und den untersuchten Kristallstrukturen waren hingegen wichtig um diese möglicherweise für Affinitätsvorteile und eine erhöhte Selektivität der gesuchten Liganden zugunsten der Zielkonformation nutzen zu können und

bei der Erstellung von Pharmakophormodellen explizit zu berücksichtigen. Diese Studie lieferte hilfreiche Informationen und war essenziell für die spätere Postulierung verschiedener Pharmakophorhypothesen (siehe Abschnitt III.4.2.1.3) und war daher für das weitere Vorgehen unverzichtbar.

Die für diese Untersuchung verwendeten Kristallstrukturen der AR-Ligand-Komplexe bzw. der Holostruktur stammen aus der *Protein Data Bank*. Bei der Auswahl geeigneter Proteinstrukturen wurden ausschließlich Strukturen mit einer Auflösung von $\leq 2,5 \text{ \AA}$ berücksichtigt. Daneben war es wichtig mit den ausgewählten Kristallstrukturen das Spektrum der verschiedenen bekannten AR-Konformationen abzudecken. Weiterhin wurden keine Strukturen mit Mutationen innerhalb der 16 Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche verwendet. Der analysierte Satz an Proteinstrukturen umfasste neben der MD-generierten Proteinkonformation insgesamt 14 Kristallstrukturen, von denen 12 Strukturen die humane und 2 Strukturen die porcine AR zeigen (siehe Tab. 1). Aufgrund der hohen Sequenzidentität von insgesamt 86,3% unterscheiden sich die Bindetaschen der beiden Enzyme lediglich durch den Austausch von Phe121 durch Pro und Leu301 durch Met, wovon jedoch keine der 16 Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche betroffen ist. Aufgrund dessen ist die Verwendung porciner Strukturen innerhalb dieser Untersuchung durchaus sinnvoll. Für die Visualisierung sowie für die Überlagerung der dreidimensionalen Kristallstrukturen auf die Templatstruktur wurde das Programm *PyMOL*⁴⁴ (Version 0.99) verwendet. Der Fokus der Analyse lag dabei vorrangig auf den Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche (siehe Abschnitt III.1.2).

Die Analyse der 14 Kristallstrukturen bestätigte die in der Literatur beschriebene Zweiteilung der Bindetasche in einen rigiden Bereich, die Anionen-Bindetasche, und eine plastische Region, die Spezifitätstasche, die bei der Ligandenbindung signifikanten strukturellen Änderungen unterliegt. Die drei Aminosäuren Tyr48, His110 und Trp111 der katalytischen Subtasche sowie der Nikotinamidrest des NADPH zeigen in den verschiedenen Kristallstrukturen nur minimale bis keine strukturellen Differenzen und bieten konstante Bedingungen für die Bindung bestimmter funktioneller Gruppen (siehe Abb. 17). Zwischen dem Proteinbereich der Anionen-Bindetasche der Kristallstrukturen und der MD-generierten Proteinstruktur waren keine strukturellen Unterschiede feststellbar, so dass die katalytische Subtasche in Analogie zu den beobachteten Komplexstrukturen mit entsprechenden hydrophilen Ankergruppen, wie z.B. Carboxyl-, Hydantoin- oder Pyridazinongruppen, adressiert werden kann.

PDB-Code	Ligand	Organismus	Auflösung [Å]
1AH0	Sorbinil	Schwein	2,30
1AH3	Tolrestat	Schwein	2,30
1ADS	-	Human	1,65
1IEI	Zenarestat	Human	2,50
1PWL	Minalrestat	Human	1,10
1T41	IDD552	Human	1,05
1US0	IDD594	Human	0,66
1Z3N	Lidorestat	Human	1,04
1Z89	Pyridazinoninhibitor	Human	1,43
1Z8A	Pyridazinoninhibitor	Human	0,95
2FZ8	Zopolrestat	Human	1,48
2FZ9	Zopolrestat	Human	1,60
2FZD	Tolrestat	Human	1,08
2F2K	DEG	Human	1,94
MD-Struktur	Pyridazinoninhibitor	Human	-

Tab. 1. Übersicht über die verwendeten AR-Proteinstrukturen der durchgeführten Strukturanalyse. Die Bezeichnung der Kristallstrukturen erfolgt unter Angabe des jeweiligen PDB-Codes.

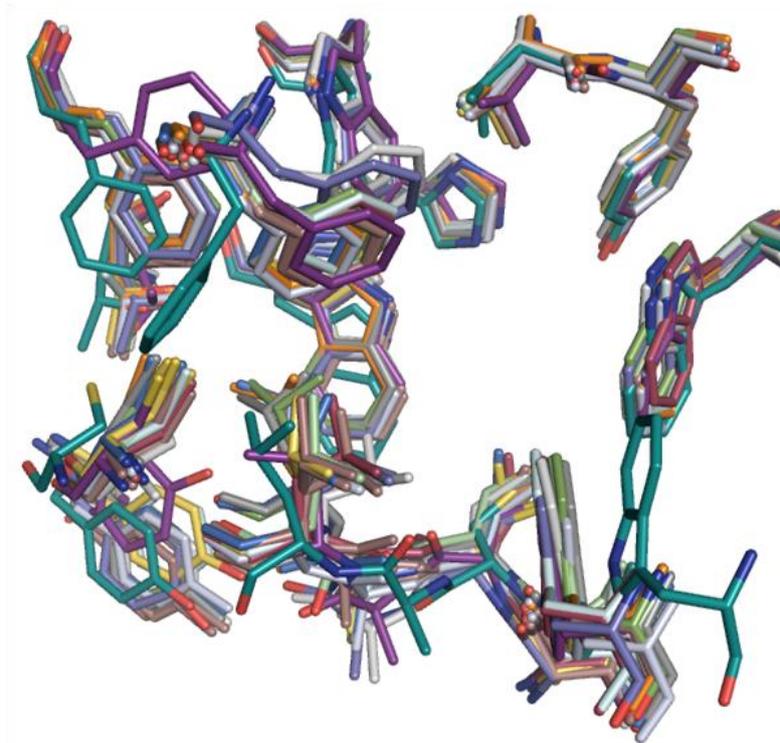


Abb. 17. Überlagerung der unmittelbaren Bindetaschen der analysierten AR-Proteinstrukturen.

Für die Stabilisierung der MD-generierten Zielkonformation war es weiterhin erforderlich, die geöffnete Spezifitätstasche zu adressieren und mit geeigneten Substrukturen potenzieller Liganden zu besetzen, um ein Verschließen durch die Seitenkette des hochflexiblen „Gatekeepers“ Leu300 zu verhindern. Darüber hinaus mussten diese Molekülreste in der Lage sein, eine spezifische, möglichst gut vorhersehbare Orientierung und Position innerhalb der Spezifitätstasche einzunehmen.

Dieser Aspekt war von besonderer Bedeutung, um die Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 mit einem weiteren Molekülrest zu adressieren. Als bewährte Molekülreste innerhalb der Spezifitätstasche boten sich aromatische Systeme an, da diese in der Mehrzahl der analysierten Komplexe parallel zum Trp111 orientiert vorlagen und dadurch entsprechende π - π -Kontakte ausbilden konnten. Ein weiterer Vorteil aromatischer bzw. von Ringsystemen generell besteht in ihrer geringen Flexibilität, einhergehend mit einem geringeren Konformationsraum im Vergleich zu aliphatischen Resten, welche folglich an entsprechender Position innerhalb des Liganden zu vermeiden waren.

Allerdings ist die Forderung nach aromatischen Systemen an einer bestimmten Position im Liganden, um die Spezifitätstasche zu adressieren und Interaktionen mit Trp111 auszubilden, keine Garantie dafür, eine „1US0“-ähnliche Bindetaschenform zu erhalten, wie das Beispiel Tolrestat zeigt. Dieser ARI, der wie zahlreiche andere Inhibitoren ebenfalls über einen aromatischen Rest verfügt, zeigt einen Bindemodus, bei dem sich das aromatische Ringsystem senkrecht mit einer T-förmigen *edge-to-face* Orientierung zum Trp111 positioniert und eine alternative, charakteristische Bindetaschenform stabilisiert.⁸⁶ Diese Beobachtung verdeutlicht sehr gut die Komplexität der Aufgabenstellung sowie die Tatsache, dass potenzielle Bindemodi nicht trivial anhand der Ligandenstruktur vorhergesagt werden können.

Weitere potenzielle Bindungspartner werden von dem hochflexiblen Proteinrückgratsegment Val297-Leu300 bereitgestellt, von dem alternierend H-Brückendonoren und -akzeptoren in Richtung der Bindetasche zeigen. Entsprechende Funktionalitäten am Molekülrest, der die Subtasche zwischen Tyr309 und Ala299/Leu300 adressiert, oder am aromatischen Ringsystem der Liganden könnten mit dem Segment interagieren und zu einer Affinitäts-erhöhung beitragen.

Schließlich stehen im Bereich der hinteren Spezifitätstasche die Seitenketten der beiden Aminosäuren Thr113 und Cys303 als mögliche Bindungspartner zur Verfügung. Während die Position und Konformation von Thr113 der MD-Konformation mit dem entsprechenden Rest der Kristallstrukturen sehr gut übereinstimmten, wies Cys303 eine ähnliche Position, jedoch mit veränderter Konformation auf, die weiterhin nur in den beiden Strukturen des AR-Tolrestat-Komplexes zu finden war. Aufgrund der konformationellen Freiheitsgrade der

Seitenkette des Cys303 erschien es ungeeignet, diesen Unterschied explizit für eine Selektivitätserhöhung ausnutzen zu können. Als Nebenaspekt sei noch zu erwähnen, dass die Konformationen von Phe122, der Aminosäure dessen im Vergleich zu den Kristallstrukturen umgeklappte Konformation die zweite Subtasche oberhalb der Ligandenbindestelle öffnete, der MD-generierten Bindetaschenkonformation und der beiden AR-Tolrestat-Kristall-strukturen die größte Differenz von nahezu 180° zeigten.

Auch der signifikante Unterschied zwischen der MD-Konformation und den Kristallstrukturen hinsichtlich der Position von Trp219 kam, bedingt durch die solvensexponierte Lage der Aminosäure am Rand des aktiven Zentrums, für eine Nutzung zur Selektivitätssteigerung nicht in Betracht und besaß daher für das weitere Vorgehen keine Relevanz.

Die durchgeführte vergleichende Proteinstrukturanalyse lieferte wichtige Informationen bezüglich essenzieller Bindungspartner seitens des Proteins und gab Aufschlüsse darüber, welche funktionellen Gruppen bzw. Substrukturen in den gesuchten Kandidatenmolekülen vorhanden sein müssen, um relevante Wechselwirkungen einzugehen. Das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen der MD-generierten Bindetaschenkonformation und den verschiedenen Bindetaschenkonformationen der Kristallstrukturen liegt, wie bereits in Abschnitt III.3.1 beschrieben, in der Existenz zweier zusätzlicher Subtaschen im Bereich der Spezifitätstasche. Es konnten einige weitere strukturelle Differenzen festgestellt werden, die jedoch ungeeignet erschienen, um diese hinsichtlich einer Selektivitätserhöhung zugunsten der Zielkonformation auszunutzen. Daher bestand die einzige Möglichkeit eine gesteigerte Selektivität der gesuchten Liganden bezüglich der Templatstruktur zu erreichen, in der ohnehin beabsichtigten Adressierung der Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309.

III.4.2.1.2 Analyse der Bindetasche hinsichtlich günstiger Interaktionspunkte

Im Anschluss an die vergleichende Kristallstrukturanalyse wurde die gesamte Bindetasche der MD-generierten Proteinstruktur bezüglich privilegierter Interaktionspunkte für bestimmte Atomtypen bzw. funktionelle Gruppen zukünftiger Liganden, sogenannter *hot spots*, untersucht. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Programme *DrugScore^{CSD}* und dem in dem Softwarepaket *MOE⁵⁴* implementierten Tool *Surfaces and Maps*. Eine umfassende Beschreibung der zugrundeliegenden Methodik dieser Art der Bindetaschenanalyse findet sich in Abschnitt II.2. Die Untersuchung kann als Ergänzung und Überprüfung der vorangegangenen Strukturanalyse angesehen werden, die zudem Aussagen über günstige

bzw. ungünstige Wechselwirkungsfelder für Atomtypen erlaubt, die in den Liganden der Komplexstrukturen nicht vorhanden sind.

Überprüfung der Vorhersagekraft des Programms DrugScore^{CSD}

Aufgrund der Tatsache, dass keine Inhibitoren der AR im Zeitraum der Arbeit bekannt waren, die die Templatkonformation adressierten, konnten keine unmittelbaren Ligandeninformationen bei der Erstellung der Pharmakophormodelle berücksichtigt werden. Umso wichtiger war die Verlässlichkeit der durchgeführten Berechnungen molekularer Interaktionsfelder. Um vorab die Eignung von *DrugScore*^{CSD} zu überprüfen bzw. zu ermitteln, ob die berechneten Interaktionspunkte auch tatsächlich von entsprechenden Ligandenatomen besetzt werden, wurden verschiedene *hot spots* für die beiden Kristallstrukturen 1Z89 und 1US0 berechnet und mit den experimentell bestimmten Positionen der jeweiligen Ligandenatome verglichen.

Durch Anwendung der entsprechenden *HotSpots*-Funktion wurden günstige Wechselwirkungsbereiche für die 18 verschiedenen Sonden des Programms berechnet. Die Berechnungen beruhten jeweils auf den Holoenzymstrukturen, die jeweiligen Liganden wurden vorab aus den Komplexstrukturen entfernt. Der analysierte Bereich wurde als quaderförmiges Gitter definiert, das alle Aminosäuren sowie Atome des Cofaktors umfasste, die sich innerhalb eines Radius von 12 Å um die ursprünglich gebundenen Liganden befinden. Der Abstand zwischen den Gitterpunkten betrug 0,375 Å. Um artifizielle Werte an den Quaderkanten zu vermeiden, wurde die Gittergröße des Berechnungsbereichs um je 6 Å im Vergleich zum Gitter des Gesamtquaders verringert, wodurch ein Gitter mit den Kantenlängen 24 Å x 21 Å x 20 Å resultierte. Des Weiteren wurden die berechneten Wechselwirkungswerte für eine intuitivere Handhabung auf Werte zwischen 0 bis 1 normalisiert, wobei 1 dem globalen Minimum (Optimum) entspricht. Darüber hinaus wurden die für jeden Probenatomtyp berechneten *hot spots* in günstige bzw. ungünstige Wechselwirkungsfelder unterteilt. Die Visualisierung der Konturoberflächen erfolgte mit dem Programm *PyMOL*, wobei die jeweiligen Ergebnisse bei unterschiedlichen Interaktionswerten, d.h. Konturleveln (K.I.), inspiziert worden sind.

Die Überlagerungen des Pyridazinon-Inhibitors (1Z89) bzw. von IDD594 (1US0) mit den identifizierten *hot spots* zeigten hinsichtlich berechneter und experimentell ermittelter Atompositionen deutliche Übereinstimmungen bzw. nur geringfügige Abweichungen voneinander (siehe Abb. 18). In Bezug auf die Ligandenmoleküle stimmten die identifizierten Interaktionspunkte für das Sondenatom O.2 (sp²-hybridisierter Sauerstoff), also für H-Brückenakzeptoren, sowohl mit den Atomen des deprotonierten Amidstickstoffatoms der Pyridazinongruppe bzw. mit denen der Carboxylatgruppe überein. Ebenso verhielt es sich für

die *hot spots* für amidischen Stickstoff (N.am), die unter anderem bei der Amidbindung (IDD594) bzw. dem Amidstickstoff des Pyridazinons lokalisiert sind. Schließlich erzielten auch die Vorhersagen aromatischer Kohlenstoffatome (C.ar) hohe Übereinstimmungen mit den Positionen der Kristallstrukturen.

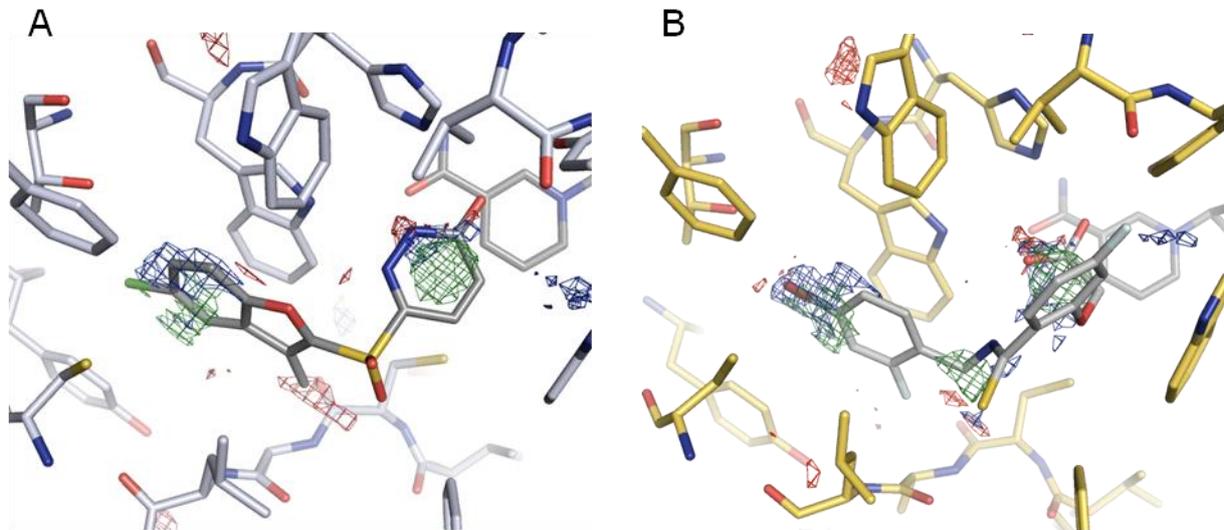


Abb. 18. Darstellung zweier AR-Ligand-Komplexstrukturen mit überlagerten molekularen Interaktionsfeldern, die durch *DrugScore*^{CSD} berechnet wurden. Vergleich zwischen experimentell ermittelten Ligandenatombpositionen und entsprechender *hot spots* anhand der Kristallstrukturen 1Z89/Pyridazinon-Inhibitor (**A**) und 1US0/IDD594 (**B**). Die dargestellten Konturen entsprechen den berechneten *hot spots* der Sonden **A** C.ar (K.I. 0,80; grün), O.2 (K.I. 0,40; rot), N.am (K.I. 0,58; blau) sowie **B** C.ar (K.I. 0,55; grün), O.c02 und O.2 (K.I. 0,32 bzw. 0,40; rot), N.am (K.I. 0,40; blau).

Hot spot-Analyse der MD-generierten Proteinkonformation

Nach erfolgter Überprüfung der Eignung des Programms *DrugScore*^{CSD} wurden in analoger Weise molekulare Wechselwirkungsfelder für die MD-generierte Proteinkonformation berechnet. Die einzige Änderung bestand darin, dass während der Berechnungen alle Aminosäuren der Bindetasche sowie Atome des Cofaktors innerhalb eines Radius von 20 Å um den ursprünglich gebundenen Pyridazinon-Inhibitor, der ebenfalls vorab aus der Proteinstruktur entfernt worden ist, berücksichtigt wurden. Die Inspektion der generierten *hot spots* erfolgte ebenfalls mit *PyMOL* bei verschiedenen Interaktionswerten.

Um einen generellen Überblick über die bevorzugte Verteilung diverser Atomtypen innerhalb der neuen Bindetaschenform zu erhalten, wurden zunächst die generierten *hot spots* aller 18 Sonden bei unterschiedlichen Interaktionswerten visualisiert. Da es jedoch bei der anschließenden Postulierung von Pharmakophorhypothesen in erster Linie darauf ankam, allgemeine physiko-chemische Anforderungen an Kandidatenmoleküle zu formulieren, anstatt sehr spezifische und dadurch äußerst restriktive Definitionen, wie z.B. konkrete

Atomtypen, zu verwenden, erfolgte eine Fokussierung auf folgende charakteristische Sondenatome:

- C.3 als hydrophobes Ligandenatom,
- C.ar für die Identifizierung aromatischer Interaktionsfelder,
- O.2 und O.co2 repräsentieren klassische H-Brückenakzeptoren und
- N.3 und N.am, die vor allem potenzielle H-Brückendonoren repräsentieren.

Die Positionen der berechneten hydrophoben und aromatischen Wechselwirkungsfelder zeigen deutliche Überschneidungen und können daher als nahezu identisch angesehen werden. Bei einem Konturlevel (K.I.) von je 0,60 werden deutliche *hot spots* an zwei separaten Regionen angezeigt. Eine Kontur befindet sich in der katalytischen Subtasche mittig zwischen Trp20 und Trp111 (a), direkt an der Stelle, an der generell das Ringsystem der Pyridazinonreste bekannter Inhibitoren bindet. Weitere Interaktionspunkte befinden sich in Übereinstimmung mit der Lage aromatischer Ligandensysteme in Komplexstrukturen zentral innerhalb der Spezifitätstasche, gegenüber Trp111 (b) und unterhalb der Ligandenbindestelle, im Bereich der relevanten Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 (c).

Weiterhin konnten innerhalb der Bindetasche mehrere Bereiche detektiert werden, die für die Besetzung mit hydrophilen Ligandatomen prädestiniert sind, gerichtete Interaktionen mit dem Protein einzugehen. Für H-Brückenakzeptoren wurden im Wesentlichen vier Bereiche identifiziert: Innerhalb der Anionen-Bindetasche, um ein H-Brückennetzwerk mit Tyr48, His110 und Trp111 auszubilden und, wo eine entsprechende Ankergruppe zukünftiger Liganden binden sollte (d); im Bereich der hinteren Spezifitätstasche, geeignet für eine Wechselwirkung mit der Seitenkette des Thr113 (e); innerhalb der relevanten Subtasche für mögliche Interaktionen mit Leu300 und Tyr309 (f) sowie beidseitig benachbart zu Ala299 (g) (K.I. 0,40).

Für die Sondenatomtypen N.3 (K.I. 0,70) und N.am (K.I. 0,60), deren *hot spots* stellvertretend für alle potenziellen H-Brückendonoren bei dieser Analyse fungierten, wurden folgende Positionen beobachtet: Innerhalb der katalytischen Subtasche an der Stelle, an der die Stickstoffatome der Pyridazinon-Ankergruppen liegen (h); in der Spezifitätstasche benachbart zum Thr113 (i) und in der unteren Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 (j), geeignet für eine Adressierung des Leu300 Sauerstoffatoms sowie im Eingangsbereich der Bindetasche (k) für mögliche Interaktionen mit Ala299.

Als Randnotiz sei abschließend erwähnt, dass sich innerhalb der Bindetasche, speziell im Bereich der Spezifitätstasche, eine Vielzahl an *hot spots* für Halogenatome finden ließ. Diese theoretischen Vorhersagen stimmen mit kristallographisch bestimmten Halogenatom-

positionen der Liganden überein und erklären, warum eine Vielzahl bekannter AR-Inhibitoren über mindestens ein Halogenatom verfügt.

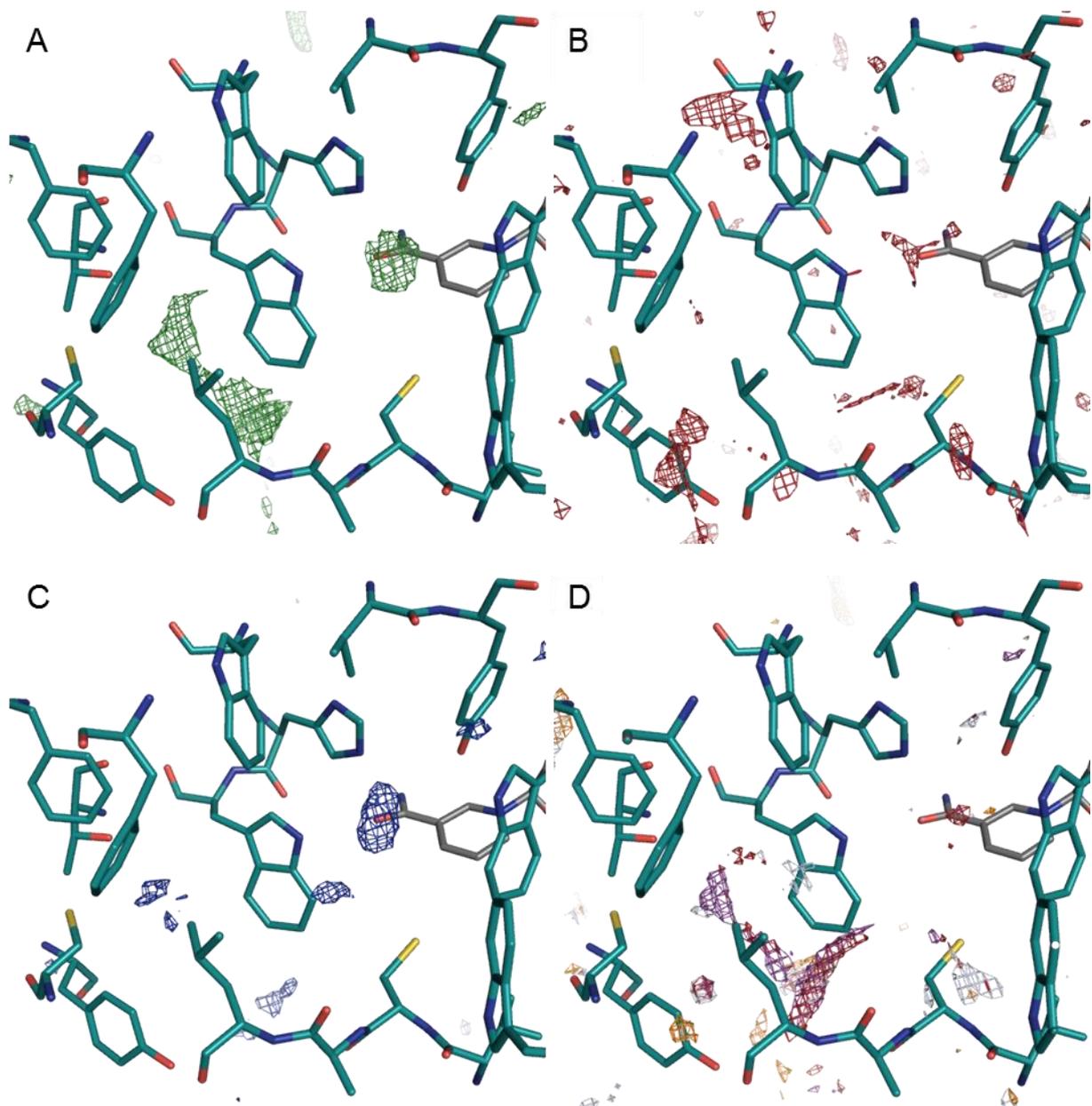


Abb. 19. Darstellung relevanter Interaktionsbereiche innerhalb der unmittelbaren Bindetasche der MD-generierten Proteinkonformation. Darstellung der mittels *DrugScore^{CSD}* berechneten Interaktionspunkte für verschiedene Sondenatome. **A)** C.3, C.ar (grün) **B)** O.2, O.co2 (rot) **C)** N.3, N.am (blau) **D)** Halogenatome Br (rot), F (orange), I (violett) (K.I. 0,65) Cl (hellblau) (K.I. 0,28).

Vorhersage günstiger Wechselwirkungspunkte mit MOE

Ergänzend zu der *DrugScore^{CSD}*-basierten Suche, wurde eine weitere Untersuchung mit dem im Softwarepaket *MOE⁵⁴* implementierten Tool *Surfaces and Maps* durchgeführt. Die Ergebnisse dienen in erster Linie als Orientierungshilfen bei der nachfolgenden Erstellung

von Pharmakophormodellen mit *MOE*, als auch für eine Überprüfung der bisherigen Ergebnisse.

Als Bindetaschendefinition dieser Analyse dienten erneut alle Aminosäuren innerhalb 20 Å um den ursprünglich gebundenen Liganden. Zunächst wurde eine grobe Unterteilung der Bindetasche in hydrophobe und hydrophile Bereiche durch Berechnung der *Contact Preference Maps* vorgenommen und bei verschiedenen Konturierungsleveln betrachtet. Die einzelnen Level entsprechen den jeweiligen prozentualen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Sondentyps an den Positionen der dargestellten Konturen innerhalb der Bindetasche. Bei der Analyse wurden ausschließlich Konturen mit Aufenthaltswahrscheinlichkeiten zwischen 90 und 100% begutachtet.

Weiterhin wurden durch Berechnung von *Electrostatic Maps* elektrostatisch bevorzugte Positionen für hydrophobe Reste, H-Brückenakzeptoren sowie -donoren ermittelt und ebenfalls bei verschiedenen Konturierungsleveln untersucht. Dabei entsprachen die jeweils dargestellten Felder denjenigen Stellen, an denen der Sondentyp ein definiertes Interaktionspotenzial besitzt. Die mit *MOE* berechneten Interaktionspunkte wiesen eine deutliche qualitative Übereinstimmung mit den jeweiligen *hot spots* der vorangegangenen Untersuchung auf und bestätigten somit deren Ergebnisse.

Durch die Berechnung molekularer Wechselwirkungsfelder mit den Programmen *DrugScore^{CSD}* und *MOE* wurde die MD-generierte Bindetaschenkonformation hinsichtlich bestimmter physiko-chemischer Eigenschaften charakterisiert und kartographiert. Die Identifizierung günstiger Positionen für bestimmte Atomtypen bzw. Ligandenfunktionen innerhalb des aktiven Zentrums bekräftigte und ergänzte die Informationen der vergleichenden Proteinstrukturanalyse, auf deren Grundlage im nächsten Schritt des virtuellen Screenings verschiedene Pharmakophorhypothesen postuliert worden sind.

III.4.2.1.3 Pharmakophorhypothesen und virtuelle Datenbanksuchen

Die Umsetzung der Pharmakophorhypothesen in dreidimensionale Pharmakophormodelle (siehe Abschnitt II.3.1), die als Suchanfragen und Filterkriterien bei virtuellen Moleküldatenbanksuchen fungierten, erfolgte mit dem Programmpaket *MOE* (Version 2007.09). Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Analysen wurden folgende Anforderungen an die chemische Konstitution der gesuchten Ligandenmoleküle gestellt:

-Vorhandensein einer hydrophilen Kopfgruppe, bestehend aus H-Brückenakzeptoren, vorzugsweise mit negativer Ladung, um H-Brücken mit den Aminosäuren der katalytischen Subtasche sowie ladungsgestützte Interaktionen mit dem Nikotinamidrest des NADP⁺ auszubilden (z.B. Carboxyl-, Hydantoin- oder Pyridazinongruppen);

-Öffnung der Spezifitätstasche durch ein rigides hydrophobes Fragment, vorzugsweise ein aromatisches System, um konformationelle Freiheitsgrade der Liganden gering zu halten und die Ausbildung von π - π -Kontakten mit Trp111 zu ermöglichen sowie das Grundgerüst der Liganden an einer bestimmten Position innerhalb der Spezifitätstasche zu positionieren;

-Vorhandensein eines hinsichtlich Größe und physiko-chemischer Eigenschaften geeigneten Substituenten um die neue Subtasche zu adressieren (z.B. einem Phenylring).

Entwicklung des finalen Pharmakophormodells

Unter Berücksichtigung der postulierten Richtlinien wurden verschiedene Pharmakophorhypothesen aufgestellt und mit Hilfe von MOE als Pharmakophormodelle umgesetzt. Dabei handelte es sich, um einen iterativen Optimierungsprozess, bei dem es stets galt, einen Kompromiss zwischen ausreichender Spezifität und zu hoher Restriktivität zu finden. Auf der einen Seite sollten die während der Datenbanksuchen identifizierten Moleküle spezifisch bezüglich der Zielkonformation sein, auf der anderen Seite war es wünschenswert, eine Vielfalt verschiedener Grundgerüste (*Scaffolds*) zu finden.

Nach zahlreichen Entwicklungszyklen, bestehend aus Pharmakophormodellkonstruktion mit anschließendem Screening, visueller Analyse der identifizierten Moleküle und Modifizierung der Pharmakophormodelle entstand schließlich das in Abbildung 20 sowie Tabelle 2 dargestellte Modell.

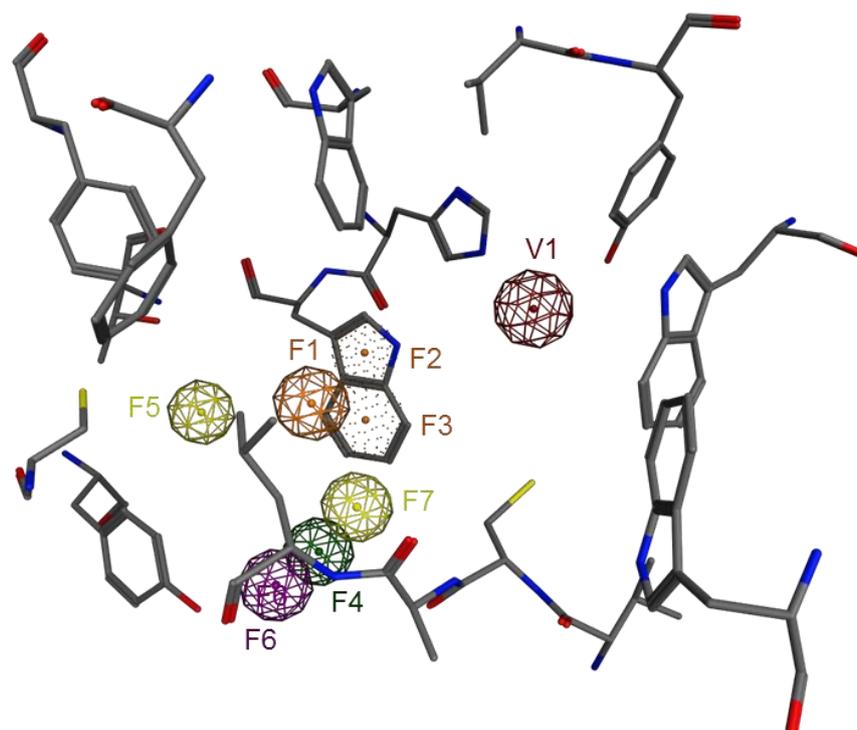


Abb. 20. Darstellung des finalen Pharmakophormodells in der Bindetasche der Templatkonformation.

Dieses Pharmakophormodell setzt sich aus insgesamt elf Definitionen zusammen, bestehend aus zwei Volumina, sieben Pharmakophorfeatures und zwei Bedingungen (*Constraints*). Die Platzierung der einzelnen Pharmakophorbbestandteile in der Bindetasche erfolgte anhand der jeweiligen *hot spots*.

Als Ankergruppe wurde eine Carboxylatgruppe gewählt, da sich Carboxylate bei vielen bekannten AR-Inhibitoren bereits bewährt haben und zuverlässig an einer spezifischen Position in der Anionen-Bindetasche binden. Die Definition eines *included volumes* (V1) wurde an entsprechender Stelle anhand der berechneten *hot spots* (d) platziert, um optimale Wechselwirkungen mit den drei Aminosäuren Tyr48, His110 und Trp111 sowie dem Nikotinamidrest des NADP⁺ zu gewährleisten. Die Definition des Volumens erfolgte durch einen SMILES-String.

Um die offene Spezifitätstasche zu adressieren wurde ein *feature* (F1) mit der Eigenschaft aromatisch an einer Stelle (b) gegenüber Trp111 positioniert, um π - π -Wechselwirkungen einzugehen. Da diese Anforderung für eine bestimmte Ausrichtung des aromatischen Systems unabdingbar war, wurden weiterhin zwei *projected features* (F2, F3) auf die Zentren der beiden Ringe des Trp111 gesetzt, die zusätzlich dafür sorgten, dass identifizierte Moleküle prinzipiell geeignet waren, die gewünschten Kontakte tatsächlich auszubilden. *Constraint* C1 forderte, dass mindestens entweder F2 oder F3 durch geeignete Substrukturen der Kandidatenmoleküle adressiert werden mussten. Ein weiteres

essenzielles *feature* bildete F4, welches bei Interaktionspunkt (c) innerhalb der Subtasche Ala299/Leu300-Tyr309 lokalisiert ist und die Besetzung durch aromatische, π -Ring- oder allgemein hydrophobe Substrukturen forderte. Ein Vergleich des Pharmakophormodells mit der auf Rang 1 geführten Dockinglösung des Pyridazinonderivats **4** bezüglich der Templatkonformation zeigte, dass die Platzierungen des aromatischen Ringsystems und des Phenylrings genau mit den Positionen von F1 und F4 übereinstimmten.

Neben den Pharmakophorbestandteilen V1, F1 und F4, die das Grundgerüst bildeten, bestand das Modell noch aus drei hydrophilen *features*, wovon mindestens eins durch entsprechende Funktionalitäten erfüllt werden musste. Zur Ausbildung einer H-Brücke mit Thr113 wurde F5 im Bereich der hinteren Spezifitätstasche positioniert (e). Letztlich wurde der Substituent F4 innerhalb der Subtasche durch die Funktionalitäten F6 und F7 erweitert, um gerichtete Wechselwirkungen mit der OH-Gruppe von Tyr309 oder der NH-Gruppe von Leu300 (F6) einzugehen bzw. um mit dem Sauerstoffatom von Cys298 oder Ala299-NH (F7) zu interagieren. Mindestens eins der beiden *features* musste adressiert werden (C2). Die Einführung dieser drei H-Brückenakzeptor- bzw. -donorfunktionen (F5-7) diente vor allem einer möglichen Affinitätserhöhung, der Verankerung an bestimmten Positionen und nicht zuletzt der Löslichkeitserhöhung der gesuchten Kandidatenmoleküle.

Vervollständigt wurde das Pharmakophormodell durch zahlreiche *excluded volumes*, die alle Aminosäuren der Bindetasche beinhalteten und einen Bereich repräsentierten, innerhalb dessen keine Atome der Datenbankverbindungen während des Screenings liegen durften, um als *hit* identifiziert zu werden. Durch die Definition dieser Volumina war es möglich, die Form der Bindetasche während des Suchprozesses zu imitieren um den für die Liganden zur Verfügung stehenden Platz zu begrenzen.

Der deutlich vergrößerte Abstand zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 bedingt nicht nur die Entstehung einer Subtasche, sondern auch eine zusätzliche moderate Öffnung der Spezifitätstasche zum Solvens. Dies führte während den Datenbanksuchen im Rahmen des Pharmakophormodelloptimierungsprozesses zu einer Identifizierung mehrerer Liganden, die über voluminöse hydrophobe Substituenten (wie z.B. Naphtylreste) verfügten und die bei Ligandenkonformationen, welche das Pharmakophormodell erfüllten, in das Solvens ragten. Da davon auszugehen war, dass diese Verbindungen mit derartig großen Substituenten aufgrund sterischer Hinderung nicht in der Lage sein würden, den Eingang der Spezifitätstasche in Form des Segments Val297-Leu300 passieren zu können bzw. dabei zu größeren strukturellen Konformationsänderungen der Bindetasche führen würden, war das Risiko keiner Ligandenbindung sowie der Adressierung einer anderen Proteinkonformation zu groß. Auch aus thermodynamischer Sicht hätte die Platzierung einer hydrophoben Substruktur im polaren Solvens ungünstige energetische Auswirkungen. Um einer

Identifizierung solcher Moleküle vorzubeugen, wurde das Pharmakophormodell für die finale virtuelle Datenbanksuche noch um zusätzliche, manuell platzierte *excluded volumes* erweitert, welche die Öffnung unterhalb der Subtasche versperrten und die Restriktivität des Pharmakophormodells weiter erhöhten.

Damit Datenbankmoleküle vom Pharmakophormodell als *hits* erkannt wurden, mussten die Verbindungen über eine Carboxylatgruppe verfügen, alle essenziellen *features* aufweisen, beide *constraints* erfüllen und eine entsprechende Größe besitzen, d.h. es durften keine Atome innerhalb der *excluded volumes* liegen.

ID	Status	Definition	Radius [Å]	Hot spot
V1	essenziell	Carboxylat:C(=O)[O-]	1,2	d
F1	essenziell	aro	1,1	b
F2		PiN	1,0	-
F3		PiN	1,2	-
F4	essenziell	aro PiR Hyd	1,0	c
F5		Akz Don	1,0	e
F6		Akz	1,0	f
F7		Akz Don	1,0	g
V2	essenziell	<i>excluded volumes</i>	variierend	-
C1	essenziell	at least one F[2,3]	-	-
C2	essenziell	at least one F[6,7]	-	-

Tab. 2. Überblick über die einzelnen Bestandteile des finalen Pharmakophormodells. Bedeutung der Abkürzungen: „aro“ aromatisches System, „Akz“ H-Brückenakzeptor, „Don“ H-Brückendonor, „Hyd“ hydrophober Rest, „|“ oder, „PiR“ π -Ringzentrum, „PiN“ dient der Definition eines potenziellen Interaktionspartners des Liganden von Seiten des Rezeptors und als Vorgabe für die Orientierung eines π -Ringsystems des Liganden.

Pharmakophorbasierte Datenbanksuche

Die bei der Suche nach neuen Liganden der AR durchsuchte Moleküldatenbank bestand aus 660.960 leitstrukturähnlichen Verbindungen, die von der *Chemical Computing Group*⁵⁴ (CCG) aus öffentlichen Katalogen diverser kommerzieller Anbieter in Form einer MOE-Datenbank (CCG-Datenbank) zusammengestellt worden sind. Um diese Datenbank für ein pharmakophorbasiertes Screening aufzubereiten, wurden von der CCG für jedes Molekül bis zu 500 Konformationen durch Verwendung des MMFF94x-Krafffeldes generiert.

Die virtuelle Datenbanksuche mit dem finalen Pharmakophormodell führte zur Identifizierung von **256** Verbindungen, die alle notwendigen strukturellen Voraussetzungen erfüllten. Bei der

nachfolgenden visuellen Begutachtung der Verbindungen wurde ersichtlich, dass eine Vielzahl der Moleküle relativ viele rotierbare Bindungen aufwiesen, wodurch jeweils große Konformationsräume für diese Verbindungen resultierten. Dementsprechend würden für derartige Moleküle in wässriger Lösung zahlreiche Konformere nebeneinander existieren. Je mehr rotierbare Bindungen in einem Molekül enthalten sind, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass genau diejenige Ligandenkonformation eingenommen wird bzw. durch Protein-Ligand-Wechselwirkungen induziert wird, die benötigt wird, um die gewünschte Bindetaschenkonformation zu stabilisieren. Weiterhin wird es mit jeder rotierbaren Bindung für Dockingprogramme schwieriger aus der potenziell verfügbaren Konformationsvielfalt plausible Bindungsmodi zu berechnen, wodurch wiederum die Aussagekraft der Dockinglösungen sinkt. Aus diesem Grund wurde die Entscheidung getroffen, die Konformationsfreiheitsgrade der Kandidatenmoleküle zu begrenzen und die Anzahl an zulässigen rotierbaren Bindungen zwischen Schweratomen auf ein Maximum von 5 zu begrenzen. Durch diesen zusätzlichen Filterschritt, umgesetzt durch Ermittlung der rotierbaren Bindungen mit *MOE*, wurde die Anzahl der Kandidatenmoleküle von **256** auf **82** Verbindungen erniedrigt. Diese Moleküle wurden im nächsten Schritt mit dem Programm *AutoDock3.0* in die MD-generierte Bindetaschenform gedockt, um die potenziellen Bindungsmodi und Bindungsaffinitäten zu untersuchen (siehe Abschnitt III.4.3).

III.4.2.2 Ligandbasierter Ansatz

Als Ergänzung zum proteinbasierten Ansatz wurde eine ligandbasierte Strategie zur Identifizierung potenzieller Kandidatenmoleküle verfolgt. Da keine experimentell bestätigten Liganden der MD-generierten Bindetaschenkonformation bekannt waren, stützte sich der Ansatz auf die Hypothese, dass der Pyridazinon-Inhibitor **4** (siehe Abschnitt III.3) einen möglichen Kandidaten repräsentieren könnte, der die neue Bindetaschenform stabilisiert. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse vergleichender Dockingsimulationen weiter bekräftigt (siehe Abschnitt III.4.1). Daher fungierte Verbindung **4** als Referenzstruktur während zwei weiterer Datenbanksuchen, die mit dem Programm *FeatureTreesXL*¹⁶⁹ (Version 1.1.4) ausgeführt worden sind. Das Programm berechnet auf der Grundlage zweidimensionaler Molekülstrukturen molekulare Ähnlichkeiten zwischen Referenzliganden und den Verbindungen einer Datenbank. Eine nähere Beschreibung der Methodik von *FeatureTreesXL* (*FTreesXL*) findet sich in Kapitel II.3.2.

III.4.2.2.1 Aufbau einer Pyridazinon-Moleküldatenbank

Die Intention der ersten ligandbasierten virtuellen Datenbanksuche bestand darin, potenzielle Kandidatenmoleküle zu identifizieren, die in Analogie zu den bekannten AR-Inhibitoren **1-4** (siehe Kapitel III.3) über eine Pyridazinonsubstruktur als Ankergruppe verfügten. Da es in dem Programm *FTreesXL* im Gegensatz zu Pharmakophormodellen nicht möglich war, eine bestimmte Kopfgruppe zu definieren, die in allen gesuchten Verbindungen als notwendige Grundvoraussetzung enthalten sein sollte, wurde bereits im Vorfeld eine Datenbank, die ausschließlich aus Pyridazinonderivaten bestand, erstellt.

Der erste Schritt des sukzessiven Prozesses bestand darin alle Moleküle, die innerhalb des *drug-like Subsets* der Moleküldatenbank ZINC 8¹⁷⁰ (~5 Millionen niedermolekulare Verbindungen) über eine unsubstituierte Pyridazinon-Substruktur verfügten, zu identifizieren. Die Durchführung bestand in einer 2D-Suche, wofür das Programm *FILTER* von OpenEye¹⁷¹ verwendet worden ist und der SMART-String [cH]1:[cH]c(=O)[nH]n:c1(*) als Referenz diente. Durch diese Suchanfrage konnten insgesamt **862** Pyridazinonderivate innerhalb der Ausgangsdatenbank gefunden werden, die im Anschluss mit Hilfe des Tools *OMEGA*¹⁷² von 2D- in 3D-Moleküle umgewandelt und als „mol2“-Format abgespeichert wurden. Abschließend wurden alle dreidimensionalen Molekülstrukturen in einer *MOE*-Datenbank zusammengefasst.

III.4.2.2.2 Ligandbasierte Datenbanksuchen mittels FeatureTreesXL

Nach dem Aufbau einer Pyridazinon-Datenbank wurde diese mit dem Programm *FTreesXL* und anhand des AR-Inhibitors **4** als Referenzstruktur nach potenziellen Kandidatenmolekülen durchsucht. Nach der Berechnung molekularer Ähnlichkeiten wurde die jeweilige Anzahl resultierender *hits* für einen Ähnlichkeitsbereich von 80 bis 90% in Bezug auf den Referenzliganden bestimmt (siehe Tab. 3), einhergehend mit einer stichprobenartigen Inspektion mehrerer Molekülstrukturen, um Zusammenhänge zwischen berechneter Ähnlichkeit und chemischer Konstitution eines Moleküls herstellen zu können.

Ähnlichkeit [%]	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Hits	111	91	65	46	26	12	8	5	4	4	2

Tab. 3. Übersicht über die Anzahl an Molekülen mit berechneten Ähnlichkeitswerten zwischen 80 und 90% in Bezug auf den als Referenzliganden verwendeten AR-Inhibitor **4**.

Letztlich wurden alle Verbindungen mit einer berechneten Ähnlichkeit von mindestens 80% gegenüber der Referenzstruktur für das weitere Vorgehen ausgewählt, wodurch sich die Molekülanzahl der Ausgangsdatenbank um ca. 1/8 auf **111** Strukturen verringerte. Nach dieser Vorauswahl wurden die verbliebenen Verbindungen einer intensiven visuellen Überprüfung bezüglich der konstitutionellen Eignung, die gewünschte Proteinkonformation stabilisieren zu können, unterzogen. Dabei wurden **72** Verbindungen unter Berücksichtigung bekannter Interaktionsmotive publizierter AR-Ligand-Komplexe aufgrund ihrer Struktur (z.B. Größe, Fehlen bestimmter Substituenten) als ungeeignet eingestuft (siehe Abb. 21).

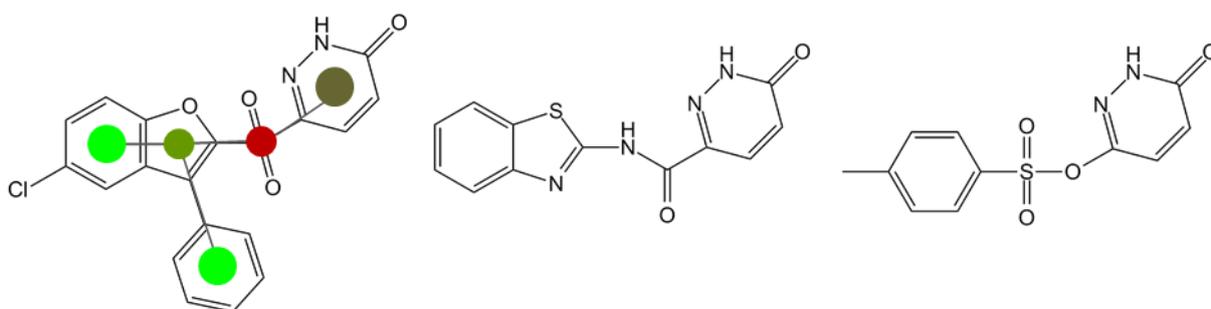


Abb. 21. Überlagerung des Referenzliganden (AR-Inhibitor 4) mit dem generierten *FeatureTree* (links). Beispiele aussortierter Verbindungen (mitte, rechts), die aufgrund ihrer chemischen Konstitution, in diesem Fall dem Fehlen eines Substituenten für die Adressierung der Subtasche zwischen Ala299/Leu300-Tyr309, nicht als Kandidatenmoleküle in Frage kamen.

In Folge dessen blieben aus der erstellten Pyridazinondatenbank lediglich **39** Moleküle für das weitere Vorgehen übrig. Wäre man jedoch schon bei der Vorauswahl restriktiver vorgegangen, indem man ausschließlich Verbindungen mit einer berechneten Ähnlichkeit > 80% ausgewählt hätte, wären einige vielversprechende Kandidatenmoleküle unberücksichtigt geblieben. Diese Beobachtungen zeigen deutlich den Nachteil dieses Verfahrens gegenüber Pharmakophormodellen unter dem Aspekt, Moleküle zu identifizieren, die alle über eine bestimmte chemische Konstitution verfügen sollen, da hierbei keine Substrukturen einer Referenzstruktur als essenziell definiert werden können. Ebenso verdeutlicht dieses Beispiel die Notwendigkeit der kontinuierlichen kritischen Überprüfung computergenerierter Ergebnisse, um gegebenenfalls korrigierend eingreifen zu können.

In Ergänzung zu dem Screening der Pyridazinon-Datenbank wurde eine weitere Datenbanksuche mit *FTreesXL* und Molekül **4** als Referenzligand durchgeführt, um die Anzahl potenzieller Kandidatenmoleküle zu erhöhen und um weitere Grundgerüste zu identifizieren. Als Moleküldatenbank diente eine arbeitskreisinterne Variante des *druglike Subsets* der öffentlich zugänglichen ZINC-Datenbank (Version 8), die durch Anwendung verschiedener Filterkriterien, wie z.B. dem Entfernen hochgradig reaktiver Funktionalitäten

und weiterer sogenannter *unwanted groups*, prozessiert worden ist und ~2,9 Millionen niedermolekulare Verbindungen enthielt.¹⁷³ Im Folgenden wird diese Datenbank als Interne-Datenbank bezeichnet.

Nach entsprechender Bestimmung der für jedes Ähnlichkeitsniveau im Bereich zwischen 80 und 95% resultierenden Anzahl an *hits* sowie einer stichprobenartigen visuellen Inspektion der Verbindungen von jedem Ähnlichkeitslevel, wurde letztlich die Entscheidung getroffen, alle **352** Moleküle mit einer Übereinstimmung von $\geq 90\%$ mittels Dockingsimulationen auf ihre potenziellen Bindemodi zu untersuchen.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Suchen, wurde diesmal von vornherein darauf verzichtet, eine bestimmte Funktionalität als Ankergruppe vorzugeben, was zu einer großen Vielfalt an Grundgerüsten mit potenziell neuen, alternativen und bioisosteren¹⁷⁴ Kopfgruppen führte. Als bioisoster werden in Anlehnung an Alfred Burger¹⁷⁵ Moleküle bzw. funktionelle Gruppen bezeichnet, die bei fast identischer Molekülform und Volumen sowie einer ungefähr gleichen Elektronenverteilung ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen und eine vergleichbare biologische Wirkung besitzen. So sind z.B. Hydroxamsäuren, Sulfonsäuren, Phosphonsäuren und Tetrazole der Carboxylgruppe bioisostere Funktionalitäten, die als potenzielle Ankergruppen in Frage kämen. Um zu gewährleisten, dass nur Verbindungen mit potenziell geeigneten Ankergruppen für das weitere Vorgehen ausgewählt wurden, war es notwendig alle Moleküle visuell auf das Vorhandensein entsprechender funktioneller Gruppen zu überprüfen. Die Mehrzahl der **352** identifizierten Verbindungen verfügte über endständige Funktionalitäten, die geeignet erschienen, um an die katalytische Subtasche der AR zu binden. Neben zahlreichen Carboxylaten und verschiedenen Heterozyklen (wie z.B. Oxole, Triazole, usw.) wurden auch einige Lactame sowie Sulfonamide erfasst. Eine weitere Bewertung, ob die gefundenen Funktionalitäten tatsächlich geeignete Ankergruppen darstellen, erfolgte im nächsten Schritt des virtuellen Screenings während der Auswertung der durch Dockingsimulationen berechneten Bindeposen. Lediglich **35** Verbindungen wurden bereits vorab verworfen, da diese keine geeignete bzw. keine polare endständige Kopfgruppe aufwiesen. Somit blieben noch **317** Verbindungen aus diesem Ansatz für weitere Analysen übrig.

III.4.2.3 Zusammenfassung der virtuellen Datenbanksuchen

Basierend auf zwei unterschiedlichen Strategien, einem protein- und einem ligandbasierten Ansatz sowie durch die Anwendung zweier verschiedener Screeningverfahren wurden drei Moleküldatenbanken, die insgesamt ~3,56 Millionen niedermolekulare Verbindungen ent-

hielten, spezifisch nach potenziellen Kandidatenmolekülen durchsucht. Trotz grundlegender Unterschiede der angewandten Methoden zeigte die Mehrzahl der identifizierten Verbindungen deutliche Gemeinsamkeiten hinsichtlich des Grundgerüsts, das vereinfacht als T- bzw. Y-artig bezeichnet werden könnte (siehe Abb. 22).

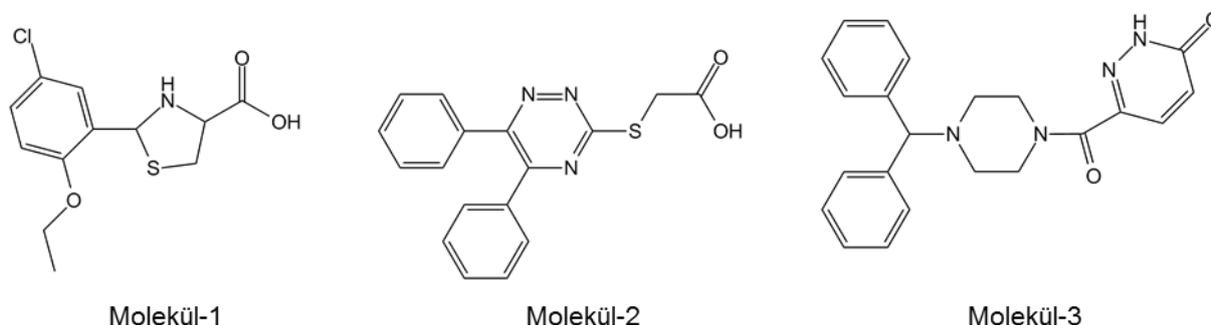


Abb. 22. Repräsentative Beispiele von durch virtuelle Datenbanksuchen identifizierten Verbindungen mit einer T- bzw. Y-artigen Konstitution.

Der resultierende, **438** Verbindungen umfassende Molekülsatz an virtuellen *hits* war detaillierten, computerbasierten Analysen zugänglich und wurde in weiterer Folge bezüglich des Potenzials, die MD-generierte Proteinkonformation zu adressieren und die Zielsetzung zu erfüllen, näher analysiert. Eine entscheidende Bedeutung kam dabei Dockingsimulationen zu, bei denen die Moleküle als Liganden in die neue Bindetaschenform eingepasst wurden.

III.4.3 Dockingsimulationen der virtuell identifizierten Verbindungen:

Untersuchung der Bindemodi und Bindungsaffinitäten

Überprüfung der Vorhersagekraft des Dockingprogramms AutoDock3.0 mittels Re-Dockingexperimenten

Bevor die **438** durch Datenbanksuchen gefundenen Kandidatenmoleküle mit Hilfe von Dockingverfahren auf Bindemodi und Bindungsaffinitäten hinsichtlich der MD-generierten Proteinkonformation untersucht werden konnten, galt es das hierfür ausgewählte Dockingprogramm *AutoDock3.0* für das Zielenzym Aldose Reduktase und insbesondere bezüglich Liganden mit Carboxylat- oder Hydantoin-Ankergruppen hinsichtlich dessen Vorhersagekraft zu überprüfen. Dabei wurde überprüft, ob mit den gewählten Einstellungen der Dockingparameter prinzipiell plausible Dockinglösungen generiert werden konnten. Für diese Aufgabenstellung wurde abermals eine Re-Dockingstudie durchgeführt (vgl. Abschnitt III.4.1).

Die Re-Dockingexperimente wurden erneut mit *AutoDock3.0* durchgeführt und basierten auf den vier PDB-Strukturen 1AH0, 1AH3, 1US0 sowie 2FZ8, wodurch alle drei bekannten Haupt-Bindetaschenformen berücksichtigt wurden. Die jeweils angewandte Vorgehensweise bei der Aufbereitung entsprechender binärer AR-NADP⁺-Komplexe für die Berechnung der benötigten Affinitätsgitter, die Aufbereitung der Ligandenmoleküle sowie die verwendeten Dockingprotokolle entsprachen den in Abschnitt III.4.1 umfassend beschriebenen Ausführungen.

Die drei Inhibitoren Tolrestat, IDD594 und Zopolrestat, die alle über eine Carboxyl-Ankergruppe verfügen, wurden als Carboxylate in das aktive Zentrum gedockt. Weiterhin wurden für jeden der vier Liganden jeweils zwei Dockingprozesse durchgeführt, wobei sowohl die Bindungskonformation als auch eine minimierte Ligandenkonformation als Ausgangspunkte dienten. Der Minimierungsprozess erfolgte mit *SYBYL 8.0*¹⁶⁸, das dabei verwendete Protokoll nutzte das Tripos Kraftfeld⁷⁵ sowie die Methode nach Powell, einen Terminierungsgradienten von 0,005 kcal/(mol*Å) und eine zulässige maximale Anzahl von 1000 Schritten. Für jeden Liganden wurden je 50 Dockinglösungen generiert, die Gruppierung der Bindungsposen erfolgte gemäß einer definierten Toleranz von 1,0 Å. Die Beurteilung der Reproduzierbarkeit reeller Bindemodi sowie der Güte der Dockinglösungen erfolgte jeweils durch die Berechnung der *root-mean-square deviation* (RMSD) zwischen den beiden Dockinglösungen jedes Inhibitors, die von *AutoDock3.0* auf Rang 1 geführt worden sind und der jeweils kristallographisch bestimmten Ligandenkonformation. Für die Visualisierung der generierten Dockinglösungen wurde *PyMOL* verwendet. Tabelle 4 liefert eine Übersicht der erzielten Resultate der durchgeführten Re-Dockingstudien.

PDB-Code	Ligand	RMSD [Å]	Clustergröße Rang1
1AH0	Sorbinil	0,18	50 Lösungen
1AH3	Tolrestat	1,29	23 Lösungen
1US0	IDD594	1,81	6 Lösungen
1Z89	Pyridazinon-Inhibitor	0,35	50 Lösungen
2FZ8	Zopolrestat	1,12	38 Lösungen

Tab. 4. Ergebnisse der Re-Dockingstudien für die jeweils nicht-minimierten Ausgangsstrukturen der Liganden.

Die von *AutoDock3.0* generierten Dockinglösungen belegten eindeutig die Eignung der gewählten Einstellungen, um plausible Dockinglösungen bekannter AR-Inhibitoren für die verschiedenen Bindetaschenkonformationen vorherzusagen, da es die verwendeten

Einstellungen in fünf Fällen durchweg ermöglichten, die experimentell aufgeklärten Bindemodi nahezu identisch zu reproduzieren. Generell wird in diesem Zusammenhang eine ermittelte Abweichung von einem RMSD-Wert unter 2 Å zwischen Dockinglösung und tatsächlichem Bindemodus als zufriedenstellend angesehen. Die resultierenden Vorhersagen der vorab zusätzlich minimierten Ligandenmoleküle entsprachen denen der unveränderten, nicht minimierten Ligandenstrukturen in Bezug auf berechnete RMSD-Werte sowie der Gruppierung der Dockinglösungen. Basierend auf diesen Erkenntnissen gelang es dem Programm auch unter diesen Voraussetzungen, d.h. einer Modifizierung der Ausgangskonformation durch Minimierung, die tatsächlichen Bindemodi zu reproduzieren und somit die Eignung des verwendeten Dockingprotokolls zu bestätigen.

Dockingsimulationen der identifizierten Kandidatenmoleküle

Nach der erfolgreichen Überprüfung der Eignung des Dockingprotokolls mittels Re-Dockingexperimenten wurden schließlich die **438** identifizierten Moleküle mit dem Programm *AutoDock3.0* in die Bindetasche der MD-generierten Proteinkonformation gedockt.

Die Dockingsimulationen basierten auf den für die neuartige Bindetaschenkonformation in Abschnitt III.4.1 beschriebenen Affinitätsgittern sowie dem dargestellten und validierten Dockingprotokoll. Die Aufbereitung der Ligandenmoleküle, inklusive Minimierungsprozess, erfolgte in Analogie zu der bereits beschriebenen Vorgehensweise mit *SYBYL 8.0*. Um die Aussagekraft der berechneten Dockinglösungen zu erhöhen und die Strukturinformationen so gut wie möglich den realen Bedingungen anzupassen, wurden die Protonierungszustände saurer bzw. basischer Substrukturen aller identifizierten Moleküle den pH-Werten des Inhibitions-Assays (pH: 6,2) und der Kristallisationsbedingungen (pH: 5,0) angepasst. Hierfür wurde zunächst das Programm *ACD/pKa 8.03*¹⁷⁶ für die Abschätzung von pK_s-Werten verwendet. *ACD/pKa 8.03* berechnet einzelne pK_s-Werte für alle vorhandenen Dissoziationszentren einer niedermolekularen Verbindung in wässriger Lösung mit einer Ionenstärke von 0 und einer Temperatur von 25°, wobei der restliche Teil des Moleküls als neutral angesehen wird. Die Genauigkeit der Vorhersagen wird mit ± 0,2 pK_s- bis ± 0,5 pK_s-Einheiten für komplexere Strukturen angegeben. Die Modifizierung der Protonierungszustände und Erstellung der jeweiligen Protomere, wobei bei nicht eindeutig vorhersehbaren Protonierungszuständen alle relevanten Protomere generiert und während der Dockingsimulationen berücksichtigt worden sind, erfolgte ebenfalls mit *SYBYL 8.0*.

Hinsichtlich der vorhandenen Ankergruppen wurden folgende Protonierungszustände gewählt: Alle Säurefunktionen, vor allem Carboxylgruppen, wurden in ihrer deprotonierten Form an das Enzym gedockt. Dieser Protonierungszustand konnte bereits für Carboxylankergruppen durch die hochaufgelöste Kristallstruktur 1US0 experimentell belegt werden.

Ebenso wurden alle Pyridazinone deprotoniert, obwohl bereits die Dockingstudie in Abschnitt III.4.1 zeigte, dass der Protonierungszustand des Pyridazinons eine untergeordnete Rolle, ohne relevanten Einfluss auf die korrekte Positionierung der Ankergruppe, spielte.

Für jeden Liganden wurden 50 Dockinglösungen generiert, die Gruppierung der Bindungsposen erfolgte gemäß einer Toleranz von 1,0 Å. Die Visualisierung der Dockinglösungen erfolgte abermals mit *PyMOL*. Die Auswertung der Dockingergebnisse bestand in einer visuellen Inspektion der Dockinglösungen aller Ligandenmoleküle, wobei überprüft wurde, ob die berechneten Bindemodi mit den tatsächlich ausgebildeten Wechselwirkungen bekannter AR-Inhibitor-Komplexe übereinstimmten. Dabei war es wichtig, dass folgende Kriterien, entsprechend den formulierten essenziellen Pharmakophorpunkten, von den Dockinglösungen erfüllt wurden: Adressierung der katalytischen Subtasche mit einer polaren Ankergruppe, Besetzung der Spezifitätstasche durch einen aromatischen Rest sowie Stabilisierung der Subtasche zwischen Tyr309 und Val297-Leu300 durch einen geeigneten Substituenten. Konnten diese Aspekte von der vom Dockingprogramm auf Rang 1 geführten Lösung bzw. einer energetisch vergleichbaren Lösung der untersuchten Verbindungen nicht erfüllt werden, wurde das Molekül von weiteren Analysen ausgeschlossen und verworfen.

Weiterhin wurde während der visuellen Begutachtung ersichtlich, dass für die Mehrzahl der Verbindungen plausible Dockinglösungen generiert werden konnten, jedoch erschienen die Bindemodi einer Vielzahl der potenziellen Kandidatenmoleküle ungeeignet, die gewünschte Bindetaschenkonformation zu stabilisieren. Für das weitere Vorgehen wurden während der visuellen Inspektion derartige Verbindungen aussortiert und nur an Molekülen mit überzeugenden Bindeposen festgehalten. Überraschenderweise waren davon auch zahlreiche Moleküle betroffen, denen man aufgrund ihrer 2D-Struktur prinzipiell zugetraut hätte, die Zielkonformation stabilisieren zu können. Von den **438** analysierten Verbindungen blieben lediglich **70** für weitere Analysen übrig (siehe Tab. 5). Die Anzahl an Kandidatenmolekülen wurde durch die Dockingexperimente auf nunmehr 16% des ursprünglichen Molekülsatzes reduziert.

Screeningansatz	Pharmakophormodell (CCG-DB)	FTreesXL (Pyridazinon-DB)	FTreesXL (Interne-DB)
Molekülanzahl	32	8	30

Tab. 5. Übersicht über die Anzahl der verbliebenen Moleküle der jeweiligen Datenbanken (DB) unter Berücksichtigung der verschiedenen Screeningstrategien.

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass die durchgeführten Dockingsimulationen ein entscheidendes Filterkriterium im virtuellen Screeningprozess darstellten und durch die Vorhersage möglicher Bindemodi eine erste detaillierte Beurteilung der identifizierten Moleküle ermöglichten.

III.4.3.1 Re-Scoring der Dockinglösungen mit SFCscore

Im Anschluss an die Dockingsimulationen, in deren Verlauf bereits erste Bindungsaffinitäten durch die in *AutoDock3.0* implementierte Scoringfunktion ermittelt worden sind, wurden die erhaltenen Dockinglösungen mit einer alternativen Bewertungsfunktion des Programms *SFCscore* (Version 1.0) analysiert.

Überprüfung der Vorhersagekraft von SFCscore anhand von AR-Inhibitor-Komplexen

Um vorab die Eignung des Programms sowie der Scoringfunktion SFC_290m zu überprüfen, wurden für elf AR-Inhibitor-Komplexstrukturen, von denen thermodynamisch bestimmte Bindungsaffinitäten vorlagen, mit Hilfe von *SFCscore* entsprechende pK_i -Werte berechnet, die anschließend mit den tatsächlichen pK_d -Werten verglichen wurden. Die benötigten pK_d -Werte wurden entweder anhand experimentell bestimmter ΔG -Werte berechnet oder stammten aus der *Binding Database*^{177,178}. Die Berechnung der pK_d -Werte anhand der freien Bindungsenthalpie erfolgte über Gleichung 12 mit der idealen Gaskonstanten R und der absoluten Temperatur T , durch die jeweilige Bestimmung der entsprechenden Bindungskontanten (K_b), deren reziproke Werte den Dissoziationskonstanten (K_d) entsprechen.

$$K_b = e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}} \quad (\text{Gl. 12})$$

Die Scoringfunktion SFC_290m wurde von allen verfügbaren Funktionen für diese Studie ausgewählt, da diese Funktion gemäß einer Kreuzvalidierung die Funktion mit der größten Vorhersagekraft aller mittels multipler linearer Regression abgeleiteten Funktionen von *SFCscore* darstellt.

Die Ergebnisse dieser Re-Scoringstudie sind in Tabelle 6 und Abbildung 23 dargestellt. Als ein Maß für die Korrelation zwischen thermodynamisch bestimmten pK_d -Werten und mittels *SFCscore* berechneten pK_i -Werten der ausgewählten AR-Inhibitor-Komplexe, wurde der quadrierte Pearson-Korrelationskoeffizient R^2 von 0,54 berechnet.

PDB-Code	Inhibitor	pK _d (ITC)	pK _i (SFCscore)	Δ	Abweichung [%]
1AH0	Sorbinil	6,7 ^{179§}	7,1 [‡]	0,4	5,5
1AH3	Tolrestat	6,7 ^{179§}	7,0 [‡]	0,3	4,2
1PWM	Fidarestat	8,2 ¹⁷⁹	7,2	1,0	11,7
1US0	IDD594	7,2 ¹⁷⁹	7,5	0,3	4,2
1Z89	Pyr-Inh	6,0 ¹⁶¹	9,1	3,1	51,7
2AGT	Fidarestat	6,8 ¹⁷⁹	6,5	0,3	4,3
2FZ8	Zopolrestat	8,3 ¹⁶⁰	9,2	0,9	11,1
2FZD	Tolrestat	6,7 ¹⁷⁹	6,9	0,2	3,0
2IKH	LIT	5,5 ¹⁸⁰	6,6	1,1	20,2
2IKI	IDD388	7,5 ¹⁷⁹	7,8	0,3	4,1
2IKJ	IDD393	7,4 ¹⁷⁹	7,6	0,2	2,2
Mittelwert				0,5 ± 0,4*	7,1 ± 5,6*

Tab. 6. Übersicht über den verwendeten Datensatz der mit *SFCscore* durchgeführten Re-Scoringstudie. Neben der Angabe der verwendeten Kristallstrukturen durch PDB-Code und Namen der Liganden (Pyr-Inh: Pyridazinon-Inhibitor) werden die thermodynamisch bestimmten pK_d- und von *SFCscore* berechneten pK_i-Werte sowie die jeweils resultierende Differenz und prozentuale Abweichung angegeben. Für die Berechnung der Mittelwerte blieben die Daten hinsichtlich des AR-Ligand-Komplexes 1Z89 unberücksichtigt (*). [§] Experimentelle Messung des pK_d-Werts unter Verwendung humaner AR. [‡] Berechnung des pK_i-Werts anhand der porcinen AR.

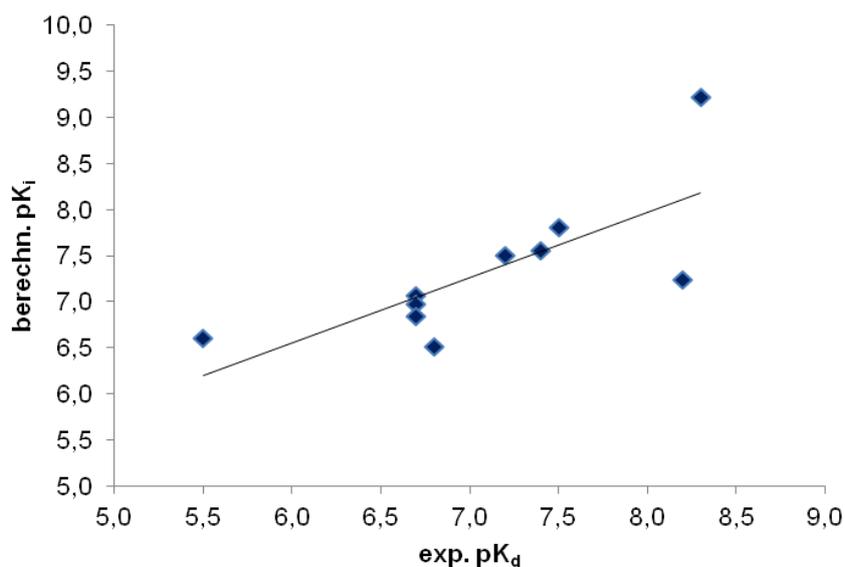


Abb. 23. Darstellung der Ergebnisse der Re-Scoringstudie. Korrelation zwischen thermodynamisch bestimmten (pK_d) und mittels *SFCscore* berechneten Bindungsaffinitäten (pK_i) ausgewählter AR-Inhibitor-Komplexe. In dem Diagramm blieben die Werte für den AR-Ligand-Komplex 1Z89 unberücksichtigt.

Das Ergebnis in Bezug auf den AR-Pyridazinon-Inhibitor-Komplex 1Z89 stellte einen Ausreißer dar und war zudem schwer zu beurteilen, da signifikante Unterschiede zwischen kinetisch und thermodynamisch bestimmten Affinitätswerten bestehen, wofür vermutlich auch Löslichkeitsprobleme mitverantwortlich sind. Einerseits wurde ein pK_d -Wert von $6,0^{161}$, andererseits jedoch ein pIC_{50} -Wert von $9,1^{148}$ ermittelt, weshalb auch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob entweder eine deutlich fehlerhafte Vorhersage hinsichtlich der berechneten Bindungsaffinität oder eine äußerst exakte Berechnung vorlag. Aufgrund der ansonsten sehr genauen Vorhersagen zwischen berechneten und experimentell bestimmten Bindungsaffinitäten, belegbar durch eine durchschnittliche Abweichung von nur einer halben Größenordnung und einer Abweichung von unter 10%, konnte zweifelsfrei die Eignung des Programms *SFCscore* sowie der verwendeten *SFC_290m*-Funktion für die korrekte Abschätzung reeller Bindungsaffinitäten nachgewiesen werden.

Bewertung der AR-Kandidaten-Komplexe und Durchführung eines Consensus-Scorings

Nachdem die Vorhersagekraft von *SFCscore* überprüft worden ist, wurde die *SFC_290m*-Funktion verwendet, um die Bindungsaffinitäten der ausgewählten Moleküle bezüglich der Templatkonformation abzuschätzen. Die durchgeführten Berechnungen wurden anhand der MD-generierten Proteinkonformation sowie der vom Dockingprogramm bestbewerteten Dockinglösung eines jeden Ligandenmoleküls durchgeführt.

Auf der Grundlage der durch *AutoDock3.0* und *SFCscore* berechneten Affinitäten wurde schließlich ein *Consensus-Scoring* durchgeführt, um eine Affinitätsrangliste der Kandidatenmoleküle zu erstellen. Dabei wurden alle Verbindungen sowohl nach den von *AutoDock3.0* berechneten ΔG -Werten, als auch nach den von *SFCscore* bestimmten pK_i -Werten sortiert. Dabei betrug die jeweils verwendete Toleranz 0,5 Einheiten, d.h. die Differenz zwischen den Affinitätswerten zweier Moleküle musste $>0,5$ sein, damit diesen Verbindungen verschiedene Ränge zugeordnet wurden. Letztendlich erfolgte die finale Bewertung bezüglich der potenziellen Bindungsaffinität anhand eines Vergleichs des Mittelwerts der zugewiesenen Ränge, in Form einer Consensusrangliste (für Teilergebnisse siehe Abschnitt III.4.5).

III.4.4 Untersuchung der Selektivität durch Cross-Dockingexperimente

Aufgrund der ausgeprägten Plastizität der AR-Bindetasche wäre es fahrlässig gewesen, anzunehmen, den vermeintlichen Bindemodus eines potenziellen AR-Liganden anhand nur einer einzigen Enzymkonformation vorhersagen zu können. Bei Wirkstoffdesignprojekten an hochflexiblen Zielstrukturen besteht grundsätzlich die Problematik unvorhersehbarer

struktureller Umlagerungen seitens des Rezeptors durch die Bindung der entwickelten Liganden, sogenannte „*induced fit*“-Effekte, die zu alternativen Proteinkonformationen sowie unerwarteten Bindemodi führen können. Dieser Effekt soll an dieser Stelle anhand eines konkreten Beispiels verdeutlicht werden.

Im Rahmen einer strukturbasierten Wirkstoffdesignstudie wurde eine Serie neuer AR-Inhibitoren als potenzielle Analoga des bekannten Inhibitors Tolrestat entwickelt (siehe Abb. 24).¹⁸¹

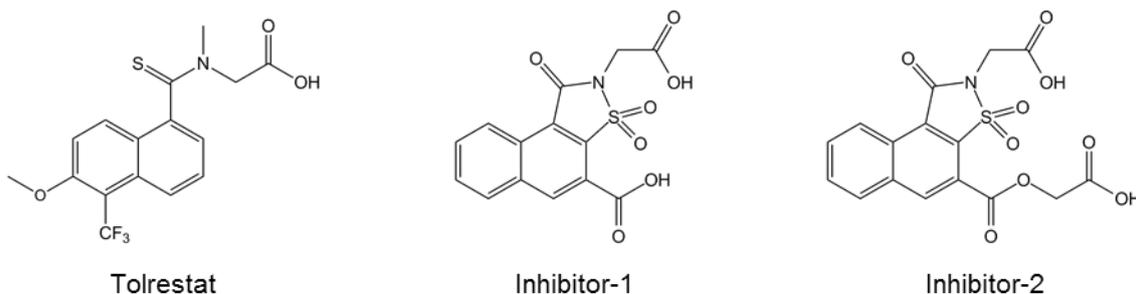


Abb. 24. Strukturformeln des Inhibitors Tolrestat und zwei weiteren AR-Inhibitoren einer Serie an Naphthoisothiazolesäurederivaten, die als potenzielle Tolrestatanaloga von Da Settimo *et al.*¹⁸¹ entwickelt und 2005 publiziert wurden.

Um die Hypothese zu unterstützen, dass diese Inhibitoren einen Tolrestat-ähnlichen Bindemodus einnehmen würden, wurden Dockingsimulationen anhand der Kristallstruktur 1AH3 des AR-Tolrestat-Komplexes durchgeführt, wobei die Dockinglösungen der Moleküle auch tatsächlich Bindemodi vergleichbar dem des Tolrestats zeigten. Im Gegensatz zu der darauf basierenden Annahme, dass dieser Bindemodus der wahrscheinlichste für diese Verbindungen sei, belegten Kristallstrukturen der entsprechenden AR-Inhibitor-Komplexe jedoch, dass diese Liganden eine Bindetaschenform adressierten, die der des Sorbinils (1AH0) mit geschlossener Spezifitätstasche ähnelte, und darüber hinaus einen anderen Bindungsmodus einnahmen.¹⁸² Zu diesem Resultat kam ebenfalls eine Dockingstudie, die mit *AutoDock3.0* durchgeführt wurde und bei der nicht nur die Kristallstruktur des AR-Tolrestat-Komplexes, sondern alle drei Haupt-Bindetaschenformen 1AH0, 1AH3 sowie 1US0 verwendet wurden.¹⁸³

Um die Proteinflexibilität der AR in der vorliegenden Arbeit explizit zu berücksichtigen, wurde daher im nächsten Schritt des virtuellen Screenings eine Selektivitätsuntersuchung der verbliebenen **70** Moleküle durchgeführt, um nicht Gefahr zu laufen, Moleküle auszuwählen, die an eine alternative Bindetaschenkonformation bevorzugt binden würden. Die Beurteilung der Selektivität erfolgte mittels Cross-Dockingexperimenten. Unter einem *Cross-Docking* versteht man das Einpassen von Liganden in die Bindetaschen verschiedener Protein-

strukturen, Strukturen unterschiedlicher Proteine oder, wie in dieser Arbeit vollzogen, in unterschiedliche Bindetaschenkonformationen desselben Rezeptors (vgl. Abschnitt II.4).

Durchführung der Cross-Dockingexperimente

Die Cross-Dockingexperimente wurden wiederum mit *Autodock3.0* durchgeführt und basierten auf den drei Kristallstrukturen 1AH0, 1AH3 und 1US0. Hierbei wurden die jeweiligen Affinitätsgitter verwendet, die bereits für die Re-Dockingstudie in Abschnitt III.4.3 erstellt worden sind, ebenso wie die dort beschriebenen Dockingprotokolle und Ligandenfiles. Nachdem für jede Verbindung 50 Dockinglösungen berechnet und entsprechend einer definierten Toleranz von 1,0 Å in *Clustern* zusammengefasst worden waren, wurden die Bindemodi einer jeden Verbindung innerhalb der drei verschiedenen Bindetaschen betrachtet. Die Visualisierung erfolgte mit *PyMOL*, wobei die für die Selektivitätsabschätzung zu verwendende Dockinglösung jedes Moleküls bestimmt wurde. Diese Vorgehensweise war notwendig, da, wie die visuelle Inspektion ergab, nicht für alle Moleküle für jede Bindetasche sinnvolle Bindemodi auf Rang 1 geführt wurden. Durch diese Vorgehensweise wurde sichergestellt, dass die Selektivitätsbestimmung nur auf Dockinglösungen beruhte, die plausible Bindemotive aufwiesen.

Da die Selektivität bezüglich einer bestimmten Proteinkonformation direkt mit der jeweiligen Bindungsaffinität korreliert, erfolgte die Abschätzung der Selektivität jeweils über die Berechnung der Differenz zwischen den Affinitätswerten (ΔG), die einerseits für die MD-generierte Konformation und andererseits für die drei Haupt-Bindetaschenformen resultierten. Auf der Grundlage der ermittelten Werte konnte eine Selektivitätsrangliste erstellt werden (siehe auch Abschnitt III.4.5 und Anhang VI.1).

Ergebnisse und Diskussion

Anhand der Selektivitätsrangliste wurden schließlich alle Verbindungen mit unzureichendem Selektivitätsprofil vor der finalen Entscheidungsfindung, welche Moleküle für die experimentellen Versuche in Frage kommen, aus dem Kreis der Kandidatenmoleküle entfernt. Die abschließende Molekülauswahl wurde ausschließlich auf Verbindungen beschränkt, für die ein Affinitätsvorteil zugunsten der MD-generierten Konformation gegenüber mindestens zwei der drei Bindetaschenformen berechnet werden konnte. Als Folge reduzierte sich die Anzahl der Kandidatenmoleküle von **70** auf **45**, die diese Vorgabe erfüllten. Innerhalb des resultierenden Molekülsatzes zeigten **21** Moleküle Affinitätsvorteile zugunsten der Zielkonformation gegenüber allen drei anderen Bindetaschenformen und **24** zumindest gegenüber zwei der drei bisher bekannten AR-Bindetaschenkonformationen.

Weiterhin kann konstatiert werden, dass die größte Konkurrenz zu der Templatkonformation von der Bindetasche 1US0 ausging, was aufgrund der größten strukturellen Ähnlichkeit von allen drei alternativen Proteinkonformationen hinsichtlich der Templatstruktur nicht verwunderlich erschien (siehe Abschnitt III.3.1). Auch wurden für die 1US0-Konformation insgesamt die meisten und zudem im Durchschnitt deutlich höhere Affinitätsvorteile berechnet als für die beiden anderen Bindetaschenformen. Aufgrund des offensichtlich größten Risikos die 1US0-Konformation anstelle der MD-generierten Bindetaschenform zu adressieren, erschien es besonders günstig, wenn die Kandidatenmoleküle an bestimmten Positionen des zentralen aromatischen Grundgerüsts über relativ starre und voluminöse Substituenten verfügten, die aufgrund des vergleichsweise geringeren Volumens der Spezifitätstasche der 1US0-Konformation nicht an diese, sondern an die Templatkonformation binden könnten. Darüber hinaus blieb die Suche nach strukturellen Gemeinsamkeiten innerhalb des Molekülsatzes der aussortierten, als zu unspezifisch eingestuften Verbindungen ergebnislos, auf die die unzureichende Selektivität gegenüber der Zielkonformation hätte zurückgeführt werden können.

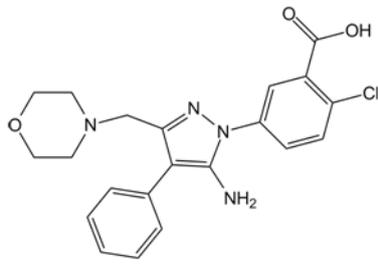
Zusammenfassend lässt sich anhand des Ergebnisses, dass **45** von **70** getesteten Verbindungen eine gewisse Spezifität bezüglich der Templatstruktur aufwiesen, die Effizienz der vorangegangenen Filterschritte belegen, mit deren Hilfe bereits im Vorfeld ungeeignete Moleküle gezielt aussortiert und die Molekülanzahl der Ausgangsdatenbanken deutlich auf einen überschaubaren Kandidatenkreis reduziert werden konnten.

III.4.5 Finale Molekülauswahl

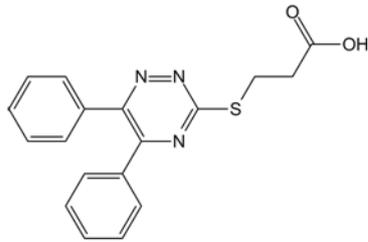
Bei der abschließenden Auswahl geeigneter Kandidatenmoleküle, die über das größte Potenzial verfügten, die Zielsetzung zu erfüllen, galt es alle gesammelten Informationen zu berücksichtigen. Da es in der vorliegenden Arbeit in erster Linie nicht um die Entwicklung neuer hochaffiner Inhibitoren ging, sondern darum, eine neue Bindetaschenkonformation der AR für die Kristallisation mit nachfolgender Röntgenstrukturanalyse zugänglich zu machen, wurde dem Selektivitätsprofil der Moleküle als oberstes Auswahlkriterium besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Darüber hinaus spielten weiterhin die berechneten Bindemodi der Verbindungen sowie die vorhergesagten Bindungsaffinitäten bezüglich der Zielkonformation eine zentrale Rolle. Bei einer eingehenden Analyse der jeweiligen Dockinglösungen wurde besonders die Qualität und Anzahl von gerichteten Protein-Ligand-Interaktionen sowie die Oberflächen- bzw. morphologische Komplementarität untersucht. Zudem spielten die

intramolekularen Energien der Ligandenkonformationen der Bindemodi eine Rolle, die von *AutoDock3.0* für jede Dockinglösung berechnet wurden.

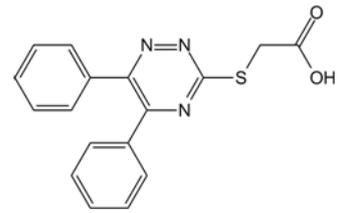
Von den verbliebenen **45** Verbindungen wurden schließlich die **12** vielversprechendsten Moleküle mit durchweg überzeugenden Bindeposen, die sowohl von *AutoDock3.0* und *SFCscore*, als auch bei der visuellen Inspektion favorisiert wurden, für die experimentellen Versuche ausgewählt. Abbildung 25 zeigt die Strukturformeln der Kandidatenmoleküle. Tabelle 7 gibt Auskunft über die Resultate der jeweiligen Docking- und Cross-Dockingstudie sowie des Re-Scorings, wobei aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls die entsprechenden Werte des Phenyl-Pyridazinon-Inhibitors (PPI) angegeben sind.



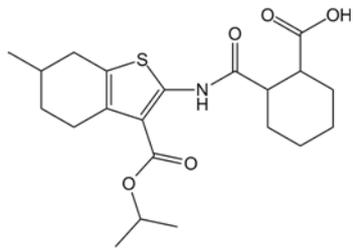
ARL-1



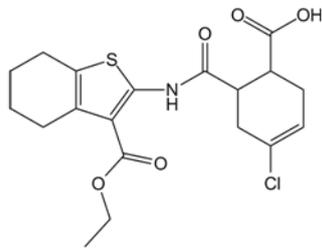
ARL-2



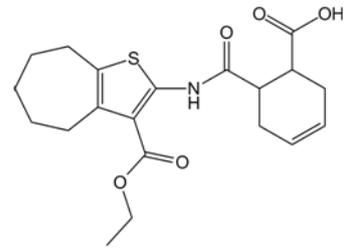
ARL-3



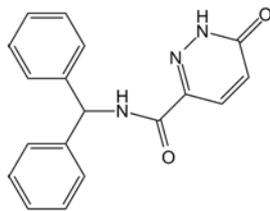
ARL-4



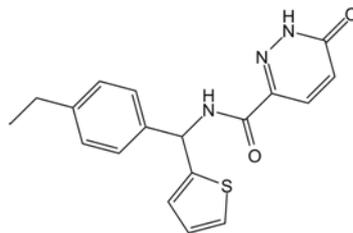
ARL-5



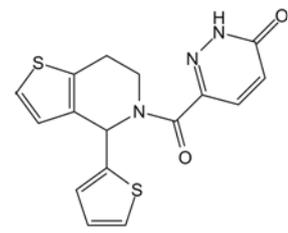
ARL-6



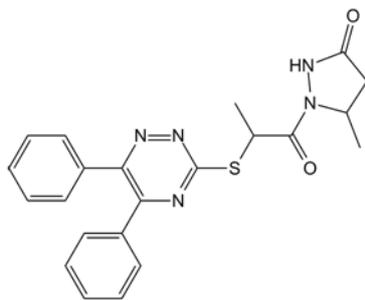
ARL-7



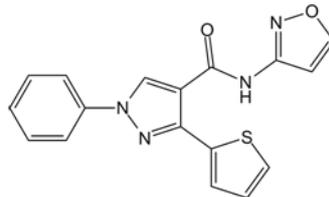
ARL-8



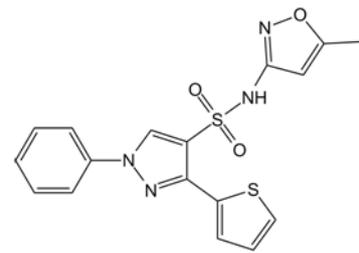
ARL-9



ARL-10



ARL-11



ARL-12

Abb. 25. Strukturformeln der zwölf ausgewählten Kandidatenmoleküle.

Ligand	ΔG MD-Konf. [kca/mol]	Selektivitätsprofil			pK _i (SFCscore)	Screening- verfahren
		ΔG 1AH0	1AH3	1US0		
PPI	-9,79	-8,84	-8,47	-9,49	8,6	-
ARL-1	-11,11	-8,95	-9,20	-9,22	8,0	Pharmakophor
ARL-2	-9,67	-8,78	-8,71	-8,52	7,3	FTrees
ARL-3	-8,95	-8,24	-9,21	-8,00	7,1	FTrees
ARL-4	-10,88	-9,38	-9,74	-9,31	8,3	Pharmakophor
ARL-5	-10,90	-8,98	-8,90	-11,72	8,0	Pharmakophor
ARL-6	-11,10	-10,11	-9,94	-11,67	7,7	Pharmakophor
ARL-7	-8,51	-8,01	-7,75	-9,75	6,9	FTrees
ARL-8	-9,00	-8,29	-8,40	-8,23	7,0	FTrees
ARL-9	-9,42	-7,99	-7,82	-9,62	8,0	FTrees
ARL-10	-10,68	-10,44	-9,39	-9,56	8,9	FTrees
ARL-11	-8,63	-8,57	-8,09	-8,01	7,3	FTrees
ARL-12	-8,92	-8,99	-8,10	-7,82	7,9	FTrees

Tab. 7. Zusammenfassung der Ergebnisse der Dockingstudien sowie des Re-Scoringverfahrens der ausgewählten Kandidatenmoleküle. Neben den durch *AutoDock3.0* berechneten Bindungsaffinitäten hinsichtlich der MD-generierten Proteinkonformation (ΔG MD-Konf.) werden entsprechende Werte in Bezug auf die drei bekannten AR-Konformationen als Selektivitätsprofil angegeben. Weiterhin werden die Ergebnisse der mittels *SFCscore* durchgeführten Re-Scoringstudie hinsichtlich der MD-Konformation sowie die Screeningverfahren aufgeführt, mit denen die jeweiligen Moleküle identifiziert worden sind.

Zum damaligen Zeitpunkt waren, bedingt durch die sehr begrenzte kommerzielle Verfügbarkeit der ausgewählten Moleküle, lediglich die drei Verbindungen **ARL-7**, **ARL-8** und **ARL-9** lieferbar. Aus diesem Grund wurde die Entscheidung getroffen, mit Hilfe der Online-Datenbanksuchmaschine *eMolecules*¹⁸⁴ nach verfügbaren Analoga der anderen neun Kandidatenmoleküle zu suchen. Im Rahmen dieser Suche konnten drei Derivate mit marginalen strukturellen Differenzen im Vergleich zu den Originalen identifiziert werden (siehe Abb. 26). Die Derivate wurden vor der Bestellung ebenfalls allen Analysen entsprechend der zuvor dargestellten Vorgehensweise unterzogen, um deren Eignung zu überprüfen. Die dabei erzielten Ergebnisse korrelierten durchweg mit denen der Originalverbindungen (siehe Tab. 8).

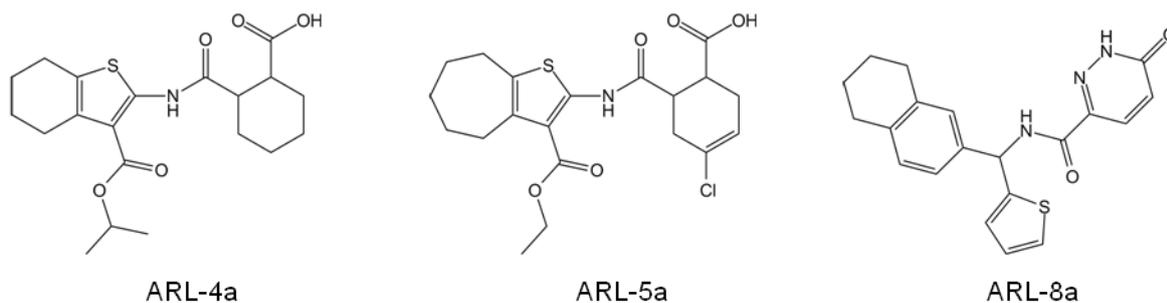


Abb. 26. Strukturformeln der drei bestellten Analoga der nicht verfügbaren Originalverbindungen.

Ligand	ΔG MD-Konf. [kca/mol]	Selektivitätsprofil			SFCscore pK_i	Screening- verfahren
		ΔG 1AH0	1AH3	1US0		
ARL-4a	-11,08	-8,89	-9,39	-11,35	7,9	eMolecules
ARL-5a	-11,56	-9,21	-9,16	-12,19	8,2	eMolecules
ARL-8a	-10,19	-8,90	-9,35	-9,06	7,2	eMolecules

Tab. 8. Ergebnisse der Dockingstudien sowie des Re-Scoringverfahrens der ausgewählten Strukturanaloga von drei ursprünglich ausgewählten Kandidatenmolekülen.

Die **6** bestellten Kandidatenmoleküle verfügten entweder über eine Carboxylat- oder eine Pyridazinon-Ankergruppe. Dadurch konnte für alle Verbindungen davon ausgegangen werden, dass einerseits eine Bindung an das Enzym nicht aufgrund mangelnder Affinität der jeweiligen Kopfgruppe scheitern würde und andererseits, dass diese Funktionalitäten, da sie bereits kristallographisch umfangreich charakterisiert worden sind, mit einem bestimmten Bindemodus an die katalytische Subtasche binden würden. Zudem war die Aussagekraft der Dockinglösungen dieser Verbindungen im Gegensatz zu Molekülen mit alternativen Kopfgruppen höher einzuschätzen, da die Vorhersagen des verwendeten Dockingprogramms anhand von Liganden mit Carboxylat- bzw. Pyridazinongruppen überprüft worden sind.

Obwohl Verbindung **ARL-1** für die experimentellen Versuche aufgrund mangelnder kommerzieller Verfügbarkeit nicht zur Verfügung stand, jedoch aufgrund der berechneten Affinitäten und des vorhergesagten überzeugenden Interaktionsmusters eines der vielversprechendsten Kandidatenmoleküle repräsentierte, soll an dieser Stelle auch auf den berechneten Bindemodus dieser Verbindung eingegangen werden (siehe Abb. 27). Die Carboxylatgruppe wurde durch die Anionen-Bindetasche gebunden, der benachbarte Phenylring adressierte optimal den *hot spot* für aromatische Kohlenstoffe. Der Pyrazolring

besetzte den Eingang zur Spezifitätstasche und formte ein π - π -Stacking mit Trp111. Die Aminogruppe war prinzipiell geeignet, geringfügige strukturelle Anpassungen des hochflexiblen Proteinsegments Val297-Leu300 vorausgesetzt, zwei H-Brücken mit dem Schwefelatom von Cys298 und mit dem Sauerstoffatom von Ala299 auszubilden. Die neue Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 unterhalb der Ligandenbindestelle wurde, in Übereinstimmung mit einem *hot spot* für aromatische Kohlenstoffatome an dieser Position, durch einen Phenylring besetzt und stabilisiert. Des Weiteren wurde die Ausbildung von zwei H-Brücken mit Thr113 bzw. Cys303 durch die Platzierung des Morpholinrings in der hinteren Spezifitätstasche ermöglicht. Da der Bindemodus neben mehreren gerichteten Interaktionen, auch eine sehr gute strukturelle Komplementarität zur MD-generierten Bindetaschenform zeigte, wurden für diese Verbindung hohe Bindungsaffinitäten berechnet, die mit zu den höchsten aller Kandidatenmoleküle zählten.

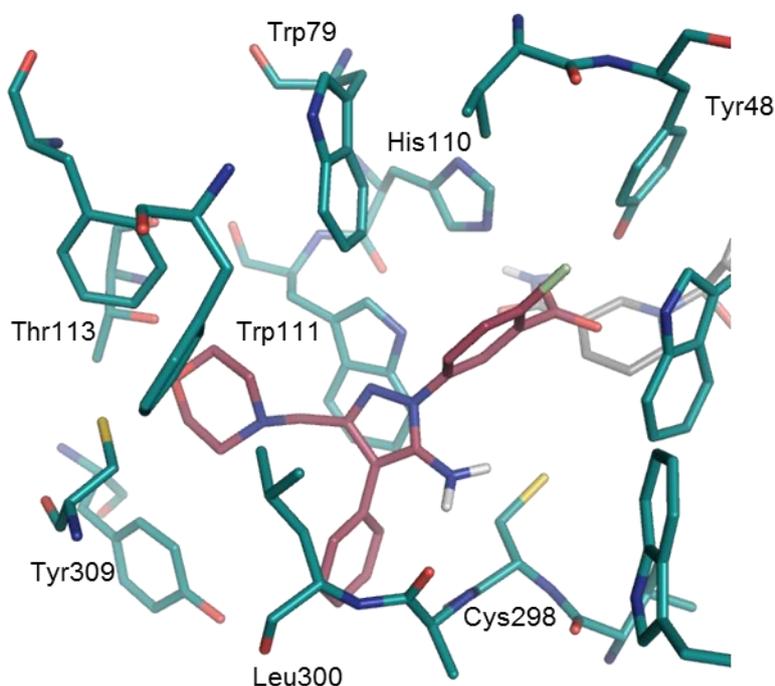


Abb. 27. Bindemodus gemäß Dockinglösung von ARL-1.

Hinsichtlich der berechneten Bindemodi der sechs bestellten Verbindungen lässt sich insgesamt feststellen, dass die jeweiligen Ankergruppen die katalytische Subtasche des Enzyms adressierten, um mit den Aminosäuren entsprechende H-Brückennetzwerke auszubilden (siehe Abb. 28). Zudem gingen alle Verbindungen über ein zentrales Ringsystem aromatische Wechselwirkungen (*edge-to-face* bzw. *parallel stacking*) mit Trp111 ein und adressierten mit einem Ligandenrest die Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und

Tyr309. Als besonders geeignete Substituenten für die Ausbildung weiterer H-Brücken erwiesen sich die Estergruppen der beiden Carboxylatverbindungen **ARL-4a** und **ARL-5a**. Durch geringfügige Konformationsänderungen seitens des Cys298 bzw. des hochflexiblen Leu300 wären jeweils zwei weitere H-Brücken zwischen der Thiofunktion von Cys298 und den Carbonylsauerstoffatomen der Liganden sowie zwischen dem Leu300-NH und den Ethersauerstoffatomen der Liganden möglich. Die in allen sechs Molekülen als Bindeglied zwischen Ankergruppe und aromatischem Ringsystem vorkommende Säureamidbindung stand in der eingenommenen Bindepose von **ARL-9** als H-Brückenakzeptor für eine mögliche Interaktion mit Ala299-NH zur Verfügung. Wie die dargestellten Bindemodi belegten, repräsentiert die Amidbindung ein sinnvolles Strukturelement, um die Distanz zwischen Anionen-Bindetasche und Spezifitätstasche zu überbrücken. Von der Amidbindung können gerichtete Interaktionen mit dem Protein eingegangen werden, die mit positiven Effekten auf die Bindungsaffinität einhergehen. Außerdem werden mit dieser Substruktur nur bis zu zwei rotierbare Bindungen in die Verbindungen eingeführt. Zusätzlich wirken sich die hydrophilen Gruppen günstig auf die Wasserlöslichkeit der Liganden aus.

Des Weiteren kann zusammengefasst werden, dass alle Kandidatenmoleküle den zur Verfügung stehenden Raum der erweiterten Spezifitätstasche sehr gut ausfüllten und eine ausgesprochen gute morphologische Komplementarität aufwiesen. Bei der näheren Betrachtung der Bindemotive wurde darüber hinaus deutlich, dass wenn es durch entsprechende Bindemodi tatsächlich zu einer Besetzung der Spezifitätstasche käme, dies bei den ausgewählten Kandidatenmolekülen nur bei einer gleichzeitigen Besetzung von einer der beiden Subtaschen ober- oder unterhalb der Spezifitätstasche möglich wäre, da andernfalls der Platzbedarf bestimmter Molekülreste nicht befriedigt werden könnte. Aus diesem Grund ist auch das Risiko einer Adressierung der 1US0- anstatt der Zielkonformation bei diesen Verbindungen als gering einzuschätzen. Generell wären demnach auch Bindemodi denkbar, bei denen die Grundgerüste eine um 180° verdrehte Orientierung einnehmen, wobei die jeweiligen Substituenten folglich die Subtasche oberhalb der Spezifitätstasche besetzen würden. Interessanterweise wurde für keines der analysierten Kandidatenmoleküle eine derartige Dockinglösung generiert, was die Schlussfolgerung zuließ, dass auch das Risiko die Subtasche oberhalb der Spezifitätstasche zu adressieren als gering einzuschätzen war.

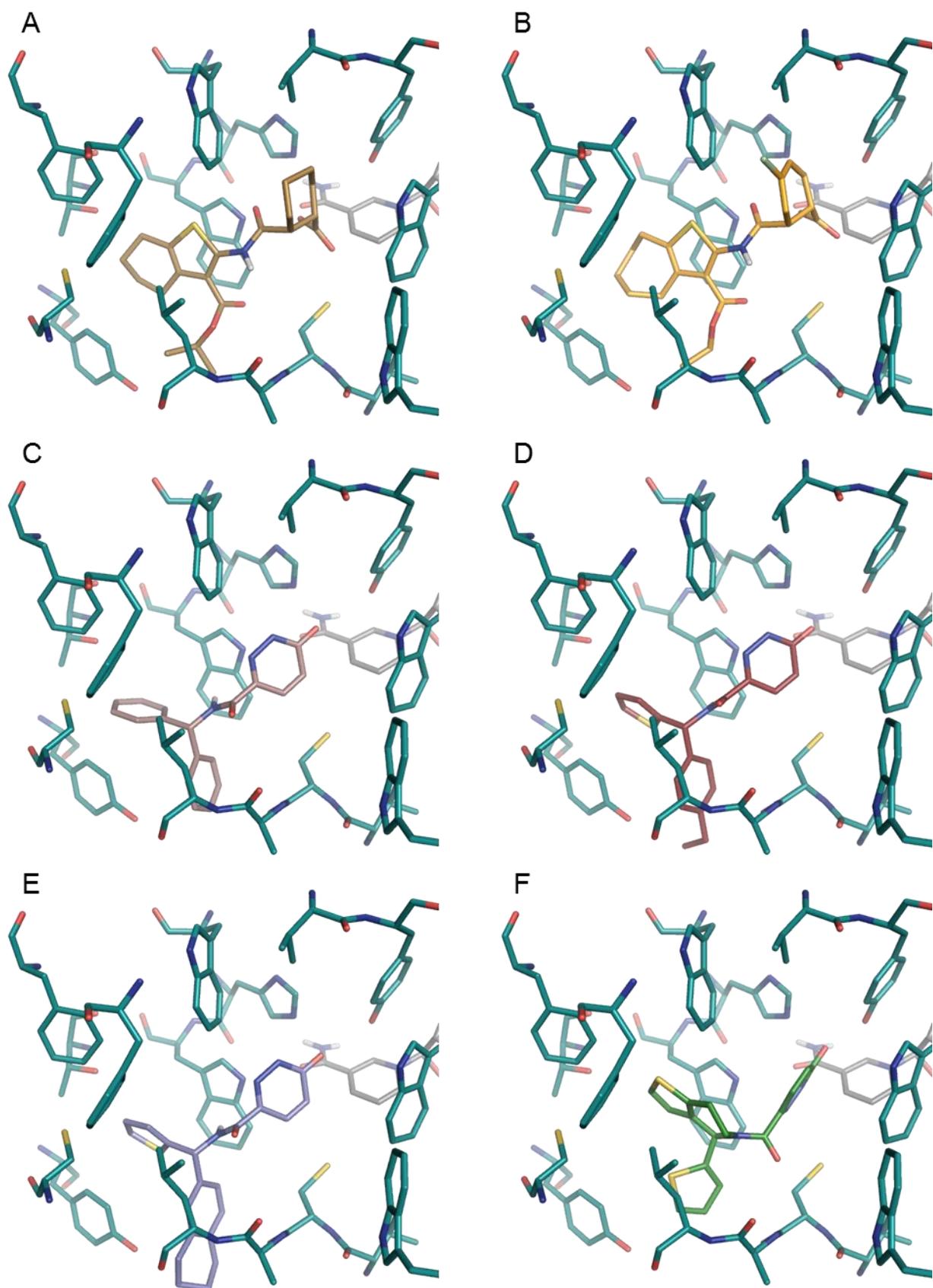


Abb. 28. Darstellung mittels Dockingsimulationen berechneter Bindemodi der sechs verfügbaren Kandidatenmoleküle: **A)** ARL-4a **B)** ARL-5a **C)** ARL-7 **D)** ARL-8 **E)** ARL-8a **F)** ARL-9.

III.4.6 Experimentelle Bestimmung des Inhibitionspotenzials und Röntgenstrukturanalyse

Bestimmung des Inhibitionspotenzials der Kandidatenmoleküle mittels *in vitro* Assay

Vor der abschließenden experimentellen Beurteilung, ob die Zielsetzung dieser Studie, eine neue Bindetaschenkonformation der AR experimentell zugänglich zu machen, durch die vorgeschlagenen Verbindungen erfüllt werden konnte, galt es zunächst die Bindungsaffinität dieser Moleküle bezüglich der humanen AR zu untersuchen. Die Bestimmung des Inhibitionspotenzials der Kandidatenmoleküle wurde von Dr. Cornelia Koch im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Bei dem hierfür verwendeten *in vitro* Assay wurde die Abnahme der Absorption des Co-faktors NADPH während der enzymatischen Reduktion von Xylitol bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Da die Absorptionsabnahme des NADPH durch Oxidation zu NADP⁺ der AR-Aktivität proportional ist, kann hieraus die Enzyminhibition durch Absorptionsmessungen quantifiziert werden. Das verwendete Assayprotokoll entsprach dabei der von Steuber *et al.* beschriebenen Methode.¹⁸⁰ Als Maß für die inhibitorische Aktivität der getesteten Verbindungen wurden IC₅₀-Werte aus den Messergebnissen ermittelt. Für jedes Molekül wurden jeweils drei Messungen durchgeführt.

Ergebnisse

Aufgrund unzureichender Löslichkeit von vier Substanzen unter den Assaybedingungen (Natriumphosphat-Puffer pH: 6,2) konnte lediglich das Inhibitionspotenzial von zwei der sechs bestellten Verbindungen experimentell bestimmt werden. Dabei zeigte **ARL-5a** eine inhibitorische Aktivität im einstelligen mikromolaren Bereich (IC₅₀: **1,34 µM** ± 0,21 µM), wohingegen **ARL-4a** erstaunlicherweise keine Enzymhemmung zeigte (IC₅₀: ~**7,8 mM**). Der letztgenannte Werte sollte jedoch mit äußerster Vorsicht betrachtet werden, da der verwendete Assay nicht für Inhibitionsbestimmungen in einem derartig geringen Affinitätsbereich entwickelt worden ist, was allerdings nichts an der generellen Aussage ändert. Die Frage nach der Ursache, wie dieser signifikante Affinitätsunterschied trotz nur geringfügiger struktureller Unterschiede zwischen beiden Molekülen zustande kommt, lässt sich aufgrund noch ausstehender Kristallstrukturen entsprechender AR-Ligand-Komplexe zum derzeitigen Zeitpunkt nicht abschließend beantworten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die zusätzliche Subtasche zwischen Ala299/Leu300 und Tyr309 der MD-generierten Proteinkonformation kleiner ist als durch die MD Simulation vorhergesagt wurde, weshalb nur **ARL-5a** mit einem kleineren Substituenten, einer veresterten Ethylgruppe, darin binden

könnte und **ARL-4a** mit einem Isopropyl-Rest nicht. Möglicherweise verhindert auch Leu300, welches als eine Art „Gatekeeper“ fungiert, durch sterische Hinderung ein Passieren der Isopropylgruppe. Ebenfalls erscheint für **ARL-4a** unter Berücksichtigung der Dockinglösungen, insbesondere bezüglich der 1AH0-Konformation, eine Adressierung der Binde-taschenform mit geschlossener Spezifitätstasche aufgrund unzureichender Wechsel-wirkungsmöglichkeiten nicht plausibel. Dieses Beispiel verdeutlicht sehr gut die Komplexität und Problematiken des strukturbasierten Wirkstoffdesigns und belegt, dass auch nahezu identische Moleküle nicht zwangsläufig zu vergleichbaren pharmakologischen Effekten führen und das Vorhandensein einer bestimmten Ankergruppe nicht unmittelbar für eine erfolgreiche Bindung des Liganden ausreichen muss. Vielmehr unterstreichen diese Ergebnisse auch, dass andere die Bindungsaffinität und Löslichkeit beeinflussende Faktoren, wie z.B. Entropie- und Solvenseffekte, stets im Rahmen des Wirkstoffdesigns beachtet werden müssen.

Die geringe Löslichkeit der Kandidatenmoleküle in dem wässrigen Puffermedium (pH: 6,2) war anhand ihrer chemischen Konstitution und den von den Anbietern angegebenen logP-Werten nicht zu erwarten, zumal alle ausgewählten Kandidatenmoleküle, bis auf **ARL-1**, die von Lipinski *et al.*⁹ postulierten Richtlinien für die orale Bioverfügbarkeit chemischer Verbindungen, der sogenannten *Rule of five*, erfüllten. Danach werden Verbindungen, die zwei der folgenden Kriterien verletzen, mit hoher Wahrscheinlichkeit schlecht resorbiert: ein Molekulargewicht ≤ 500 Da, eine Anzahl an H-Brückenakzeptoren ≤ 10 , eine Anzahl an H-Brückendonoren ≤ 5 und ein berechneter logP-Wert ≤ 5 . Weiterhin wurde trotz der geringen Löslichkeit unter den Assaybedingungen versucht, von allen Verbindungen Kristalle entsprechender Protein-Ligand-Komplexe zu züchten und diese mittels Röntgenstruktur-analyse aufzuklären.

Ligand	M [g/mol]	logP	IC ₅₀ [μM]
ARL-4a	394	4,9	~7778
ARL-5a	426	5,2	1,34 ± 0,21
ARL-7	305	1,7	-
ARL-8	339	2,4*	-
ARL-8a	365	2,9*	-
ARL-9	343	1,3*	-

Tab. 9. Übersicht über die physiko-chemischen Kenngrößen der sechs getesteten Verbindungen hinsichtlich der molaren Masse (M), des logarithmischen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP) als Maß für das Verhältnis zwischen Fett- und Wasserlöslichkeit einer Substanz. Die Angaben

der Hersteller basierten einerseits auf computergestützten Berechnungen (*) oder die Auskunft erfolgte ohne Angabe der jeweiligen Bestimmungsmethode.

Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Nach der zumindest teilweise erfolgten Überprüfung der Bindungsaffinitäten der sechs Kandidatenmoleküle sollten die aufgestellten Hypothesen letztendlich mit experimentellen Daten belegt werden. Hierfür wurde versucht Kristalle der jeweiligen AR-Ligand-Komplexe zu züchten, um diese mittels Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen. Die experimentellen Arbeiten hierfür wurden ebenfalls im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. G. Klebe in Marburg von Dr. Cornelia Koch und Dr. Andreas Heine durchgeführt. Leider gelang es im Zeitrahmen dieser Arbeit trotz mehrfacher Kristallisationsansätze anhand eines etablierten Kristallisationsprotokolls¹⁶¹ seitens unserer Kooperationspartner noch nicht, entsprechende Kristalle der jeweiligen Komplexe zu züchten und somit die aufgestellten Hypothesen abschließend experimentell zu verifizieren. Diese Aufgaben bleiben das Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten.

III.4.7 Schlussfolgerung

Der neu identifizierte niedermolekulare Inhibitor der AR wurde im Rahmen des proteinbasierten Ansatzes des virtuellen Screenings identifiziert. Aus diesem Grund konnte die Studie deutlich zeigen, dass nicht nur experimentell aufgeklärte Proteinstrukturen sondern auch mittels computerbasierter Verfahren, wie z.B. MD Simulationen, berechnete Proteinkonformationen als Templatstrukturen prinzipiell für die Identifizierung neuer Liganden sinnvoll genutzt werden können. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die in diesem Kapitel beschriebene Vorgehensweise für die gezielte Identifizierung neuer Inhibitoren aus mehreren Millionen Molekülen unter expliziter Berücksichtigung der ausgeprägten Proteinflexibilität des Targets, geeignet ist.

Eine abschließende Beurteilung hinsichtlich der Aussagekraft computergenerierter Proteinkonformationen konnte jedoch zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht erfolgen, da die Ergebnisse der ausstehenden experimentellen Untersuchungen abzuwarten sind.

IV Targeting Hsp70 – Design einer neuen Inhibitor-Klasse

IV.1 Hitzeschockprotein 70: Vorstellung der Zielstruktur

IV.1.1 Klassifizierung

Hitzeschockproteine wurden erstmals in den 1960er Jahren von Ritossa beschrieben.¹⁸⁵ Im Rahmen von Untersuchungen an *Drosophila* Larven konnte beobachtet werden, dass es in Folge einer Hitzeexposition oder durch eine Behandlung mit unterschiedlichen Chemikalien zu einer gesteigerten Expression von mRNAs bestimmter Proteine kam, weshalb die entsprechenden Moleküle als Hitzeschockproteine bezeichnet wurden.^{185,186} Heute ist bekannt, dass Hitzeschockproteine nicht nur eine zytoprotektive Funktion unter Stressbedingungen zukommt, sondern dass diese Enzyme auch unter physiologischen Bedingungen wichtige zelluläre Aufgaben, wie z.B. die Faltung und den Transport von Proteinen, übernehmen.¹⁸⁷

Hitzeschockproteine sind ubiquitär vorhanden und kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. Die Klassifizierung dieser heterogenen Enzymklasse in einzelne Familien erfolgt anhand der Molekülmassen, die einen Größenbereich von ~30 kDa bis ~110 kDa umfassen. Unterschiede zwischen den einzelnen Familien bestehen bezüglich Struktur, biologischen Funktionen sowie dem Vorkommen in verschiedenen zellulären Kompartimenten.

Die Mitglieder der 70 kDa Hitzeschockproteinfamilie (Hsp70) sind molekulare Chaperone, denen neben zytoprotektiven Funktionen¹⁸⁸ eine wichtige Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase¹⁸⁹ zukommt. Als Cofaktor dient den Enzymen ATP. Hsp70 weisen untereinander hochkonservierte Aminosäuresequenzen auf und werden in nahezu allen Organismen sowie in allen zellulären Kompartimenten exprimiert und kommen darüber hinaus nach heutigem Wissensstand auch im extrazellulären Raum vor.^{190,191} Innerhalb der Hsp70-Familie wird zwischen zwei verschiedenen Arten von Proteinen unterschieden: durch Stressfaktoren induzierbare Isoformen einerseits und den konstitutiv exprimierten Isoformen andererseits, die auch als *heat shock cognates* (Hsc70) bezeichnet werden.¹⁹²

Für den menschlichen Organismus konnte zum Zeitpunkt der Arbeit die Existenz von acht Isoformen nachgewiesen werden, die sowohl über redundante als auch spezifische Funktionen verfügen und sich untereinander durch die Aminosäuresequenz, den Expressionslevel sowie die intrazelluläre Lokalisierung voneinander unterscheiden. Bis auf

die zwei Isoformen Bip (Hsp70-5, Grp78) und mtHsp70 (Hsp70-9, Grp75), deren Vorkommen auf das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums bzw. der Mitochondrien begrenzt ist, liegen die anderen Isoformen überwiegend im Zytoplasma und im Zellkern vor, von denen das stressinduzierbare 72 kDa Protein (Hsp72) sowie die konstitutiv exprimierte 73 kDa Isoform (Hsc70, Hsp73) die beiden am häufigsten vorkommenden Isoformen darstellen.^{190,193} Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Begriff Hsp70 nunmehr nicht nur explizit für die induzierbaren Proteine verwendet, sondern allgemein auch für die konstitutiv exprimierten Isoformen, wie z.B. Hsc70, gebraucht.

IV.1.2 Struktureller Aufbau von Hsp70

Primärstrukturen

Die Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie sind Monomere, die hochkonservierte Aminosäuresequenzen aufweisen und bestimmte Proteinstruktursegmente teilen. Die Enzyme bestehen aus einer N-terminalen Nukleotidbindedomäne (NBD) mit ATPase-Aktivität und einer C-terminalen Substratbindedomäne (SBD), die über ein exponiertes Linkersegment mit einer Protease-sensitiven Sequenz miteinander verbunden sind (siehe Abb. 29).¹⁹⁴

Der C-Terminus der verschiedenen Hsp70-Isoformen weist häufig ein EEVD-Motiv auf¹⁹³⁻¹⁹⁵, das als Bestandteil der Oligomerisierungsdomäne für die Bindung von Co-Chaperonen sowie anderen Hitzeschockproteinen verantwortlich ist.¹⁹⁶ Darüber hinaus verfügen die beiden humanen Isoformen Hsp70-5 und Hsp70-9, deren Vorkommen jeweils auf ein bestimmtes zelluläres Kompartiment begrenzt ist, über ein Lokalisierungssignal am N-Terminus. Gemein ist beiden Proteinen zudem das Fehlen des EEVD-Motivs innerhalb des C-terminalen Segments, anstelle dessen Hsp70-5 über eine Retentionssignalsequenz verfügt, die den Austritt des Enzyms aus dem Endoplasmatischen Retikulum verhindert.¹⁹⁷

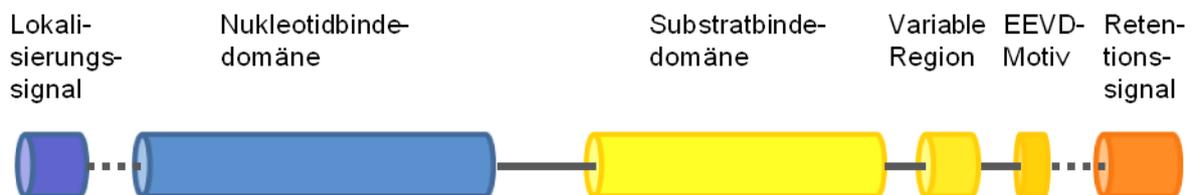


Abb. 29. Schematischer Aufbau humaner Hsp70-Proteine modifiziert nach Daugaard *et al.*¹⁹⁰.

Für eine vergleichende Untersuchung der Aminosäuresequenzen der acht zum Zeitpunkt der Arbeit bekannten humanen Hsp70-Isoformen (hHsp70) untereinander sowie in Ergänzung zu Daugaard *et al.*¹⁹⁰ für eine Gegenüberstellung der humanen Peptidsequenzen mit den

Primärstrukturen anderer Spezies wurde eine multiple Sequenzanalyse durchgeführt. Als nicht humane Hsp70-Isoformen wurden das bovine Hsc70-Enzym (bHsc70) und das prokaryotische Hsp70-Enzym DnaK aus *E. coli* in die Analyse einbezogen, da diese beiden Proteine im Rahmen der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung waren. Die hierfür verwendeten Aminosäuresequenzen stammten aus der UniProt Knowledgebase-Protein-datenbank (UniProtKB)¹⁹⁸. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm *ClustalW* (Version 2.0.10)¹⁹⁹ verwendet. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit *Boxshade* (Version 3.21)²⁰⁰ (siehe Anhang VI.2).

Hinsichtlich des Sequenzvergleichs der humanen Hsp70-Isoformen wird auf den ersten Blick ersichtlich, dass deren Primärstrukturen insgesamt eine sehr hohe Homologie aufweisen. Diese Beobachtung lässt sich anhand von berechneten Sequenzidentitäten, die in einem Bereich zwischen 52 und 99% in Bezug auf Hsp70-1a liegen (siehe Tab. 10), belegen. Besonders die NBD ist hochkonserviert, wohingegen sich der variabelste Sequenzbereich am C-Terminus befindet. Die beiden Isoformen Hsp70-5 und Hsp70-9 zeigen die größten sequenziellen Abweichungen, wobei sich besonders die Peptidsequenz der NBD von Hsp70-9 zusätzlich zu dem Lokalisierungssignal noch durch weitere sequenzielle Differenzen am stärksten von den NBDs der übrigen Enzyme unterscheidet.

Protein	Synonyme	Spezies	Aminosäure-anzahl	Homologie zu Hsp70-1a [%]
Hsp70-1a	Hsp72, Hsp70-1	<i>Homo sapiens</i>	641	100
Hsp70-1b	Hsp72, Hsp70-1	<i>Homo sapiens</i>	641	99,8
Hsp70-1t	Hsp70-hom	<i>Homo sapiens</i>	641	89,5
Hsp70-2	HspA2, Hsp70-3	<i>Homo sapiens</i>	639	84,6
Hsp70-5	BiP, Grp78	<i>Homo sapiens</i>	654	64,0
Hsp70-6	Hsp70B'	<i>Homo sapiens</i>	643	81,8
Hsc70	Hsp73, Hsp70-8	<i>Homo sapiens</i>	646	86,1
Hsp70-9	mtHsp70, Grp75	<i>Homo sapiens</i>	679	49,8
bHsc70	-	<i>Bos taurus</i>	650	86,0 / 99,9*
DnaK	-	<i>Escherichia coli</i>	638	50,0

Tab. 10. Ergebnisse einer Multisequenzanalyse der acht hHsp70-Isoformen modifiziert nach Daugaard *et al.*¹⁹⁰ und erweitert um die Enzyme bHsc70 und DnaK in Bezug auf Hsp70-1a. *Homologie zu humanem Hsc70.

Ein weiterer Schwerpunkt der Analyse bestand in der Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen von humanem (hHsc70) und bovinem Hsc70 (bHsc70) sowie in dem Vergleich der Primärstrukturen der humanen Isoformen mit dem prokaryotischen Hsp70-Enzym DnaK. Bei der Analyse der beiden Peptidsequenzen der humanen und bovinen Hsc70-Isoform wurde deutlich, dass sich diese Sequenzen in nur fünf Aminosäuren an zwei separaten Positionen, also insgesamt nur äußerst geringfügig voneinander unterscheiden und demnach als nahezu identisch angesehen werden können.

Im Gegensatz zu diesem Vergleich zeigten die Strukturen der betrachteten eu- und prokaryotischen Hsp70-Proteine, wie erwartet, mit einer überwiegenden Sequenzanalogie von ~50% deutlich weniger Sequenzübereinstimmungen (siehe Tab. 11). Die größte Homologie besteht mit einem Wert von ~60% zwischen DnaK und der humanen Isoform Hsp70-9.

Protein	Synonyme	Spezies	Aminosäureanzahl	Homologie zu DnaK [%]
Hsp70-1a	Hsp72, Hsp70-1	<i>Homo sapiens</i>	641	50,0
Hsp70-1b	Hsp72, Hsp70-1	<i>Homo sapiens</i>	641	50,0
Hsp70-1t	Hsp70-hom	<i>Homo sapiens</i>	641	49,0
Hsp70-2	HspA2, Hsp70-3	<i>Homo sapiens</i>	639	49,0
Hsp70-5	BiP, Grp78	<i>Homo sapiens</i>	654	50,9
Hsp70-6	Hsp70B'	<i>Homo sapiens</i>	643	49,1
Hsc70	Hsp73, Hsp70-8	<i>Homo sapiens</i>	646	48,6
Hsp70-9	mtHsp70, Grp75	<i>Homo sapiens</i>	679	60,3
Hsc70		<i>Bos taurus</i>	650	48,4

Tab. 11. Ergebnisse einer Multisequenzanalyse der acht hHsp70-Isoformen sowie des Enzyms bHsc70 in Bezug auf das prokaryotische Hsp70-Enzym DnaK.

Tertiärstruktur

Die Verfügbarkeit experimentell aufgeklärter Hsp70-Tertiärstrukturen war zum Zeitpunkt der Arbeit sehr gering. Bedingt durch die sehr geringe Anzahl an aufgeklärten Proteinstrukturen, die beide Domänen enthalten, waren ebenfalls Informationen über die existierenden Konformationsräume der verschiedenen Isoformen sehr begrenzt. Zum Zeitpunkt der Arbeit waren lediglich zwei Enzymstrukturen eines Zweidomänenkonstrukts, bestehend aus NBD und SBD, in der PDB veröffentlicht. Erste Einblicke bezüglich des dreidimensionalen Aufbaus und des Faltungsmusters eines funktionell intakten Hsp70-Chaperons gelang Jiang *et al.*²⁰¹ 2005 durch die Aufklärung einer Kristallstruktur des bovinen Hsc70 (PDB-Code 1YUW). Im

Jahr 2009 wurde mit der Enzymstruktur des prokaryotischen Hsp70-Enzyms DnaK aus *E. coli* (PDB-Code 2KHO) eine zweite dreidimensionale Zweidomänenstruktur eines Hsp70-Chaperones publiziert. Neben diesen zwei Zweidomänenstrukturen konnten bereits auch eine Reihe isolierter NBD- und SBD-Strukturen verschiedener Organismen experimentell aufgeklärt werden (siehe Anhang VI.3).

Das experimentell aufgeklärte Faltungsmuster von Hsp70 entspricht einer bilobulären, langgestreckten Proteinstruktur, bestehend aus zwei Domänen denen unterschiedliche Funktionen zukommen, der NBD und der SBD, die durch ein exponiertes Linkersegment miteinander verbunden sind. Die NBD (45 kDa) zeigt eine Actin-ähnliche Faltung und besteht aus zwei globulären Subdomänen (I, II), die sich jeweils wiederum in zwei Untereinheiten (Ia, Ib, IIa, IIb) unterteilen lassen (siehe Abb. 30).²⁰²⁻²⁰⁵

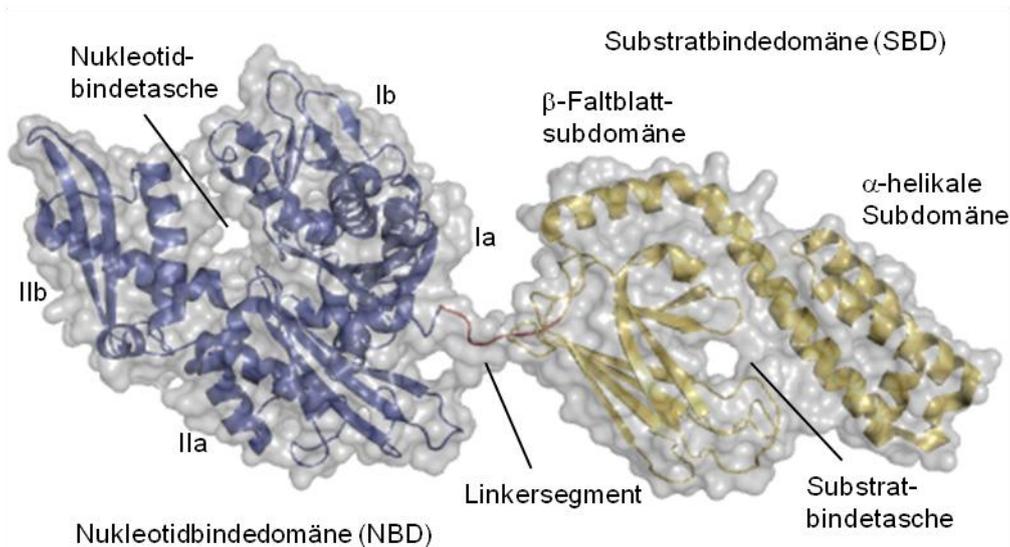


Abb. 30. Darstellung des strukturellen Aufbaus von Hsp70 anhand der experimentell aufgeklärten Proteinstruktur des prokaryotischen Hsp70-Enzyms DnaK des Bakteriums *E. coli* (PDB-Code 2KHO).

Die Nukleotidbindetasche, die für die Bindung des Cofaktors ATP verantwortlich ist, ist in den Bereichen Ia und IIa lokalisiert.^{202,205} Auch die SBD (25 kDa) besteht aus zwei Subdomänen, einer β -Faltblattsubdomäne (~15 kDa) und einer α -helikalen Subdomäne (~10 kDa).¹⁹⁶ Die β -Faltblattsubdomäne setzt sich aus zwei verdrehten β -Faltblattstrukturen mit jeweils vier antiparallel verlaufenden Strängen, die durch Schleifensegmente (*Loops*) miteinander verbunden sind, zusammen (siehe Abb. 31). Die α -helikale Subdomäne umfasst hingegen fünf α -Helices, von denen die Helices A und B an zwei Seiten an die β -Faltblattsubdomäne aggregiert sind. Die Bindung von Substratpeptiden erfolgt durch die Substratbindetasche, die von zwei Strängen und den verbindenden Schleifensegmenten (*Loops*) $L_{1,2}$ sowie $L_{3,4}$

gebildet wird und seitlich durch die α -helikale Subdomäne in Form von α -Helix B verschlossen wird. Der C-terminale Abschnitt der α -Helix B bildet darüber hinaus eine Salzbrücke sowie mehrere Wasserstoffbrücken zu den beiden äußeren Loops L_{3,4} und L_{5,6} und trägt zu einer engen Bindung von Substratpeptiden bei. Über die Funktionen der drei weiteren Helices C bis E ist bislang relativ wenig bekannt, jedoch könnten diese α -Helices, neben der Funktion als Oligomerisierungsdomäne (EEVD-Motiv) auch für eine Stabilisierung der α -Helix B verantwortlich sein. Das Fehlen dieser Helices führte in der Kristallstruktur 1YUW zu einer teilweisen Endwindung, einhergehend mit der intramolekularen Bindung des distalen Abschnitts der α -Helix B durch die Substratbindetasche.

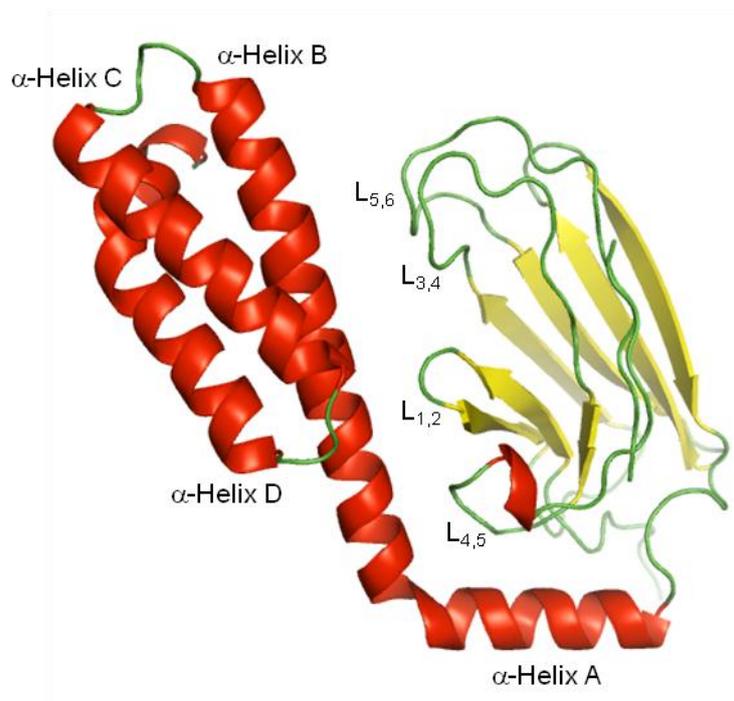


Abb. 31. Tertiärstruktur der Substratbindedomäne des prokaryotischen Hsp70-Enzyms DnaK des Bakteriums *E. coli* (PDB-Code 1DKZ), bestehend aus α -Helices (rot), β -Faltblattstrukturen (gelb) und Loopsegmenten (grün).

Die Zielregion Interdomäneninterface

Die Kristallstruktur 1YUW des bovinen Hsc70 zeigt eine Proteinkonformation, bei der die beiden Domänen aneinander aggregiert vorliegen. Die Schnittstelle zwischen den beiden Domänen, das sogenannte Interdomäneninterface, stellt aus morphologischer Sicht eine Furche dar, an dessen Ausbildung vor allem die beiden Proteinregionen Ia und IIa der NBD sowie die α -Helix A (Aminosäuren 513-524) der SBD beteiligt sind.

Die Morphologie des Interdomäneninterfaces wird wesentlich geprägt durch eine ladungsgestützte Wasserstoffbrücke auf der linken Seite zwischen Asp152 und Lys524 sowie durch ionische Interaktionen zwischen Arg171 und Glu513 auf der rechten Seite der Interface-region, wodurch eine Kavität im Zentrum zwischen den beiden Interdomänenkontakten ausgebildet wird (siehe Abb. 32). Im hinteren Bereich dieser Kavität befindet sich mittig eine kleine, relativ vergrabene Subtasche, die durch die drei hydrophoben Aminosäuren Leu210, Phe217 und Val219 geformt wird. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die hier dargestellte Beschreibung die Standardorientierung repräsentiert, in der das Protein bzw. das Interdomäneninterface in dieser Arbeit einheitlich betrachtet wird, sofern nicht andersweitig angegeben (siehe Abb. 32 und 33).

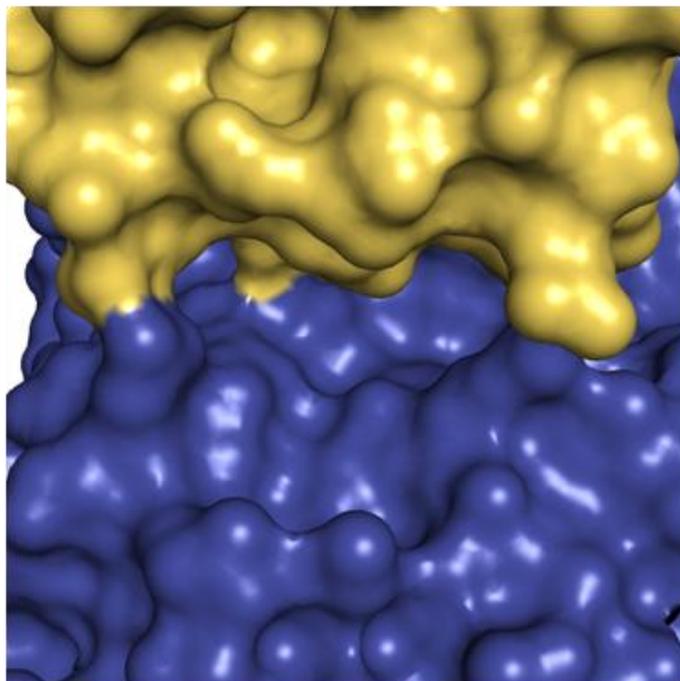


Abb. 32. Darstellung der Interdomänenkavität der bHsc70-Kristallstruktur 1YUW, bestehend aus NBD (blau) und SBD (gelb).

Weiterhin sind noch die drei Aminosäuren Glu516, Gln520 und Glu523 der α -Helix A sowie Arg155 und Asn174 der NBD wesentlicher Bestandteil der Interfacekavität, deren hydrophile Seitenketten in die Furche hineinragen und sowohl einen Einfluss auf die Struktur, als auch auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Kavität ausüben.

Aufgrund der Tatsache, dass sich bisher noch keine allgemein anerkannte Definition hinsichtlich der an der Ausbildung der Interdomänenkavität beteiligten Aminosäuren in der Literatur durchgesetzt hat, wird für die Beschreibung dieser Proteinregion in der vorliegenden Arbeit eine Definition postuliert. Der im Folgenden verwendete Begriff der unmittelbaren

Interdomäneninterfacekavität umfasst insgesamt 26 Aminosäuren, von denen die 18 Aminosäuren Ala148, Tyr149, Phe150, Asn151, Asp152, Arg155, Arg171, Ile172, Ile173, Asn174, Thr177, Ala178, Ile181, Leu210, Phe217, Glu218, Val219, Gln376 innerhalb der NBD und die weiteren 8 Aminosäuren Lys512, Glu513, Glu516, Arg517, Gln520, Glu521, Glu523 und Lys524 in der α -Helix A der SBD lokalisiert sind. Abbildung 33 gibt Auskunft über die einzelnen Aminosäuren der unmittelbaren Interfacekavität sowie über deren räumliche Anordnung.

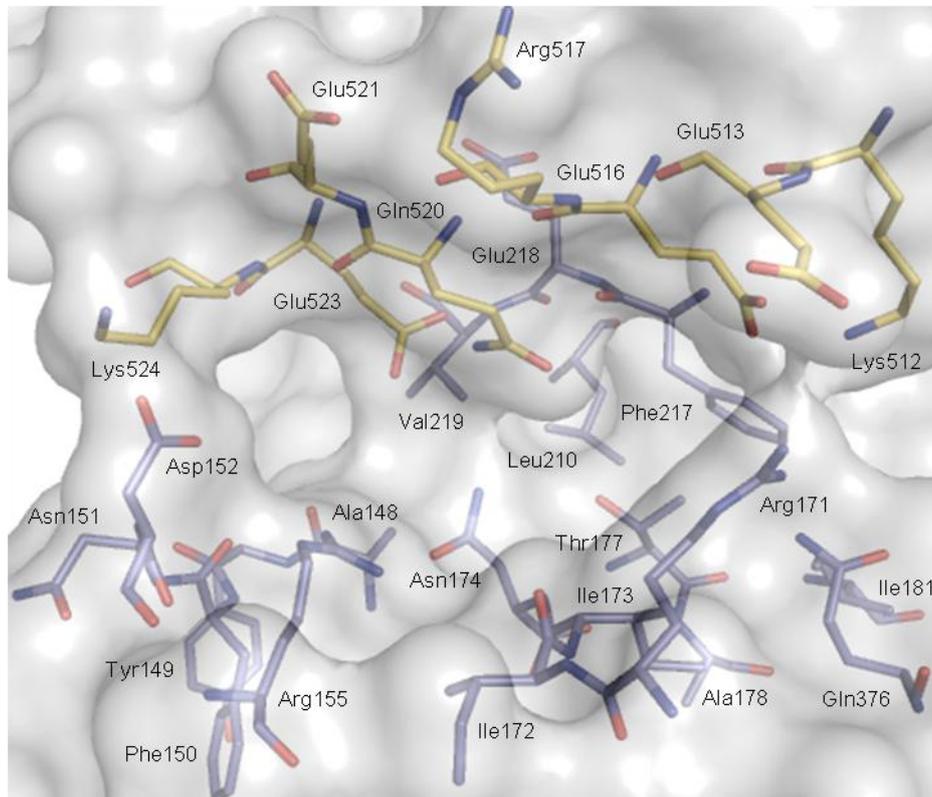


Abb 33. Darstellung der unmittelbaren Interdomänenkavität, koloriert entsprechend der Domänenzugehörigkeit zu der NBD (blau) oder der SBD (gelb).

IV.1.3 Katalytischer Mechanismus

Katalysierte Reaktionen

Hsp70 fungieren als molekulare Chaperone und besitzen eine zentrale Bedeutung für die zelluläre Proteinhomöostase sowie den Zellschutz. Die Enzyme erfüllen eine Vielzahl an biologischen Funktionen und sind in diversen zellulären Prozessen, wie z.B. der Faltung von Proteinen¹⁹⁵ (siehe auch Abschnitt IV.1.4), involviert, wobei den Enzymen das Nukleotid ATP als Cofaktor dient. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der katalytische Mechanismus

von Hsp70 zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht vollständig aufgeklärt war, soll dieser Abschnitt einen Überblick über die zum Zeitpunkt der Arbeit bekannten Details des katalytischen Mechanismus von Hsp70 sowie über daran beteiligte Co-Chaperone nach derzeitigem Wissensstand geben. Eine essenzielle Voraussetzung für die Ausübung der physiologischen Funktionen von Hsp70 besteht in der Fähigkeit der Enzyme, bestimmte Peptidsequenzen zu erkennen und diese vorübergehend zu binden.²⁰⁶ Die Erkennung und Bindung derartiger Peptidsegmente erfolgt durch die Substratbindetasche.^{194,196,206} Eine der zentralen biologischen Aufgaben des Hsp70-Chaperonsystems stellt die Faltung neu synthetisierter Polypeptidketten sowie die Neufaltung teilweise denaturierter Proteine dar.^{194,207} Im Rahmen der Faltungsprozesse kommt es vermehrt zu Rotationen um kovalente Bindungen des Polypeptidrückgrates der gebundenen Substratpeptide. Soweit zum Zeitpunkt der Arbeit bekannt war, kommt den Hsp70 dabei eine biochemische Bedeutung bei der Katalyse der Peptidbindungs-cis/trans-Isomerisierung zu. Für die prokaryotische Hsp70-Isoform DnaK, die als erstes Mitglied einer neuen Enzymklasse der Sekundären Amidischen Peptidbindungs-cis/trans-Isomerasen (APIasen) identifiziert worden ist, konnte bereits eine derartige katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Seitdem ist bekannt, dass diese Enzyme bei der Katalyse die cis/trans-Isomerisierung von sekundären amidischen Peptidbindungen selektiv beschleunigen.^{208,209}

Zusammenhänge zwischen der ATPase-Aktivität und Substratinteraktionen

Die Ausübung der verschiedenen biologischen Funktionen beruht auf der Fähigkeit der Hsp70 vorübergehend mit hydrophoben Peptidsegmenten von Substratproteinen interagieren zu können. An der Regulation der Wechselwirkungen zwischen Chaperon und Substrat sind der Cofaktor ATP und eine Vielzahl verschiedener Co-Chaperone beteiligt, die die ATPase-Aktivität modulieren.^{194,206} Für die Darstellung der zum Zeitpunkt der Arbeit verfügbaren Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen Substratbindung, Substratfreisetzung und ATP-Bindung, Hydrolyse sowie Nukleotidaustausch dient der in Abbildung 34 schematisch skizzierte Substrat-ATP-Zyklus.

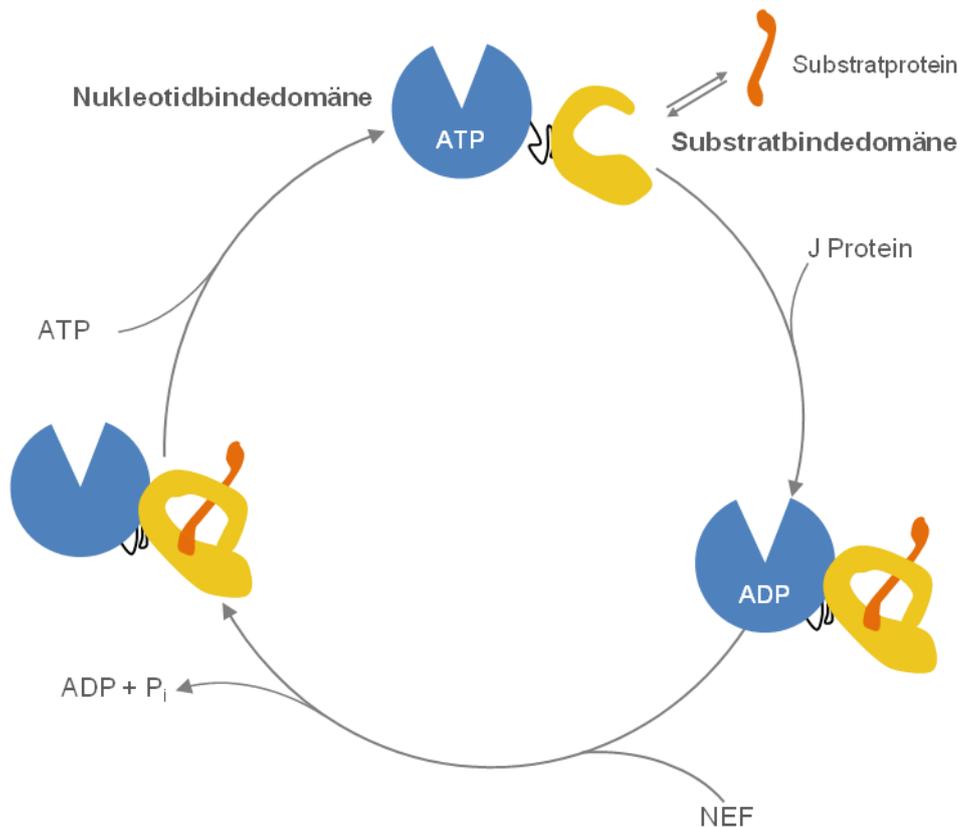


Abb. 34. Darstellung der Zusammenhänge zwischen der Substratbindung und –freisetzung der SBD und der intrinsischen ATPase-Aktivität der NBD von Hsp70 Chaperonen, bestehend aus NBD (blau) und SBD (gelb), im Zusammenspiel mit J-Domänen Proteinen (JDP) und Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) modifiziert nach Bukau *et al.*¹⁹⁴ und Mayer *et al.*²¹⁰.

Die Bindung des Cofaktors ATP durch die Nukleotidbindetasche führt zu einer 5-85 fachen Affinitätsabnahme der Substratbindetasche gegenüber gebundenen Substratpeptiden, wodurch es zu einer ~50 fachen Steigerung der Assoziationsraten kommt, während die Dissoziationsraten um 2-3 Größenordnungen zunehmen.^{211,212} Die Bindung von ATP führt demnach zu strukturellen Veränderungen der SBD, die wiederum die Substratbindungs-kinetiken beeinflussen. Die Nukleotidhydrolyse zu ADP ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase-Zyklus¹ vieler Hsp70-Chaperone und führt zu einer deutlichen Affinitätserhöhung der SBD zum Substrat, wodurch sich die Substratbindungs- und -freisetzungsvorgänge deutlich verlangsamen.^{213,214} Während isolierte Hsp70-Proteine nur über sehr geringe Hydrolyseraten verfügen, wie z.B. Hsc70 mit $0,003 \text{ sek}^{-1}$ und DnaK mit $0,0003 \text{ sek}^{-1}$, existieren *in vivo* verschiedene Co-Chaperone, die an Hsp70 binden und die Nukleotidumsetzung beeinflussen.^{215,216} Eine große Gruppe von Co-Chaperonen stellt die Familie der J-Domänen Proteine (JDP), wie z.B. Hsp40, dar, die die ATP-Hydrolyse stimulieren und alle eine konservierte, ~70 Aminosäuren umfassende J-Domäne enthalten, die für die Bindung an und Stimulation von Hsp70 verantwortlich ist.²¹⁷⁻²²¹ Wie experimentelle

Studien belegen, befindet sich mindestens eine Bindestelle der J-Domäne innerhalb der NBD von Hsp70. Durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen J-Domäne und Hsp70 kommt es zu einer näherungsweise 7-fachen Steigerung des ATP-Umsatzes.²⁰⁴ Gleichermäßen führen Interaktionen zwischen SBD und Substraten zu einer Erhöhung der Hydrolyserate, die suggerieren, dass die Interdomänenkommunikation zwischen NBD und SBD nicht einseitig ist, sondern dass eine gegenseitige allosterische Modulation vorliegt.

Den Abschluss des ATPase-Zyklus bildet die posthydrolytische Freisetzung von ADP, die durch eine weitere Klasse von Co-Chaperonen, den Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs, *nucleotide exchange factors*), unterstützt wird. Zu diesen Co-Chaperonen zählen GrpE-ähnliche Proteine, Proteine der BAG-Familie, HspBP1 sowie atypische Hsp70 homologe Proteine, wie z.B. Hsp110 und Hsp170. Die NEFs adressieren die NBD und begünstigen die Freisetzung von ADP sowie die erneute Bindung von ATP, wobei die verschiedenen Proteinfamilien unterschiedliche strukturelle Mechanismen nutzen.¹⁹⁴

Strukturelle Aspekte

Die dargestellten Erkenntnisse hinsichtlich des Substrat-ATPase-Zyklus von Hsp70 zeigen eine deutliche Kopplung der Substratbindung und –freisetzung der SBD mit der ATP-Bindung und -Hydrolyse sowie dem Nukleotidaustausch der NBD. Im Folgenden soll nun der Zyklus aus struktureller Sicht betrachtet werden.

Die Beobachtungen, dass die Substratbindung und –freisetzung bei gebundenem ATP schnell erfolgt, wohingegen bei gebundenem ADP sich der Substrataustausch verlangsamt^{151,211}, lassen darauf schließen, dass Hsp70 während des Substrat-ATPase-Zyklus zwischen zwei strukturellen Zuständen alterniert. Vor dem Hintergrund der Beobachtungen wurde vermutet, dass der Zustand mit gebundenem ATP mit einer geöffneten Substratbindetasche und einer geringeren Affinität zu Substratpeptiden korreliert, während der posthydrolytische Zustand mit gebundenem ADP mit einer überwiegend geschlossenen Bindetasche einhergeht, wodurch die gebundenen Substratpeptide mit einer höheren Affinität gebunden werden.^{194,201,206,222,223} In Folge der ATP-Hydrolyse kommt es demnach zu Konformationsänderungen innerhalb der SBD, die zu einer Schließung der Substratbindetasche führen.^{206,210,212,222}

Die Freisetzung und erneute Bindung von Substraten erfordert wiederum erhebliche Konformationsänderungen innerhalb der SBD, die zu einer Öffnung der Peptidbindetasche führen. Neben einer Entfernung der die Substratbindetasche seitlich verschließenden α -Helix B von der β -Faltblattsubdomäne der SBD (siehe Abschnitt IV.1.2), erscheint es derzeit sehr wahrscheinlich, dass zudem auch strukturelle Veränderungen innerhalb der

Substratbindetasche der β -Faltblattsubdomäne an diesem Prozess beteiligt sind.²⁰⁶ In diesem Zusammenhang sei auf die Publikation von Erbse *et al.*²⁰⁶ hingewiesen, wonach die β -Faltblattsubdomäne eine offene als auch eine geschlossene Bindetaschenkonformation einzunehmen vermag.

Für die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der Informationsübertragung zwischen den beiden Domänen wurden bereits einige Studien durchgeführt, die auf eine Involvierung des Linkersegments hinweisen.^{201,224-226} Darüber hinaus wird diskutiert, dass der ATP-Umsatz nicht nur Auswirkungen auf die Konformation der SBD und auf die Substratbindungskinetiken hat, sondern auch Bewegungen der SBD relativ zur NBD verursachen könnte.²²⁷ Hierzu passen die Ausführungen von Bertelsen *et al.*²²⁸, wonach NBD und SBD ohne gebundenes Nukleotid keine umfassenden Interaktionen auszubilden scheinen und demnach weitestgehend getrennt voneinander vorliegen sowie von Mayer *et al.*²¹⁰, wonach sich die beiden Domänen in Folge einer Bindung von ATP zusammenzulagern scheinen. Eine große ATP-getriebene Konformationsänderung in Hsp70-Enzymen ist konsistent mit den Ergebnissen von *small-angle X-ray scattering*-Experimenten, die zeigten, dass eine Bindung von ATP an bHsc70 und DnaK zu Veränderungen der Größe und Form führt.^{229,230}

Als Erklärungsansatz für den experimentell beobachteten Zusammenhang zwischen ATP-Umsatz und Substratinteraktionskinetiken sowie den vermeintlichen zugrundeliegenden Konformationsänderungen der Hsp70-Proteine wurde zum Zeitpunkt der Arbeit eine Theorie eines allosterischen Mechanismus' diskutiert.^{194,201,210,224,231,232} Zum Zeitpunkt der Arbeit waren jedoch noch viele Zusammenhänge des komplexen Mechanismus' der zugrundeliegenden Regulation nur unzureichend aufgeklärt und stellten somit Gegenstand zukünftiger Studien dar.

IV.1.4 Physiologische Bedeutung

Hsp70 ist ein zentraler Bestandteil des Chaperonsystems mit essenzieller Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, wobei die einzelnen Mitglieder sowohl über redundante als auch spezifische Funktionen verfügen. Während die biologischen Aufgaben der stressinduzierbaren Isoformen offensichtlich vorrangig im Schutz von Zellen unter unphysiologischen Bedingungen, wie z.B. der Exposition ungewöhnlich hoher Temperaturen, Strahlung oder Chemikalien sowie der Regeneration geschädigter Zellen liegen, sind die konstitutiv exprimierten Enzyme unter physiologischen Bedingungen an vielfältigen

Prozessen des Zellhaushalts, unter anderem der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase, beteiligt.^{188-190,204}

Wie bereits in Abschnitt IV.1.3 erwähnt, spielt Hsp70 bei der Proteinfaltung eine zentrale Rolle.^{195,233} Bei der Faltung fehlerhaft gefalteter Proteine bestehen die wesentlichen Aufgaben der Chaperone in der Verhinderung einer unkontrollierten intermolekularen Aggregation durch die Bindung und Stabilisierung des Peptidsubstrats sowie in der anschließenden Unterstützung der Faltung von Polypeptidketten zur nativen Konformation.^{189,234} Im zellulären Umfeld spielen diese enzymatischen Funktionen der Hsp70 nicht nur bei der co- und post-translationalen Faltung neu synthetisierter Proteine²⁰⁷ sondern auch bei der Wahrnehmung von Kontrollaufgaben hinsichtlich der Proteinqualität^{189,195} eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der Ausübung dieser Kontrollfunktionen ist Hsp70 dafür verantwortlich die Strukturen von Proteinen zu überwachen, fehlerhafte Proteinkonformere, wie z.B. teilweise denaturierte oder aggregierte Proteine, zu erkennen und diese zu korrigieren. Die Reaktivierung aggregierter Proteine erfolgt dabei in Zusammenarbeit mit Hsp100-Chaperonen, wie Hsp104 oder ClpB (in *E. coli*). Nach der erfolgten Auflösung der Proteinaggregate wird die Faltung des nativen Zustands unterstützt.²³⁵⁻²³⁷ In diesem Zusammenhang sei zudem erwähnt, dass Hsp70 nicht nur bei der Disassemblierung von Proteinkomplexen sondern auch bei den entgegengesetzten Vorgängen, der Zusammenlagerung von Proteinen zu Komplexen eine Rolle spielt.

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase sind die Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie zudem auch an Abbauprozessen instabiler und fehlerhaft gefalteter Proteine beteiligt.^{238,239} Hsp70 spielt in diesem Zusammenhang sowohl beim Ubiquitin-Proteasom-System wie auch bei der lysosomalen Proteolyse eine Rolle, wobei den Chaperonen jeweils eine Auswahlfunktion zukommt. Die Verbindung mit dem Ubiquitin-Proteasom-System erfolgt dabei durch bestimmte Co-Chaperone, insbesondere durch CHIP, das als Ubiquitin-E3-Ligase für die von Hsp70 gebundenen Proteine fungiert und diese durch Ubiquitinierung für die Degradierung durch das Proteasom markiert.^{189,240} Bei der lysosomalen Proteolyse, genauer gesagt der Chaperon-vermittelten Autophagozytose, werden Proteine, die ein bestimmtes Motiv aufweisen, zunächst von einem Hsp70/Hsp90-Chaperonkomplex, der zudem noch weitere Co-Chaperone wie Hsp40/DnaJB1, Hip, Hop und Bag-1 umfasst, erkannt.¹⁸⁹ Im Anschluss bindet dieser Komplex über das gebundene Peptid an einen lysosomalen Membranrezeptor (LAMP-2A). Eine zusätzliche Funktion des Chaperonkomplexes besteht in der Entfaltung der Proteine für den Import in das Lysosom.^{241,242} Weiterhin wurde Hsp70 auch im Lumen von Lysosomen gefunden, wo diese Enzyme am Proteinimport beteiligt sind.

Wie dieser Sachverhalt zeigt, zählt auch der Transport von Proteinen zwischen zellulären Kompartimenten zu den biologischen Aufgaben von Hsp70.²⁴³ Neben dem Proteintransport in Lysosomen wurde zudem auch eine Beteiligung von Hsp70 an Transportvorgängen von Proteinen in Mitochondrien und in das Endoplasmatische Retikulum beschrieben.^{244,245} In Analogie zur Beteiligung an den Transportvorgängen in Mitochondrien durch mtHsp70, erleichtert die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Isoform Bip (Hsp70-5) den Transport von Proteinen in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums sowie deren anschließende Faltung.²⁴⁶⁻²⁴⁸

Darüber hinaus ist Hsp70 auch für die Kontrolle der biologischen Aktivität regulatorischer Proteine, wie Nukleäre Rezeptoren, Kinasen sowie Transkriptionsfaktoren beteiligt.^{194,204,207,233,249} Hsc70 wurde beispielsweise eine Rolle bei der Zytokin-vermittelten post-transkriptionellen Regulation des pro-apoptotischen Proteins Bim, einem Mitglied der Bcl-2 Familie, in humanen Blutzellen zugewiesen.²⁵⁰

Zusätzlich zur Kontrolle regulatorischer Proteine ist auch eine Beteiligung von Hsp70 an der Regulierung des Zellzyklus²⁵¹, der Zelldifferenzierung sowie der Apoptose²³⁴, bekannt. So konnte unter anderem in Mauszellen gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Hsp70-Konzentration zu einer Abnahme der durch Strahlen verursachten Schäden führte, einhergehend mit einer Erniedrigung der Apoptoserate.²⁵²

Abschließend sei neben den beschriebenen, vielfältigen biologischen Funktionen intrazellulärer Hsp70-Isoformen noch auf immunstimulatorische Wirkungen in bzw. auf Zellmembranen lokalisiertes Hsp70 hingewiesen, dem eine Schlüsselrolle bei der Induktion der zellulären Immunantwort zukommen könnte, worauf diverse Studien zunehmend hindeuten.²⁵³

IV.1.5 Pathophysiologie: Hsp 70 – ein therapeutisches Target

Die Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie erfüllen ein breites Spektrum wichtiger biologischer Aufgaben und sind für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase von zentraler Bedeutung (siehe Abschnitt IV.1.4). Zudem mehren sich die Hinweise, dass die Enzyme auch an diversen pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. So konnte bis heute bereits die Involvierung von Hsp70 an einer Reihe verschiedener Krankheiten, wie z.B. Krebserkrankungen, neuro-degenerativen Erkrankungen und Infektionskrankheiten, durch mehrere Studien bestätigt werden.²⁰⁴ Die Forschung am Target Hsp70 erfolgte im Rahmen eines Teilprojekts der Klinischen Forschergruppe 216 mit dem Ziel der Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapien für die Behandlung einer bestimmten Krebserkrankung, dem

Multiplen Myelom. Aus diesem Grund soll der Schwerpunkt dieses Abschnitts auf die Darstellung der Rolle der Enzyme bei Krebserkrankungen gelegt werden.

Die Rolle von Hsp70 bei Krebserkrankungen

In den letzten Jahren häufen sich Indizien, die auf eine Beteiligung von Hsp70 an der Entstehung und Aufrechterhaltung onkologischer Signalwege bei verschiedenen Krebserkrankungen hindeuten. Aufgrund der belegten Beteiligung der Enzyme an vielfältigen Prozessen hinsichtlich der Regulation des Zellzykluses, die unter anderem deren Involvierung an der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose umfasst, erscheint eine pathologische Rolle von Hsp70 für onkogene Prozesse nicht unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang konnte bereits anhand experimenteller Daten deutlich gezeigt werden, dass Hsp70 von Bedeutung für das Überleben von Krebszellen ist und in verschiedenen malignen Tumoren übermäßig exprimiert wird²⁵⁴⁻²⁵⁸ sowie, dass eine hohe Konzentration an Hsp70 für das Überleben von Tumorzellen verschiedenen Ursprungs erforderlich ist.^{192,254,255,259} In diesem Zusammenhang wurden bereits Studien publiziert, die dokumentieren, dass eine hohe Hsp70-Expression nicht nur für das Überleben verschiedener Tumorzellen *in vitro*, sondern auch für das Wachstum humaner Tumortransplantate in immungeschwächten Mäusen notwendig ist.^{259,260} Andere Untersuchungen identifizierten eine Korrelation zwischen der Expression von Hsp70 und einer gesteigerten Zellproliferation, einer mangelnden Zelldifferenzierung, Lymphknotenmetastasen sowie einem geringen Behandlungserfolg bei Brustkrebs.^{179,255,261-263} Daneben wurden hohe Hsp70-Konzentrationen mit einer schlechten Prognose bei Endometrium-, Kolorektal- und Prostatakrebs sowie bei einigen Leukämien in Verbindung gebracht.^{256,258,264,265} Weiterhin konnte von Seo *et al.* nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von Hsp70 ausreicht, um die Entstehung von T-Zelllymphomen in transgenen Mäusen zu induzieren.²⁶⁴ Diese Feststellung ist deswegen von besonderer Bedeutung, da, wie bereits erwähnt, die Expression von Hsp70 in Krebszellen fehlreguliert sein kann, was möglicherweise auf eine veränderte Aktivität des Hitzeschocktranskriptionsfaktors 1 (Hsf1) zurückzuführen ist.^{255,266,267} Eine vermeintliche Beteiligung von Hsf1 an der Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen verdeutlicht die Beobachtung, dass Hsf1-Knockout Mäuse vor der Entwicklung bestimmter maligner Tumore geschützt waren.²⁶⁸

Hinsichtlich der Rolle von Hsp70 beim Multiplen Myelom (MM), einer Krebserkrankung des Knochenmarks, die durch eine maligne Vermehrung von Plasmazellen gekennzeichnet ist, gelang es Mitgliedern der Klinischen Forschergruppe 216, Hsp70 eine pathologische Beteiligung nachzuweisen.²⁶⁹ Die Resultate experimenteller Untersuchungen bestätigten auch beim MM eine Hsp70-Überexpression in den entarteten Plasmazellen im Vergleich zu

normalen Plasmazellen.²⁶⁹ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine genetische Herunterregulierung von Hsp70, ebenso wie bei anderen Krebserkrankungen, Apoptose in MM-Zellen induziert.²⁷⁰ Darüber hinaus führte eine Herunterregulierung des Hsp70-Transkriptionsfaktors Hsf1 ebenfalls zu Apoptose in den untersuchten MM-Zellen.²⁷¹ Diese experimentellen Beobachtungen suggerieren, dass den beiden Proteinen Hsp70 und Hsf1 eine entscheidende Rolle für das Überleben von MM-Zellen zukommt und sie demnach potenzielle Zielstrukturen zur Behandlung von MM darstellen.

Beteiligung von Hsp70 an pathophysiologischen Signalwegen

Obwohl zum Zeitpunkt der Arbeit weder das Ausmaß der Beteiligung von Hsp70 an der Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen, noch dessen Rolle an den zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozessen vollständig bekannt war, schien die anti-apoptotische Wirkung von Hsp70 auf Interaktionen mit verschiedenen Schlüsselproteinen der Apoptosemaschinerie zu basieren. Eine diskutierte Hypothese besagt, dass eine Überexpression von Hsp70 den Krebszellen einen Überlebensvorteil bietet, da die Proteine in der Lage sind, sowohl mit mehreren Komponenten des Caspase-abhängigen, als auch des Caspase-unabhängigen apoptotischen Signalwegs zu interagieren.^{255,272,273} In Bezug auf die Caspase-abhängigen Prozesse konnte unter anderem anhand verschiedener Studien dokumentiert werden, dass Hsp70 den wichtigen Apoptosemediator Bcl-2 reguliert²⁷⁴ und dass die Expression von Hsp70, die mittels TNF induzierte Apoptose, die Aktivierung der Caspase-3, die Translokation von Bax sowie die Spaltung von PPAR hemmt.²⁷⁵⁻²⁷⁸ Hinsichtlich der Verhinderung der Translokation von Bax konnte mittels Immunpräzipitation eine direkte Interaktion zwischen Hsp72 und Bax nachgewiesen werden²⁷⁶, wobei Hsp72 dessen Oligomerisierung unterbindet, einer Notwendigkeit für die Perforation der Mitochondrienmembran für die nachfolgende Freisetzung von Zytocrom c.^{277,278}

Die Blockade des Caspase-unabhängigen Signalwegs durch Hsp70 basiert unter anderem auf der Beeinflussung bestimmter Proteasen (wie z.B. Cathepsine), Kinasen (wie z.B. c-Jun N-terminale Kinasen, JNK) und AIF (*apoptosis inducing factor*).²⁷⁹ Diesbezüglich konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von Hsp70 die Freisetzung von Cathepsin B steigert und Lysosomen vor einer Foto- und Wasserstoffperoxid-vermittelten Permeabilisierung schützt.²⁸⁰ Interessanterweise scheint es als ob die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsp70 nicht für jede der beschriebenen Funktionen benötigt wird, was sich beispielsweise anhand der Nukleotidhydrolyse-unabhängigen Wirkung von Hsp70 auf JNK und AIF belegen lässt.²⁸¹⁻²⁸⁴ Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass durch die Interaktion von Hsp70 mit mehreren Proteinen verschiedener apoptotischer Signalwege und

durch das Eingreifen an unterschiedlichen Stellen der Signalwege, Hsp70 umfangreiche anti-apoptotische Effekte besitzt.

Experimentelle Anwendung von Hsp70-Inhibitoren

Die bisher aufgeführten Erkenntnisse experimenteller Studien weisen deutlich auf eine potenzielle Schlüsselrolle von Hsp70 in der Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen hin und lassen eine gewisse Abhängigkeit von Krebszellen von Hsp70 erkennen.²⁸⁵ Folgerichtig wird aus diesem Grund seit einiger Zeit über die Möglichkeit der Nutzung dieser Proteinfamilie als biologische Zielstrukturen für die Therapie bestimmter Krebserkrankungen diskutiert. In diesem Zusammenhang existieren bereits einige Studien, die den Nutzen einer therapeutischen Hsp70-Inhibition bei Krebserkrankungen dokumentieren. So konnte anhand von verschiedenen Krebszellmodellen deutlich gezeigt werden, dass shRNA-vermittelte Herunterregulierung von Hsp70 Apoptose induziert und die gesteigerte Zellproliferation verlangsamt.^{254,256,259,286,287} Hsp70-Antisensekonstrukte zeigten in entarteten Zellen chemosensibilisierende Eigenschaften und konnten im Zusammenhang mit einer adenoviralen Infektion ohne weitere Stimuli Krebszellen abtöten.²⁵⁴ Der zytotoxische Effekt einer Herunterregulierung von Hsp70 wird besonders bei transformierten Zellen deutlich, wohingegen dieser Effekt in normalen, nicht transformierten Zellen oder Primärzellen bislang noch nicht beobachtet werden konnte.²⁸⁸ Die genannten Beobachtungen wurden bisher damit erklärt, dass Tumorzellen im Vergleich zu physiologisch intakten Zellen einen konstitutiv gestressten Phänotyp mit einer gesteigerten Abhängigkeit gegenüber der zytoprotektiven Wirkung von Hsp70 aufweisen.²⁸⁹

Auch die Beobachtung, dass eine simultane Inhibition von Hsp72 und Hsc70 tumorspezifische Apoptose induziert, unterstreicht die vermeintlich pathophysiologische Bedeutung dieser Enzyme bei Krebserkrankungen sowie deren Potenzial als molekulares Target in der Krebstherapie.²⁹⁰ In diesem Zusammenhang war es beispielsweise mittels RNA-Interferenz möglich zu belegen, dass ein siRNA/RNAi-vermittelter *Knockdown* von Hsp72 und Hsc70 Apoptose in humanen MM-Zellen induziert.²⁹¹

Basierend auf den beschriebenen Beobachtungen ist davon auszugehen, dass die Anwendung von Hsp70-Inhibitoren sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Zytostatika zukünftig in der Krebstherapie eine wichtige Rolle spielen könnte.

IV.1.6 Hsp70-Inhibitoren

Die zunehmenden Erkenntnisse hinsichtlich der Beteiligung von Hsp70 an diversen pathophysiologischen Prozessen im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen rückten die Hsp70-Enzyme als pharmakologische Zielstrukturen in den Fokus des Wirkstoffdesigns. Auf der Grundlage des in Abschnitt IV.1.3 beschriebenen allosterischen Mechanismus zwischen ATPase-Aktivität und Substratbindung bieten sich am Target Hsp70 für die Wirkstoffentwicklung mehrere potenzielle Angriffspunkte für eine pharmakologische Inhibierung der Enzymaktivität durch niedermolekulare Verbindungen an:

- a) eine Inhibition des ATP-Umsatzes durch eine Adressierung der Nukleotidbindetasche oder durch eine Störung von Protein-Protein-Kontakten von Hsp70 und dessen Co-Chaperonen,
- b) eine Hemmung der Bindung von Substratpeptiden durch eine Besetzung der Substratbindetasche sowie
- c) eine Unterbindung der Interdomäneninteraktionen.

Im Rahmen der Forschungsarbeit am Target Hsp70 gelang es in den letzten Jahren bereits erste niedermolekulare Verbindungen zu identifizieren, die Hsp70 inhibieren.^{204,289} Diese Liganden lassen sich anhand des zugrundeliegenden chemischen Grundgerüsts einem breiten Spektrum verschiedener Molekülklassen zuordnen und weisen eine hohe strukturelle Diversität auf. Eine Vielzahl der bereits bekannten Hsp70-Inhibitoren lassen sich einer der folgenden chemischen Klassen zuordnen:

- Spergualinähnliche Verbindungen,
- Dihydropyrimidine,
- Fettsäuren,
- Thiophencarboxamide,
- Peptide und
- ATP-Analoga.

Das Molekül (-)-Spergualin wurde 1981 von Umezawa *et al.* als eine Verbindung mit antibiotischer und antitumoraler Wirkung beschrieben, die die Autoren aus *Bacillus* sp identifizierten (siehe Abb. 35).^{292,293} Die begrenzte Stabilität des Moleküls *in vitro* und *in vivo* führte zur Synthese von Strukturanaloga, wie dem 15-Deoxyspergualin (15-DSG).^{294,295} Experimentelle Studien zeigten die Bindung von 15-DSG und dessen Derivaten an verschiedene Proteine, darunter auch Hsc70 und Hsp90.²⁹⁶⁻²⁹⁹ Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen und Kompetitionsanalysen konnte weiterhin gezeigt

werden, dass 15-DSG an das EEVD-Motif mit einer Affinität von $\sim 5 \mu\text{M}$ bindet.^{299,300} Da die Verbindung 15-DSG trotz einer verbesserten Stabilität nur über eine geringe Bioverfügbarkeit verfügt, erfolgte die Entwicklung einer Serie von Derivaten, bei denen die Amide invertiert vorlagen. Dies trug zu einer deutlichen Verbesserung der Stabilität sowie der Aktivität dieser Verbindungen bei.^{301,302}

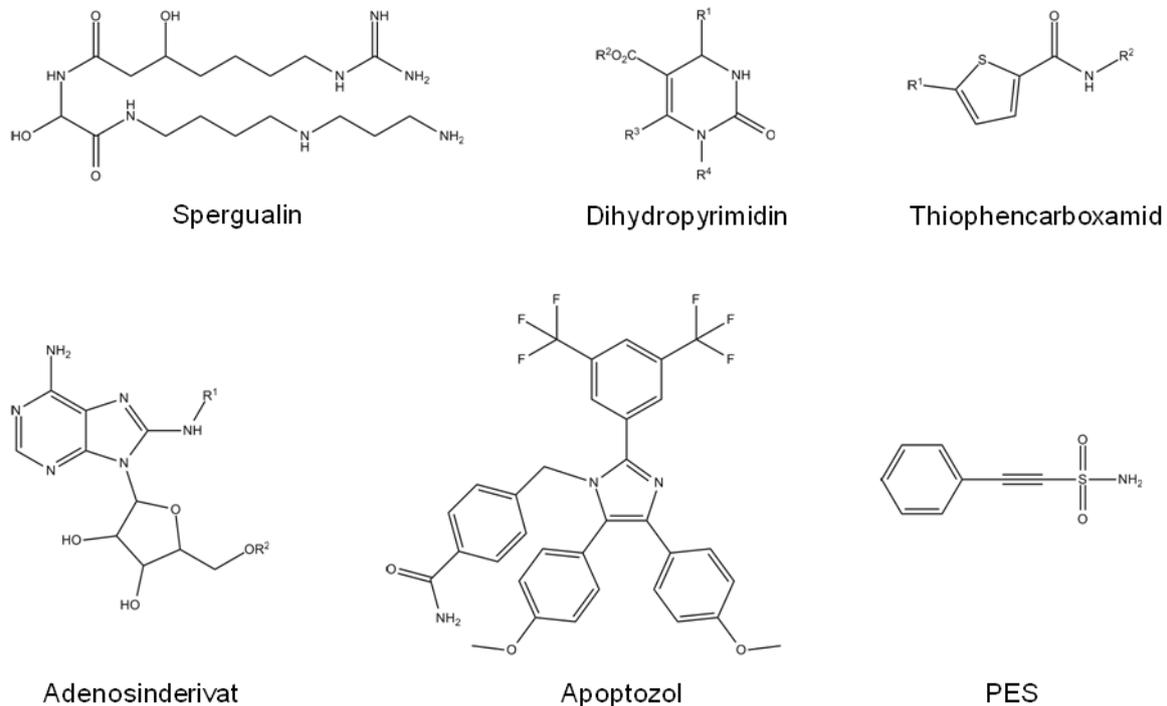


Abb. 35. Strukturformeln bekannter Hsp70-Inhibitoren verschiedener Molekülklassen.

Auf der Suche nach weiteren Verbindungen, die die Hsp70-ATPase-Aktivität modifizieren, fokussierten sich Fewell *et al.*, geleitet von der strukturellen Ähnlichkeit zu 15-DSG, auf eine Serie von Dihydropyrimidinen.³⁰³ Für mehrere Verbindungen dieser Serie konnte eine Inhibition der ATP-Hydrolyse experimentell gezeigt werden, während einige Moleküle die ATPase-Aktivität verstärkten.³⁰³ Darüber hinaus wurde die biologische Aktivität einer weiteren Molekülserie, die 17 Dihydropyrimidine umfasste, an Hsc70 oder an DnaK getestet. Die Verbindungen wiesen allerdings eine geringe Effizienz mit EC₅₀-Werten zwischen ~ 75 - $300 \mu\text{M}$ auf.³⁰⁴ Obwohl die bis heute identifizierten Dihydropyrimidine nur über eine geringe biologische Aktivität verfügen, lieferten diese Moleküle durch deren Untersuchung in verschiedenen biologischen Systemen Einblicke in die Rolle von Hsp70 bei verschiedenen Krankheiten, wie z.B. bei Krebserkrankungen.^{305,306}

Eine weitere Verbindungsklasse mit einer experimentell belegten Hsp70-Inhibition repräsentieren bestimmte Fettsäuren, wie Sulfoglycolipide. Für die Verbindung adaSGC beispielsweise wurde ein IC₅₀-Wert von ~50 µM ermittelt. Es ist zudem bekannt, dass es sich bei dem Molekül um einen nichtkompetitiven Inhibitor der ATPase-Aktivität handelt.³⁰⁷ Mamelak und Lingwood gelang es für zwei Vertreter dieser Verbindungsklasse, Sulfogalactosylceramid und Sulfogalactoglycerolipid, experimentell deren Bindungsstelle innerhalb der NBD nachzuweisen.³⁰⁷ In Analogie zu den anderen bereits genannten Inhibitoren der ATPase-Aktivität ist auch die Aktivität von adaSGC abhängig von J-Domänen Cochaperonen. Eine weitere Gruppe fettsäureähnlicher Derivate mit inhibitorischer Wirkung auf Hsp70 repräsentieren Acylbenzamide. Diese Verbindungsklasse geht auf die Arbeitsgruppe von Schiene-Fischer zurück, die sich auf der Suche nach potenziellen Antibiotika mit einer Adressierung der cis/trans Aminopeptidylisomerase-Aktivität des prokaryotischen Hsp70-Enzyms DnaK beschäftigten.^{208,209,308}

Einen weiteren Versuch, Liganden des prokaryotischen Hsp70-Enzyms DnaK zu identifizieren, unternahmen Celliti *et al.*³⁰⁹. Der Fokus lag dabei auf der Identifizierung von Grundgerüsten, die die SBD adressieren, wie die Thiophen-2-carboxamide. Auf der Grundlage dieser Entdeckungen wurde eine Serie von Derivaten synthetisiert, die entweder über ein Thiophen- oder ein Furanfragment verfügten und sich unter anderem durch verschiedene hydrophobe Gruppen am Carboxamid unterschieden. Für einzelne Mitglieder dieser Serie konnte eine antimikrobielle Aktivität experimentell nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Molekülklassen existieren bereits Untersuchungen über die Eignung verschiedener Peptide als potenzielle Hsp70-Inhibitoren, wie beispielsweise einer Serie von Peptidsegmenten, die sich jeweils aus 18-20 Aminosäuren zusammensetzten und vermehrt Prolin enthielten, wie z.B. Drosocin, Pyrrhocoricin, und Apidaecin. Für die Verbindungen wurde eine Bindung an DnaK sowie ein Abtöten empfindlicher Bakterien, ohne dabei eukaryotische Zellen zu beeinträchtigen, beschrieben.³¹⁰

Aufgrund der zentralen Bedeutung der ATPase-Aktivität für die Enzymfunktion von Hsp70 rückten niedermolekulare Verbindungen in den Fokus, die kompetitiv mit dem Cofaktor ATP um die Nukleotidbindetasche konkurrieren. Dieser Ansatz weist Analogien zu Wirkstoffen der Zielstruktur Hsp90 auf, bei der ATP kompetitive Moleküle, wie z.B. Geldanamycin und entsprechende Derivate bereits eine biologische Aktivität zeigten.²⁸⁹

Ein Beispiel für rationales Wirkstoffdesign lieferten in diesem Zusammenhang Williamson *et al.*, die einen strukturbasierten Ansatz verfolgten und Adenosinderivate

entwickelten, die als kompetitive Inhibitoren mit ATP um die Nukleotidbindetasche konkurrieren.³¹¹ Mit Hilfe eines Fluoreszenzpolarisationsassays wurden die Adenosinderivate hinsichtlich der Affinität zu der Nukleotidbindestelle untersucht. Weiterhin konnte für einige der Verbindungen eine biologische Aktivität gegenüber HCT 116 Kolonkarzinomzellen experimentell nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Mitglieder dieser Inhibitor-Klasse sich zudem prinzipiell eignen, die Wirkung von Hsp90-Inhibitoren in HCT 116 Kolonkarzinomzellen zu potenzieren, wie die Studie von Massey *et al.* ergab.³¹² Diese Erkenntnis bekräftigt die in der Fachliteratur beschriebene vielversprechende Möglichkeit der potenziellen pharmakologischen Anwendung einer Kombination von Hsp70- und Hsp90-Inhibitoren.²⁸⁹

Neben den bisher beschriebenen Verbindungsklassen bekannter Hsp70-Inhibitoren existieren eine Reihe weiterer Einzelmoleküle, für die eine Bindung an und bzw. oder eine modulatorische Wirkung auf Hsp70 experimentell belegt ist. Hierbei soll nachfolgend besonders auf die zwei Moleküle 2-Phenylethinsulfonamid (PES) und Apoptozol näher eingegangen werden.

Leu *et al.* publizierten 2009 die Identifizierung von PES, einer niedermolekularen Verbindung mit inhibitorischer Wirkung auf Hsp70.³¹³ Mit Hilfe eines PES-Biotin-Konjugats konnte Hsp72 als molekulares Target identifiziert werden. Durch eine Deletionsanalyse gelang es, die Bindestelle auf den Bereich des C-Terminus einzugrenzen. Ebenso wie viele andere Hsp70-Inhibitoren besitzt auch PES eine selektive Toxizität gegenüber Krebszelllinien, wobei der zugrundeliegende Wirkmechanismus derzeit noch unklar ist. Weiterhin untersuchten die Autoren mittels Immunopräzipitation die Wirkung von PES auf die Zusammensetzung von Hsp70-Chaperon-Komplexen in verschiedenen Zelllinien. Die Studien ergaben, dass PES die Interaktion zwischen Hsp72 und einigen BAG-Proteinen sowie die Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor p53 unterbindet. Die experimentellen Daten suggerieren, dass PES eine Modifizierung der Enzymfunktion durch eine Veränderung der Assoziation von Hsp70 mit dessen Co-Chaperonen bedingt.

Schließlich sei an dieser Stelle noch eine weitere interessante niedermolekulare Verbindung mit Apoptose-induzierender Wirkung und der passenden Bezeichnung Apoptozol (Az) erwähnt, die 2008 von Williams *et al.* beschrieben wurde.³¹⁴ Dieses Molekül besteht aus einem zentralen Imidazolring, der mit drei substituierten Phenylringen sowie einem Methylphenylbenzamidrest substituiert ist (siehe Abb. 35). Den Autoren gelang es, für Az sowohl die Bindung an Hsp70 als auch an Hsc70 mittels Affinitätschromatografie nachzuweisen. Eine Messung der Bindungsaffinitäten des Moleküls hinsichtlich Hsp70 (K_d : 0,14 μ M) sowie Hsc70 (K_d : 0,21 μ M) mittels *surface plasmon resonance spectroscopy*

belegt mit K_d -Werten im unteren micromolaren Bereich sowohl eine signifikante Bindung des Az als auch eine vergleichbare Bindungsstärke gegenüber beiden Proteinisoformen. Aufgrund der Apoptose-induzierenden Fähigkeit des Az in Verbindung mit der bekannten Beteiligung der beiden Chaperone Hsp70 und Hsc70 an verschiedenen Krebserkrankungen, die teilweise auf die anti-apoptotischen Aktivitäten dieser Enzyme zurückzuführen sind, wurde die Verbindung zudem auf deren Zytotoxizität gegenüber mehreren Krebszelllinien untersucht. Die Untersuchung des zytotoxischen Potenzials von Az erfolgte dabei an den drei Krebszelllinien SK-OV-3 (0,22 μ M; Ovarialkrebszellen), HCT-15 (0,25 μ M; Kolonkrebszellen) und A549 (0,13 μ M Pulmonalkrebszellen). Diese Ergebnisse dokumentieren das Potenzial des Az als ein mögliches Zytostatikum das Hsp70 adressiert und dabei möglicherweise die Funktion der Enzyme inhibiert. Neben dem zum Zeitpunkt der Arbeit noch unbekanntem zugrundeliegenden Wirkmechanismus war auch die Bindestelle des Az an Hsp70 noch unbekannt (siehe Abschnitt IV.3.1).

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Moleküle liefern einen Überblick über die verschiedenen Verbindungsklassen, der zum Zeitpunkt der Arbeit von Januar 2008 bis Juni 2011 bekannten Inhibitoren von Hsp70. Die Entwicklung von Hsp70-Modulatoren als therapeutisch nutzbare Wirkstoffe stand zum damaligen Zeitpunkt jedoch gerade erst am Anfang und es fehlten niedermolekulare Verbindungen, die effizient und selektiv Hsp70 inhibieren, weshalb die Notwendigkeit bestand, die Forschung auf diesem Gebiet zu intensivieren.

IV.2 Aufgabenstellung

Die primäre Zielsetzung der Forschungsarbeit an der biologischen Zielstruktur Hsp70 bestand in der Identifizierung und Entwicklung von niedermolekularen Liganden des Interdomäneninterfaces als eine neue Klasse von Hsp70-Inhibitoren unter Anwendung verschiedener Verfahren des computergestützten Wirkstoffdesigns. Bei der Zielregion handelt es sich um eine neue potenzielle Bindestelle, für die bis heute noch keine Liganden in der Literatur beschrieben wurden. Vor dem Hintergrund der Beobachtungen von Jiang *et al.*²⁰¹, die experimentell Interdomäneninteraktionen identifizierten, die kritisch für die Enzymfunktion sind, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser Proteinbereich eine potenzielle Bindestelle für neuartige Inhibitoren darstellen könnte. Diese Hypothese wird zusätzlich durch beschriebene, im Rahmen des katalytischen Mechanismus auftretende Interdomäneninteraktionen gestützt, die wichtig für einige biologische Funktionen von Hsp70 zu sein scheinen.

Aufgrund der Tatsache, dass bisher in der Literatur noch keine Liganden für diese Proteinregion beschrieben wurden, galt es zunächst, die Hypothese der Adressierbarkeit dieser Zielregion durch niedermolekulare Liganden zu verifizieren. Für die initiale Identifizierung möglicher Liganden des Interdomäneninterfaces wurde ein virtuelles Screeningverfahren unter Anwendung eines protein- sowie eines ligandbasierten Ansatzes durchgeführt. Ergänzend wurde eine fragmentbasierte Strategie verfolgt, wobei nach Molekülen mit einer bestimmten Substruktur als Ankergruppe gesucht wurde. Darüber hinaus wurde der Versuch unternommen, die vermeintliche Bindestelle des affinen Hsp70-Liganden Apoptozol mit Hilfe eines Cross-Dockingexperiments aufzuklären. Aufgrund der bis zum Zeitpunkt der Arbeit sehr limitierten Datenlage zu Proteinstrukturen von Hsp70-Zweidomänenkonstrukten bildeten detaillierte computergestützte Untersuchungen des Interdomäneninterfaces einschließlich molekulardynamischer Simulationen einen weiteren wesentlichen Bestandteil der Arbeit. Die Ergebnisse all dieser Untersuchungen werden im Folgenden im Detail beschrieben und diskutiert.

IV.3 Vorgehensweise, Ergebnisse und Diskussion

IV.3.1 Computergestützte Suche nach der Hsp70-Bindestelle von Apoptozol mittels Cross-Dockingverfahren

Der niedermolekulare Hsp70-Ligand Apoptozol (Az), dessen Bindung an die beiden Enzymisoformen Hsp70 und Hsc70 sowie die dabei resultierenden Bindungsaffinitäten bereits experimentell bestimmt werden konnten, besitzt eine Apoptose-induzierende Wirkung und zeigte in Untersuchungen an verschiedenen Krebszelllinien eine zytotoxische Aktivität (siehe Abschnitt IV.1.6).³¹⁴ Weiterhin wurde zum Zeitpunkt der Arbeit in der Fachliteratur diskutiert, ob es sich beim Az zudem um einen Hsp70-Inhibitor handelt und ob die beobachtete zytotoxische Wirkung des Moleküls auf eine Inhibition der Hsp70-Enzymfunktion zurückzuführen ist.³¹⁴

Obwohl bereits die Bindung von Az an Hsp70 und Hsc70 experimentell nachgewiesen werden konnte, war die adressierte Proteinbindestelle des Moleküls zum Zeitpunkt der Arbeit noch unbekannt. Informationen über die vermeintliche Bindestelle sowie über den Bindemodus des Liganden Az hätten hilfreiche Hinweise für das Liganden- bzw. Wirkstoffdesign am Target Hsp70 liefern und möglicherweise Rückschlüsse auf einen Inhibitionsmechanismus zulassen können. Darüber hinaus hätte die Aufklärung des molekularen Angriffspunktes eine alternative Zielregion für zukünftige Inhibitoren, zusätzlich zu der Substrat- und Nukleotidbindetasche, aufdecken können.

Aus diesen Gründen war die Identifizierung der adressierten Bindestelle des Az' einhergehend mit der Berechnung potenzieller Bindemodi mit Hilfe einer vergleichenden Cross-Dockingstudie ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Die Studie setzte sich aus einer Serie computergestützter Dockingsimulationen an verschiedenen in Frage kommenden Zielregionen, wie der Nukleotid- und Substratbindetasche und dem Interdomäneninterface, sowie aus Dockingverfahren an der gesamten Zweidomänenstruktur zusammen.

Durchführung der Dockingsimulationen

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Dockingsimulationen basierten weitestgehend auf einem Dockingprotokoll, das bereits für die Dockingberechnungen an der Zielstruktur Aldose Reduktase überprüft und genutzt wurde (siehe Abschnitt III.4.1) und an dieser Stelle daher verkürzt dargestellt wird. Eventuelle Abweichungen von dem beschriebenen Protokoll werden gegebenenfalls an entsprechender Stelle explizit angegeben.

Die Durchführung der Dockingsimulationen erfolgte mit dem Programm *AutoDock3.0*. Informationen hinsichtlich der jeweils verwendeten Proteinkristallstrukturen finden sich in den

einzelnen Passagen der entsprechenden Dockingverfahren. Die Aufbereitung der Proteinstrukturen sowie die Berechnung der benötigten Affinitätsgitter erfolgten analog zu der in Abschnitt III.4.1 dargestellten Vorgehensweise. Die Zentren der berechneten kubischen Affinitätsgitter mit den Kantenlängen $24 \text{ \AA} \times 24 \text{ \AA} \times 24 \text{ \AA}$ sowie einer Gitterweite von $0,375 \text{ \AA}$ wurden so gewählt, dass die Gitter die verschiedenen Bindetaschen vollständig umschlossen.

Die Erstellung der dreidimensionalen Molekülstruktur des Az' erfolgte mit dem Tool *Molecule Builder* des Softwarepakets *MOE*⁵⁴ (Version 2007.09). Die weitere Aufbereitung des Ligandenmoleküls für das Docking inklusive Minimierungsprozess erfolgte in Analogie zu der in Abschnitt III.4.1 beschriebenen Vorgehensweise innerhalb des Softwarepakets *SYBYL 8.0*.

Die gewählten Einstellungen der verschiedenen Parameter des Dockingprotokolls entsprachen vollständig den in Abschnitt III.4.1 beschriebenen Einstellungen. Bei jedem Dockingverfahren wurden für den Liganden Az 50 Dockinglösungen generiert. Die Gruppierung der berechneten Bindeposen erfolgte gemäß einer Toleranz von $1,0 \text{ \AA}$. Die Auswertung der Dockingergebnisse bestand in einer visuellen Inspektion aller generierten Dockinglösungen innerhalb der jeweiligen Bindetasche. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des Programms *PyMOL*⁴⁴ (Version 0.99), wobei die verschiedenen Dockinglösungen des Az' auf Plausibilität geprüft und zudem hinsichtlich der Wechselwirkungsprofile analysiert wurden.

Dockingverfahren an der Nukleotidbindetasche

Die Kristallstruktur 1YUW der bHsc70-Zweidomänenstruktur, die in dieser Cross-Dockingstudie als Rezeptor für das Dockingverfahren an dem Interdomäneninterface sowie an der Zweidomänenstruktur verwendet wurde, war für das Dockingverfahren zur Adressierung der ATP-Bindetasche ungeeignet. Dies lag an der Abwesenheit eines gebundenen Nukleotids, wodurch der Eingang zum hinteren Bereich der Nukleotidbindetasche, in dem in Strukturen von NBDs üblicherweise die Phosphatgruppen des Nukleotids lokalisiert sind, durch die eingenommene Seitenkettenkonformation des sogenannten „Gatekeepers“ Tyr15 verschlossen wurde. Darüber hinaus wich die Konformation des Arg272 im Vergleich zu Proteinstrukturen mit gebundenem Nukleotid ab, was zu einer strukturellen Änderung im vorderen Bindetaschenbereich führte, in dem nativ das Nukleosid gebunden wird. Aus diesem Grund wurde die Kristallstruktur 1KAX für das Dockingverfahren ausgewählt. Hierbei handelte es sich um die Struktur der NBD von bHsc70 mit gebundenem ATP, in der die Aminosäuren Tyr15 und Arg272 Konformationen einnahmen, die für Kristallstrukturen der NBD mit

gebundenem Nukleotid repräsentativ sind und eine Besetzung des hinteren Bereichs der ATP-Bindetasche erlaubten. Die Kristallstruktur 1KAX unterschied sich mit einem RMSD-Wert von lediglich ~ 1 Å von der NBD der Proteinstruktur 1YUW, weshalb die Strukturen als nahezu identisch angesehen werden konnten. Somit war eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Dockingsimulationen an der gesamten Zweidomänenstruktur absolut gegeben. Die gewählten Einstellungen der Dockingparameter entsprachen vollständig dem eingangs beschriebenen Dockingprotokoll.

Ergebnisse und Diskussion

Die mit einer berechneten freien Bindungsenthalpie von $\Delta G = -13,19$ kcal/mol auf Rang 1 geführte Dockinglösung (Übersicht über die Dockingergebnisse siehe Anhang VI.4.1) füllte den zur Verfügung stehenden Raum der Nukleotidbindetasche adäquat und vergleichbar mit dem nativ gebundenem Nukleotid diverser NBD-Kristallstrukturen aus (siehe Abb. 36). Der mit zwei Trifluormethylgruppen substituierte Phenylring adressierte den Bereich der hinteren Bindetasche, in dem in der ursprünglichen Kristallstruktur 1KAX die Phosphatreste des ATP lokalisiert sind. Allerdings waren keine Gemeinsamkeiten hinsichtlich der in den Komplexstrukturen von NBD und ATP ausgebildeten Wechselwirkungen erkennbar. In dem eingenommenen Bindemodus konnte lediglich eine direkte Wechselwirkung zwischen der NH-Gruppe des Az-Amids und Asp234 beobachtet werden. Auch die anderen Dockinglösungen zeigten keine vielversprechenderen Bindemodi mit günstigeren Wechselwirkungsprofilen und wiesen zudem mehrheitlich nur geringfügige oder keine räumlichen Überschneidungen mit dem Cofaktor ATP auf. Vor dem Hintergrund der in diesem Dockingverfahren generierten Bindepösen und unter Berücksichtigung des offensichtlichen konstitutionellen sowie physiko-chemischen Unterschieds zwischen Az und den nativen Nukleotidliganden gab es keine Hinweise dafür, dass es sich bei der Nukleotidbindetasche um die gesuchte Bindestelle des Az' handelte.

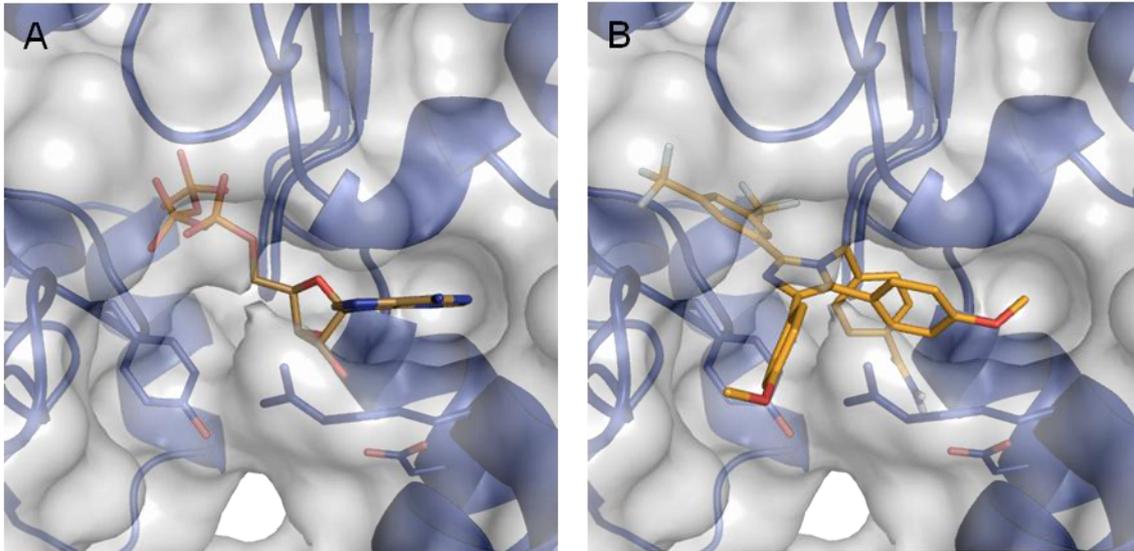


Abb. 36. Dockingverfahren an der Nukleotidbindetasche von bHsc70. **A)** Darstellung des experimentell aufgeklärten Bindemodus des Cofaktors ATP in der Kristallstruktur 1KAX. **B)** Darstellung des Bindemodus der Rang 1-Dockinglösung des Apoptozols.

Dockingverfahren an der Substratbindetasche

Für die Dockingsimulationen an der Substratbindetasche wurde die Kristallstruktur einer isolierten SBD als Rezeptor verwendet, da die SBD der Enzymstruktur 1YUW aufgrund der intramolekularen Bindung der teilweise entspiralisierten α -Helix B nicht für die Bindung eines Liganden zur Verfügung stand. Dabei handelte es sich um die Proteinstruktur 1DKZ, der Tertiärstruktur der SBD des Enzyms DnaK, die bereits für die Aufklärung der Kristallstruktur 1YUW als Templat fungierte.²⁰¹ Im Vorfeld der Dockingsimulationen wurde im Rahmen der Proteinaufbereitung das gebundene Substratpeptid aus der Kristallstruktur entfernt. Die weitere Durchführung des Dockingverfahrens folgte dem eingangs beschriebenen Dockingprotokoll.

Ergebnisse und Diskussion

Die visuelle Analyse der generierten Dockinglösungen ergab, dass für Az keine überzeugenden Bindeposen innerhalb der Substratbindetasche erzeugt wurden. Die Dockingresultate zeigten, dass der Ligand prinzipiell geeignet ist, den zur Verfügung stehenden Raum der Substratbindetasche umfassend auszufüllen. Allerdings wurden dabei jedoch nur einzelne bis keine direkten Wechselwirkungen, wie z.B. H-Brücken oder π - π -Kontakte, mit dem Protein ausgebildet. Weiterhin war deutlich zu erkennen, dass die Substratbindetasche aufgrund der Spezialisierung auf die Bindung gestreckter Peptidsegmente nicht ausreichend voluminös ist, um das Molekül Az vollständig aufzunehmen. Somit ragten bei den verschiedenen Dockinglösungen stets mehrere Reste des Liganden in

das Solvens ohne sich an intermolekulare Interaktionen mit dem Rezeptor zu beteiligen, was aus energetischer Sicht ungünstig erschien.

Bei der vom Dockingprogramm bestbewerteten Dockinglösung ($\Delta G = -10,49$ kcal/mol) ragte der Benzamidrest tief in die Kavität der Bindetasche, die von gebundenen Substratpeptiden üblicherweise durch einen hydrophoben Rest adressiert wird, wie z.B. durch die Seitenkette eines Leucins des in der Kristallstruktur ursprünglich gebundenen Peptidliganden, während die drei anderen substituierten Phenylringe des Az' auf beiden Seiten der Bindestelle in das Solvens ragten (siehe Abb. 37, Übersicht über die Dockingergebnisse siehe Anhang VI.4.2). Eine derartige Besetzung der hydrophoben Kavität durch eine hydrophile Molekülfunktion, von der zudem keine gerichteten Wechselwirkungen eingegangen wurden, erschien ebenfalls ungünstig. Weiterhin konnten in dem untersuchten Bindemodus auch von den weiteren funktionellen Gruppen des Liganden keine gerichteten Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren beobachtet werden. Die Beobachtung, dass in dem Dockingverfahren keine vielversprechenden Bindemodi resultierten, lässt sich plausibel anhand der chemischen Konstitution des Az' erklären, die über keine ersichtliche Analogie zu dem für die Substratbindetasche des Enzyms DnaK bereits aufgeklärten Bindungsmotiv verfügt. Dieses Bindungsmotiv umfasst einen Kern aus fünf Aminosäuren, vermehrt hydrophober Reste, die auf beiden Seiten durch ein Segment bevorzugt positiv geladener Reste flankiert werden.^{206,315} Folglich existierte eine offensichtliche Diskrepanz zwischen den von Az und dem Rezeptor ausgebildeten Wechselwirkungen und den Interaktionsmustern, die üblicherweise von nativen Substratpeptiden ausgebildet werden. Auf der Basis der analysierten Dockinglösungen und vor dem Hintergrund der aufgeführten Informationen hinsichtlich des nativen Bindungsmotivs sowie bekannter Interaktionsprofile, war nahezu vollständig auszuschließen, dass es sich bei der Substratbindetasche um die gesuchte Bindestelle des Az' handelte.

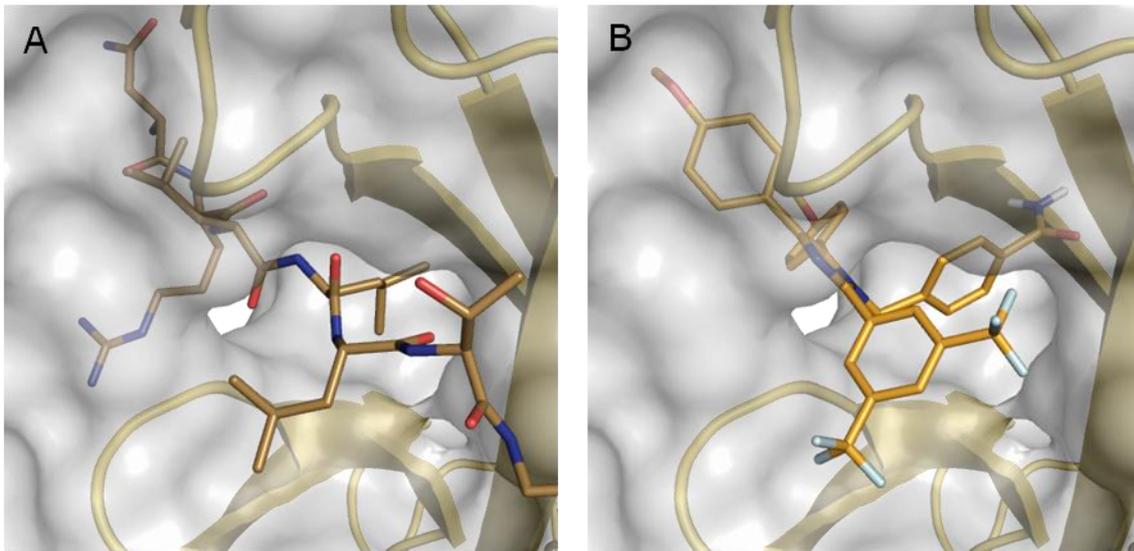


Abb. 37. Dockingverfahren an der Substratbindetasche von DnaK. **A)** Darstellung des experimentell aufgeklärten Bindemodus eines Substratpeptids der Kristallstruktur 1DKZ. **B)** Darstellung des Bindemodus der Rang 1-Dockinglösung des Apoptozols.

Dockingverfahren an dem Interdomäneninterface

Das Dockingverfahren für eine Adressierung des Interdomäneninterfaces erfolgte an der Kristallstruktur 1YUW. Der Fokus der Dockingsimulationen wurde auf den Bereich der unmittelbaren Interfacekavität gelegt (siehe Abschnitt IV.1.2). Die Aufbereitung der Proteinstruktur sowie das zugrundeliegende Dockingprotokoll folgten der am Anfang des Kapitels beschriebenen Durchführung.

Ergebnisse und Diskussion

Die visuelle Auswertung der Dockinglösungen ergab, dass hinsichtlich der Zielregion Interdomäneninterface im Gegensatz zu den vorangegangenen Dockingsimulationen sinnvolle und vielversprechende Bindeposen von *AutoDock3.0* generiert wurden. Insbesondere die Dockinglösungen des bestbewerteten Clusters, das zugleich die meisten Dockinglösungen vereinte, waren sehr interessant und überzeugend (siehe Abb. 38, Übersicht über die Dockingergebnisse siehe Anhang VI.4.3). Der Bindemodus der Rang 1-Dockinglösung mit einer günstigsten freien Bindungsenthalpie von $\Delta G = -12,23$ kcal/mol zeigte eine sehr gute strukturelle Anpassung des Liganden an die Bindestelle. Az adressierte das Zentrum der unmittelbaren Interfacekavität und besetzte den verfügbaren Raum der Bindetasche umfassend. Darüber hinaus ermöglichte der Bindemodus die Ausbildung von fünf Wasserstoffbrückenbindungen, von denen drei Bindungen von der sehr günstig positionierten Amidfunktion des Benzamidrests mit Asn174, Thr177 und Gln520 geformt

wurden, während die anderen beiden H-Brücken von einer der beiden Phenylmethoxygruppen und den Aminosäuren Lys524 und Tyr525 der SBD ausgebildet wurden.

Im Anschluss an die Dockingberechnungen wurden alle 50 Dockinglösungen einem Re-Scoringverfahren mit den Programmen *DrugScore^{CSD}* und *SFCscore* unterzogen. Während *DrugScore^{CSD}* für eine zusätzliche Bewertung der Güte der einzelnen Bindemodi und der Identifizierung der vermeintlich günstigsten Bindepose verwendet wurde, diente das Programm *SFCscore* unter Nutzung der Scoringfunktion SFC_290m einer zusätzlichen Abschätzung der Bindungsaffinitäten.

Der von *AutoDock3.0* auf Rang 1 geführte Bindemodus lag in der Bewertung von *DrugScore^{CSD}* auf Rang 13, wurde also von der Scoringfunktion ebenfalls als überdurchschnittlich günstig bewertet. Favorisiert wurde jedoch ein anderer interessanter Bindungsmodus ($\Delta G = -10,13$ kcal/mol), der von *AutoDock3.0* auf Rang 29 gelistet wurde. In dieser Bindepose adressierte der Ligand in vergleichbarer Weise wie im zuvor beschriebenen Bindemodus das Zentrum der Interfacekavität, jedoch in einer anderen Orientierung (siehe Abb. 38). Der Hauptunterschied bestand in einem Switch des Ditrifluormethylphenylrings und des Benzamidrests, von dem dabei zwei H-Brücken im vorderen Bereich des Interfaces mit den Aminosäuren Val169 und Leu170 der NBD ausgebildet wurden. Weiterhin entfielen bei dieser Bindepose die zwei von einer der beiden Methoxyphenylgruppen ausgebildeten H-Brücken, da der dafür verantwortliche Molekülrest die Position der anderen Methoxyphenylgruppe der zuvor beschriebenen Dockinglösung einnahm und die zweite Methoxyphenylgruppe anstatt zur SBD in Richtung Solvens gerichtet war. Diese von *DrugScore^{CSD}* bevorzugte Bindepose erschien besonders vor dem Hintergrund, dass das Az für die in der Publikation von Williams *et al.*³¹⁴ beschriebenen experimentellen Untersuchungen über ein Linkersegment an einer Matrix immobilisiert wurde, interessant. Das Linkersegment war dabei kovalent an die Amidgruppe des Liganden gebunden, wodurch dieser Ligandenrest in Richtung des Solvens und in Richtung der Matrix gerichtet sein musste. Aus diesem Grund repräsentierte diese Dockinglösung, im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Bindemodus, eine plausible Bindepose für das über ein Linkersegment immobilisierte Az. Allerdings erschien der vom Dockingprogramm vorgeschlagene bestbewertete Bindemodus für das freie, nicht an einer Matrix immobilisierte Az aufgrund der zahlreicheren direkten Wechselwirkungen und der überzeugenderen strukturellen Anpassung, einhergehend mit einer engen Bindung des Liganden, insgesamt die günstigere Bindepose darzustellen.

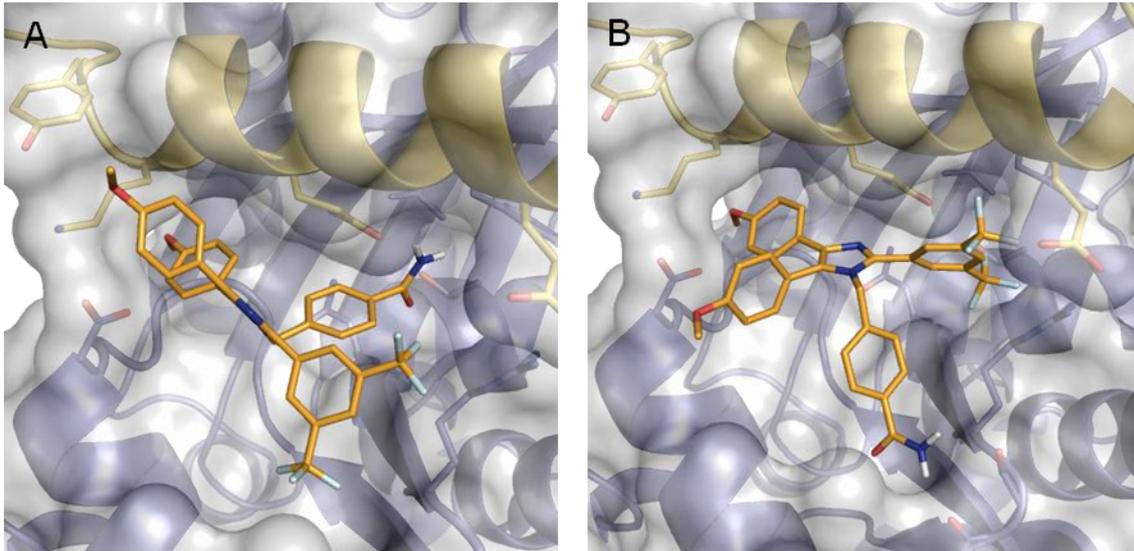


Abb. 38. Dockingverfahren an dem Interdomäneninterface von bHsc70. **A)** Darstellung des Bindemodus der von *AutoDock3.0* ermittelten Rang 1-Dockinglösung des Apoptozols. **B)** Darstellung des Bindemodus der von *DrugScore^{CSD}* favorisierten Rang 1-Dockinglösung des Apoptozols.

Der *SFCscore*-Berechnung nach zu urteilen, waren die beiden beschriebenen Dockinglösungen hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu der Interdomänenbindetasche mit pK_i -Werten von 7,17 (Rang 1 *AutoDock3.0*) und 7,10 (Rang 1 *DrugScore^{CSD}*) als gleichwertig einzuschätzen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass diese Werte sehr gut mit den experimentell bestimmten K_d -Werten von 0,14 μM bzw. 0,21 μM hinsichtlich der Komplexe Hsp70-Az und Hsc70-Az korrelierten und dadurch das Potenzial dieser vielversprechenden Dockinglösungen als plausible Bindungshypothesen bestätigten.³¹⁴

Die Ergebnisse der Dockingverfahren ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Interdomänenkavität von allen drei separat untersuchten Zielregionen die plausibelste Bindestelle des Liganden Az darstellte, da für diese Zielregion die sinnvollsten Bindemodi berechnet wurden und die Ergebnisse mit experimentell gewonnenen Daten korrelierten. Diese Beobachtungen stützten die Hypothese, dass die Interdomänenkavität eine mögliche Bindestelle für Inhibitoren darstellen könnte.

Dockingverfahren an der Zweidomänenstruktur

Im Rahmen des Dockingverfahrens an der gesamten bHsc70-Zweidomänenstruktur 1YUW erfolgten die Berechnungen im Gegensatz zu den vorangegangenen Dockingsimulationen ohne Beschränkung auf eine bestimmte Zielregion und ohne vorherige Definition einer speziellen Bindestelle in Analogie zu dem von Hetenyi *et al.* beschriebenen *Blind docking*-Ansatz.³¹⁶ Unter einem sogenannten *Blind docking* versteht man Dockingsimulationen, bei

denen keine spezielle Bindestelle vorab definiert wird und als Konsequenz die gesamte Rezeptorstruktur nach potenziellen Bindestellen untersucht wird. Alle vermeintlich vorhandenen Bindestellen treten während des Dockingprozesses in gegenseitige Konkurrenz zueinander und konkurrieren um die Bindung des Liganden. Dieser Dockingansatz dient primär der Aufklärung potenzieller Angriffspunkte für Liganden an einer biologischen Zielstruktur und findet vor allem Anwendung, wenn keine Informationen hinsichtlich der Bindestelle eines Liganden an einem gegebenen Rezeptor vorliegen, wie es in dieser Studie der Fall war. Hetenyi *et al.* demonstrierten, dass das Dockingprogramm *AutoDock* mit bestimmten Einstellungen neben der Berechnung von Bindepochen für eine bestimmte, vorab definierte Bindestelle ebenfalls für die Identifizierung potenzieller Bindestellen an einer Zielstruktur geeignet ist.^{316,317}

Die Intention der Dockingsimulationen am Zweidomänenkonstrukt bestand vorrangig in einer Untersuchung, welche der drei zuvor adressierten Bindestellen vom Az bevorzugt adressiert wird, wenn alle Bindestellen in gegenseitiger Konkurrenz zueinander stehen. Darüber hinaus wurde die Enzymstruktur hinsichtlich weiterer alternativer potenzieller Bindestellen analysiert.

Die Einstellungen der einzelnen Dockingparameter wurden in Anlehnung an die Publikation von Hetenyi *et al.*³¹⁶ wie folgt gewählt: Es wurden 100 Dockinglösungen generiert, wobei die Gruppierung der Bindepochen zu Clustern gemäß einer Toleranz von 1,0 Å erfolgte. Weiterhin wurde eine initiale Populationsgröße von 50 verwendet sowie die Höchstzahl an Energieevaluierungen auf maximal $50,0 \times 10^6$ begrenzt. Die maximale Anzahl an Generationen wurde auf $10,0 \times 10^6$ heraufgesetzt. Um mit den Affinitätsgittern die gesamte Proteinstruktur erfassen zu können, wurde der Abstand zwischen den Gitterpunkten von 0,375 Å auf 0,550 Å vergrößert.

Ergebnisse und Diskussion

Die Dockinglösungen zeigten eindrucksvoll, dass es mit den gewählten Einstellungen möglich war, innerhalb eines derart großen Suchraumes, eine Zielstruktur effizient nach geeigneten Bindestellen abzusuchen und dabei plausible Bindepochen zu generieren. Darüber hinaus wurden die bisherigen Beobachtungen bestätigt, wonach der Ligand Az bevorzugt an die Interdomänenregion zu binden schien (siehe Tab. 12).

Im Rahmen des Dockingprozesses gelang es *AutoDock3.0* Dockinglösungen des vorangegangenen explizit die Interfacekavität adressierenden Dockingverfahrens mehrfach zu reproduzieren ohne dabei jedoch den Bindemodus der Rang 1 Dockinglösung zu finden. Wie die Auswertung der generierten Dockinglösungen zeigte, waren 5 der 6 bestbewerteten Bindepochen innerhalb der Interdomänenregion lokalisiert. Während sich die Bindepochen auf

den Rängen 1, 2 und 6 zentral innerhalb der unmittelbaren Interdomänenkavität befanden, adressierten die Dockinglösungen 4 und 5 einen Interdomänenbereich, der am linken Randbereich des Interfaces außerhalb der Kavität direkt neben dem durch Asp152 und Lys524 gebildeten Bogen lokalisiert war. Für die anderen 94 erzeugten Bindeposen wurden durchweg ungünstigere Wechselwirkungsenergien berechnet, weshalb sich an dieser Stelle auf die Betrachtung der sechs bestbewerteten Dockinglösungen fokussiert wird.

Bei dem auf Rang 1 geführten Bindemodus ($\Delta G = -9,30$ kcal/mol) füllte Az den zur Verfügung stehenden Raum der Interdomänenkavität sehr gut aus, wobei zwei H-Brücken zwischen der Amidgruppe und Gln156 sowie einer der beiden Methoxygruppen und Gln376 ausgebildet wurden (siehe Abb. 39, Übersicht über die Dockingergebnisse siehe Anhang VI.4.4). Die Dockinglösung ähnelte der vom Scoringprogramm *DrugScore^{CSD}* favorisierten Bindepose des vorangegangenen Dockingverfahrens am Interdomäneninterface, jedoch mit dem Unterschied, dass das Y-förmige Grundgerüst des Az', bestehend aus dem Imidazol und den drei substituierten Phenylringen, in einer entgegengesetzten Orientierung band und dadurch nicht nur eine potenzielle Bindepose des Liganden Az, sondern ebenfalls einen möglichen Bindemodus des Az-Moleküls mit Linkersegment repräsentierte.

Im Gegensatz zu den im Zentrum der Interdomänenkavität lokalisierten Dockinglösungen erschien eine Bindung des Az' an einer derart exponierten Stelle, wie in den Dockinglösungen der Ränge 4 und 5, fragwürdig und vergleichsweise ungünstig, da sich Bindestellen niedermolekularer Liganden sehr häufig in vergrabenen, vor dem Solvens geschützten Proteinbereichen befinden. Der Bindemodus der Rang 4- ($\Delta G = -8,04$ kcal/mol) ebenso wie der Rang 5-Dockinglösung ($\Delta G = -7,89$ kcal/mol) zeigte eine gute morphologische Strukturkomplementarität zu dem adressierten Proteinbereich (siehe Abb. 39). Jedoch konnten jeweils bis auf eine einzige H-Brücke zwischen der Amidgruppe des Az' und Thr222 keine weiteren gerichteten Wechselwirkungen beobachtet werden.

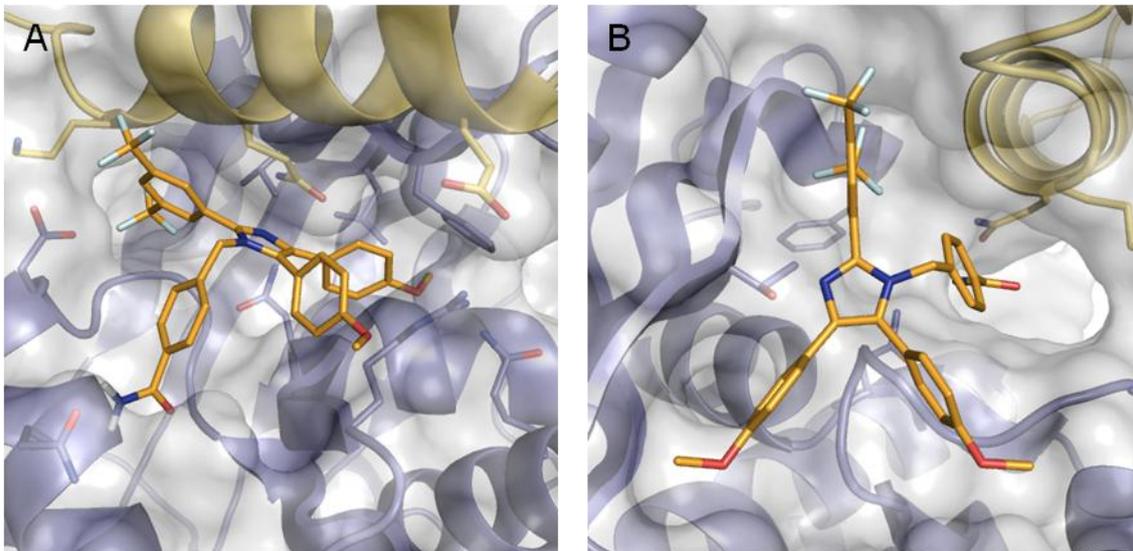


Abb. 39. Dockingverfahren an der Zweidomänenstruktur von bHsc70. **A)** Darstellung des Bindemodus der Rang 1-Dockinglösung des Apoptozols. **B)** Darstellung des Bindemodus der auf Rang 4 geführten Dockinglösung des Apoptozols.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass die auf Rang 3 geführte Dockinglösung anstelle des Interdomänenbereichs die NBD adressierte und den Eingang zu der Nukleotidbindetasche unter Ausbildung zweier H-Brücken zwischen der Az-Amidgruppe und Thr14 sowie zwischen einer der beiden Methoxygruppen und Asn364 blockierte. Eine Adressierung des hinteren Bindetaschenbereichs, wie in der Rang 1-Bindepose des Dockingverfahrens an der Nukleotidbindetasche, konnte hingegen, bedingt durch die Seitenkettenkonformation des Tyr15, die diesen Raum verschließt, nicht erfolgen. Ebenfalls war eine Adressierung der Substratbindetasche aufgrund der intramolekularen Bindung des α -Helix B-Segments in diesem Dockingverfahren nicht möglich.

In Bezug auf die Identifizierung potenzieller, alternativer Bindestellen des Liganden Az sowie für zukünftige Liganden bleibt festzuhalten, dass sich bei der Analyse aller erzeugten Dockinglösungen keine weiteren sinnvollen Bindestellen am Enzym bHsc70 herauskristallisierten. Die Mehrzahl der Dockinglösungen war innerhalb des Interdomäneninterfaces sowie zwischen den beiden NBD Subdomänen unterhalb der Nukleotidbindetasche lokalisiert. Darüber hinaus befand sich ein Cluster von 10 Dockinglösungen auf der Rückseite der Interfacekavität direkt unterhalb der Substratbindetasche in einer langgestreckten Furche. Die Ausbildung dieser Bindestelle war auf die intramolekulare Bindung der α -Helix B durch die Substratbindetasche zurückzuführen, weshalb die Furche im nativen Protein vermutlich nicht existiert und daher keine Relevanz als sinnvolle alternative Bindestelle besaß. Schließlich waren darüber hinaus viele Cluster mit wenigen

Mitgliedern an unspezifischen Stellen auf der gesamten Proteinoberfläche verteilt. Einen Überblick über die Häufigkeit der durch die Dockinglösungen adressierten drei potenziellen Bindestellen NBD, SBD und Interdomäneninterface liefert Tabelle 12.

Bindestelle	Dockinglösungen	Clusteranzahl	ΔG [kcal/mol]
Nukleotidbindetasche	6	6	-8,23
Substratbindetasche	-	-	-
Interdomäneninterface	12	12	-9,30
Interdomänenkavität	7	7	-9,30

Tab. 12. Übersicht über die Anzahl der jeweiligen Adressierungen der Hsp70-Bindestellen Nukleotidbindetasche, Substratbindetasche und Interdomäneninterface, insbesondere der unmittelbaren Interdomänenkavität, und der für jede Bindestelle jeweils günstigsten berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG). Die Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Dockinglösungscluster dient der Unterscheidung zwischen verschiedenen und gleichartigen Dockinglösungen an den jeweiligen Bindestellen. Bei den Dockinglösungen handelte es sich jeweils um verschiedene Dockinglösungen, die alle ein eigenständiges Cluster repräsentierten.

Dockingverfahren an einer erweiterten Zweidomänenstruktur

Abschließend wurde das Dockingexperiment noch um ein Dockingverfahren an der mittels Homologiemodellen erweiterten bHsc70-Enzymstruktur HM-Hsc70 (siehe Abschnitt IV.3.3) ergänzt, da aufgrund der intramolekularen Bindung eines Segments der teilweise entspiralisierten α -Helix B durch die Substratbindetasche in der Proteinstruktur 1YUW diese Bindetasche in der vorangegangenen Dockingsimulation nicht für eine Bindung des Liganden Az zur Verfügung stand und folglich auch keine tatsächliche Alternative gegenüber den anderen vorhandenen Bindestellen darstellte. Die Dockingberechnungen erfolgten unter Verwendung des Dockingprotokolls des vorangegangenen Dockingverfahrens.

Ergebnisse und Diskussion

Die in diesem Verfahren generierten Dockinglösungen bestätigten die beobachteten Tendenzen der vorherigen Dockingsimulation an der Zweidomänenstruktur hinsichtlich einer bevorzugten Adressierung der Interfaceregion durch das Az und lieferten darüber hinaus Hinweise hinsichtlich der Präferenz einer Adressierung der Substratbindetasche durch den Liganden Az beim Vorhandensein alternativer Bindestellen (siehe Tab. 13, Übersicht über die Dockingergebnisse siehe Anhang VI.4.5).

Vorweg sei erwähnt, dass keine die Substratbindetasche adressierenden Bindeposen ein überzeugendes Interaktionsprofil aufwies und in der Mehrzahl der Dockinglösungen der Ligand einen Bindemodus einnahm, in dem der Ditrifluormethylphenylrest unspezifisch

lediglich den vorderen Bereich der Substratbindetasche besetzte. Dabei wurde von keiner Dockinglösung mehr als eine H-Brücke ausgebildet, während die übrigen Reste keine Interaktionen mit dem Protein eingingen und in das Solvens ragten (siehe Abb. 40).

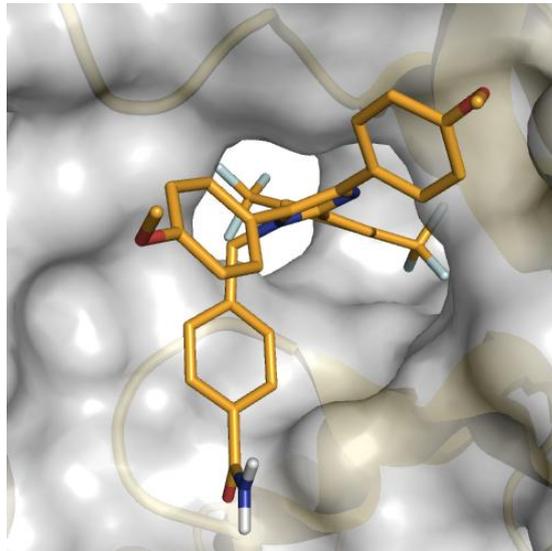


Abb. 40. Dockingverfahren an der erweiterten Zweidomänenstruktur HM-Hsc70. Darstellung eines repräsentativen Bindemodus des Apoptozols (Rang 4, $\Delta G = -8,66$ kcal/mol) innerhalb der Substratbindetasche.

Die den Interdomänenbereich adressierenden Dockinglösungen waren mehrheitlich im linken Randbereich des Interdomäneninterfaces lokalisiert und zeigten vergleichbare Bindeposen, wie die entsprechenden Dockinglösungen, beispielsweise die Rang 4-Dockinglösung, des vorherigen Dockingverfahrens. Vielversprechendere und energetisch günstigere Bindeposen im Vergleich zu dem vorherigen Dockingverfahren wurden für den Proteinbereich der unmittelbaren Interfacekavität hingegen nicht generiert. Hinsichtlich der Detektion alternativer Bindestellen lieferte die durchgeführte Dockingsimulation an der erweiterten Zweidomänenstruktur auch keine neuen Erkenntnisse.

Bindestelle	Dockinglösungen	Clusteranzahl	ΔG [kcal/mol]
Nukleotidbindetasche	6	6	-10,49
Substratbindetasche	4	4	-8,66
Interdomäneninterface	8	6	-7,64
Interdomänenkavität	4	2	-6,38

Tab. 13. Übersicht über die Anzahl der jeweiligen Adressierungen der Hsp70-Bindestellen Nukleotidbindetasche, Substratbindetasche und Interdomäneninterface, insbesondere der unmittelbaren Interdomänenkavität, und der für jede Bindestelle jeweils günstigsten berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG). Die Darstellung der Anzahl der unterschiedlichen Dockinglösungscluster dient der Unterscheidung zwischen verschiedenen und gleichartigen Dockinglösungen an den jeweiligen Bindestellen. Bei den Dockinglösungen handelte es sich bis auf drei Dockinglösungen des Interdomäneninterfaces bzw. der Interdomänenkavität um jeweils verschiedene Bindeposen, die unterschiedliche Cluster repräsentierten.

Zusammenfassung

Mit Hilfe des durchgeführten Cross-Dockingexperiments konnten vielversprechende Hinweise hinsichtlich der vermeintlichen Hsp70-Bindestelle des Liganden Az sowie Informationen über mögliche Bindeposen gewonnen werden. Darüber hinaus erfolgte in diesem Rahmen eine erste Untersuchung des Enzyms auf Bereiche, die neben den beiden offensichtlichen Hsp70-Zielregionen, der Substrat- und der Nukleotidbindetasche, als zusätzliche potenzielle Bindestellen in Frage kommen könnten.

Die Resultate der durchgeführten Dockingsimulationen wiesen eindeutig und konsistent auf eine bevorzugte Bindung des Liganden Az an die Interdomänenregion, insbesondere an die Interdomänenkavität hin. Der Tatsache, dass in dieser Dockingstudie die insgesamt bestbewertete Dockinglösung für die Nukleotidbindetasche berechnet wurde, wurde bei der abschließenden Bewertung der Ergebnisse lediglich eine untergeordnete Bedeutung beigemessen, da diese Dockinglösung, wie auch alle anderen Dockinglösungen an dieser Bindestelle, keine Übereinstimmungen mit den Interaktionsprofilen zwischen der Nukleotidbindetasche und den nativen Liganden zeigten und darüber hinaus auch jeweils nur eine einzige gerichtete Wechselwirkung mit dem Protein ausbildeten. In diesem Zusammenhang wurde auch die Tatsache berücksichtigt, dass zwischen Az und den nativen Nukleotidliganden keine offensichtlichen strukturellen Parallelen existierten und zudem physikochemische Unterschiede bestanden. Deshalb wurde die Wahrscheinlichkeit einer Bindung des Liganden an die Nukleotidbindetasche geringer als die Wahrscheinlichkeit einer Bindung an das Interdomäneninterface eingeschätzt.

Im Gegensatz zu den für die Nukleotidbindetasche berechneten Dockinglösungen wurden für das Interdomäneninterface die insgesamt gesehen plausibelsten Bindeposen mit den

überzeugendsten Interaktionsprofilen und sehr günstigen Bindungsaffinitäten, die zudem mit den zum Zeitpunkt der Arbeit publizierten experimentellen Beobachtungen vereinbar waren, berechnet. Abschließend sei angemerkt, dass die Ergebnisse der Studie die Hypothese stützten, dass die Hsp70-Interdomänenregion und insbesondere die in der Kristallstruktur 1YUW ausgebildete Interfacekavität, potenzielle Bindestellen für zukünftige niedermolekulare Liganden darstellen könnten.

Bindestelle	ΔG [kcal/mol]
Nukleotidbindetasche	-13,19
Substratbindetasche	-10,49
Interdomäneninterface	-12,23
Zweidomänenstruktur	-9,30
HM-Zweidomänenstruktur	-10,49

Tab. 14. Übersicht über die für jede Bindestelle jeweils günstigsten berechneten freien Bindungsenthalpien (ΔG).

Nach Abschluss des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Cho *et al.* im November 2011 eine Studie mit zum damaligen Zeitpunkt neuen Hinweisen hinsichtlich der Hsp70-Bindestelle von Az.³¹⁸ Darin beschreiben die Autoren experimentelle Untersuchungen, deren Ergebnisse auf eine Bindung von Az an die NBD hindeuten. Weiterhin suggerierten die Ergebnisse eines biochemischen Assays in Kombination mit den Informationen von Dockingsimulationen eine mögliche Bindung von Az an die Nukleotidbindetasche.

Vor dem Hintergrund dieser Informationen erschien eine Bindung des Liganden an die NBD als wahrscheinlich, was jedoch die Möglichkeit einer zusätzlichen Adressierung des Interdomäneninterfaces nicht ausschließt. Diese Hypothese wurde bei den Untersuchungen von Cho *et al.* nicht berücksichtigt. Auch die in Betracht gezogene Adressierung der Nukleotidbindetasche von Az konnte nicht eindeutig durch die Experimente nachgewiesen werden, weshalb auch die Schlussfolgerungen der Autoren diesbezüglich eher vage formuliert wurden. An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass sich die Dockingsimulationen offensichtlich ausschließlich auf die Nukleotidbindetasche begrenzten, wodurch die Identifizierung weiterer möglicher Az-Bindestellen an der NBD ausgeschlossen war. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte konnte man zum damaligen Zeitpunkt nicht davon ausgehen, dass diese Ergebnisse denen der vorliegenden Arbeit entgegen stehen.

Im Gegensatz hierzu wiesen die Resultate der im Paper beschriebenen Experimente klar auf keine Bindung von Az an die SBD hin, wodurch das entsprechende Ergebnis der Dockingstudie der vorliegenden Arbeit gestützt wurde.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass auch durch die von Cho *et al.* durchgeführten Untersuchungen die tatsächliche Hsp70-Bindestelle von Az nicht identifiziert werden konnte und die Aufklärung der Hsp70-Bindestelle von Az, z.B. durch Strukturaufklärung eines Hsp70-Az-Komplexes, als Ziel zukünftiger Arbeiten verbleibt.

IV.3.2 Liganden des Interdomäneninterfaces - Design neuartiger Hsp70-Inhibitoren

IV.3.2.1 Identifizierung von Kandidatenmolekülen durch virtuelles Screening

Die gewählte Strategie zur initialen Identifizierung potenzieller Liganden des Interdomäneninterfaces durch virtuelles Screening entsprach im Wesentlichen der in Abschnitt III.4.2 beschriebenen Vorgehensweise. Die virtuellen Datenbanksuchen basierten erneut auf einem protein- sowie einem ligandbasierten Ansatz, wobei einerseits eine Zweidomänenkristallstruktur des bovinen Hsc70 und andererseits der bekannte Hsp70-Ligand Apoptozol als Templatstrukturen dienten. Die weitere Bewertung der identifizierten Verbindungen hinsichtlich möglicher Bindemodi sowie Bindungsaffinitäten erfolgte mittels Dockingsimulationen in Verbindung mit der Anwendung zusätzlicher Scoringverfahren. Abschließend wurden ausgewählte Kandidatenmoleküle mit Hilfe von *in vitro* Assays auf ihre biologische Aktivität gegenüber Multiplen Myelomzelllinien untersucht.

IV.3.2.1.1 Proteinbasierter Ansatz

Computergestützte Untersuchungen des Interdomäneninterfaces

Bei dem proteinbasierten Ansatz diente die röntgenkristallographisch aufgeklärte Enzymstruktur 1YUW, die Proteinstruktur des bovinen Hsc70-Zweidomänenkonstrukts, als Templatstruktur. Diese Struktur kann, wie die Sequenzanalyse in Abschnitt IV.1.2 deutlich demonstrierte, aufgrund der nahezu vollständigen Sequenzidentität im Vergleich mit humanem Hsc70 als ein sinnvoller Ersatz für die bisher noch nicht experimentell aufgeklärte Tertiärstruktur der humanen Isoform angesehen werden.

Untersuchung von Hsp70 hinsichtlich potenzieller Ligandbindestellen

Für eine weitere computergestützte Bestätigung der Hypothese, dass die ausgebildete Kavität des Interdomäneninterfaces tatsächlich eine geeignete Bindestelle für zukünftige Liganden repräsentiert, wurde die Enzymstruktur 1YUW mit Hilfe des in dem Softwarepaket *MOE* (Version 2009.10) implementierten Tools *Site Finder* auf mögliche Bindestellen analysiert.

Die Berechnungen beruhen auf einer geometrischen Methode basierend auf sogenannten *Alpha Shapes*. Der Algorithmus ermittelt dabei die Anzahl der Kontaktatome des Rezeptors innerhalb der jeweiligen potenziellen Bindetaschen, wobei eine Unterteilung in hydrophobe bzw. hydrophile Atome sowie in Proteinrückgrat- oder Seitenkettenatome erfolgt. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form kolorierter, in den Bindestellen verteilter Sphären.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer von Chen *et al.*³¹⁹ entwickelten sequenzbasierten Methode zur Vorhersage möglicher Bindestellen von Proteinen bewertete auch *Site Finder* die Interfacekavität von Hsp70 als eine mögliche Bindetasche. Der identifizierte Bereich umfasste insgesamt 136 Kontaktatome, darunter lediglich 35 Atome hydrophober Natur, was auf einen ausgeprägt hydrophilen Charakter mit einer Vielzahl an polaren Aminosäuren schließen lässt. Der entsprechende Bereich repräsentierte die viertgrößte aller detektierten Bindestellen hinter zwei Bindestellen innerhalb der NBD, unter anderem der ATP-Bindestelle, sowie einem Bereich der Interdomänenschnittstelle auf der Rückseite der Kavität. Die letztgenannte Region erstreckt sich vor allem über die SBD, wobei es sich jedoch eher um eine relativ solvensexponierte Furche, als um eine ausreichend vergrabene Bindestelle handelt.

Analyse der Interfacekavität hinsichtlich begünstigter Interaktionspunkte

Im Anschluss an die Überprüfung der Hsp70-Proteinstruktur auf potenzielle Bindestellen erfolgte eine erste und zum Zeitpunkt der Arbeit einzige computergestützte Untersuchung der Zielregion, der Interdomänenkavität, hinsichtlich physiko-chemischer Eigenschaften durch die Berechnung privilegierter Interaktionspunkte bestimmter Atomtypen und funktioneller Gruppen mit Hilfe der beiden Programme *DrugScore^{CSD}* und *GRID*.

Durch Anwendung der entsprechenden *HotSpots*-Funktion von *DrugScore^{CSD}* wurden analog zu der in Abschnitt III.4.2.1.2 beschriebenen Durchführung molekulare Wechselwirkungsfelder für 18 verschiedene Sonden berechnet. Der analysierte Bereich der Bindetasche wurde als ein quaderförmiges Gitter definiert, das alle Aminosäuren innerhalb eines Radius von 15 Å um das zentral lokalisierte Gln520 herum umfasste. Die Gitterweite betrug 0,375 Å. Für eine intuitive Handhabung wurden die berechneten Wechselwirkungswerte auf Werte

zwischen 0 bis 1 normalisiert, wobei 1 dem globalen Optimum entsprach. Im Fokus der visuellen Analyse standen primär die Wechselwirkungsfelder der folgenden vier Sonden: C.ar diente als aromatische, C.3 als hydrophobes Sondenatom, während O.2 einen typischen H-Brückenakzeptor und N.3 einen potenziellen H-Brückendonor repräsentierten.

Die ergänzende Bindetaschenanalyse mit dem Programm *GRID*^{45,46} (Version 22a) basierte ebenfalls auf einem quaderförmigen Gitter mit festgelegten Abständen von 0,2 Å zwischen den einzelnen Gitterpunkten, dessen Zentrum ebenfalls Gln520 darstellte und dessen Kanten 15 Å vom Zentrum entfernt waren. Als Sonden dienten ein Wassermolekül, eine hydrophobe Sonde, ein sp² Carbonylsauerstoffatom, eine sp³ Aminogruppe (NH₂), ein neutrales, flaches NH₂ (z.B. ein Amid), eine aromatische oder vinyloge sp² Alkylgruppe (CH) sowie eine Methylgruppe.

Die Visualisierung der berechneten *hot spots* erfolgte mit dem Programm *PyMOL*, wobei die jeweiligen Ergebnisse und die darauf basierenden Konturen bei unterschiedlichen Interaktionswerten bzw. –energien (Konturleveln, K.I.) inspiziert wurden. Weiterhin wurde die Visualisierung der von *GRID* berechneten Wechselwirkungsfelder in *MOE* durch ein von der CCG⁵⁵ in Person von Dr. Guido Kirsten bereitgestelltes SVL-Skript ermöglicht, wodurch die generierten *hot spots* direkt für die Konstruktion von Pharmakophormodellen genutzt werden konnten.

Die im Rahmen der vorgenommenen Bindetaschenanalyse von beiden Programmen identifizierten *hot spots* zeigten insgesamt für vergleichbare Sonden deutliche Übereinstimmungen, was sowohl die Aussagekraft der gesammelten Informationen erhöhte als auch auf eindeutig lokalisierte potenzielle Interaktionsstellen hindeutete. Bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse standen besonders die für die Erstellung der Pharmakophormodelle relevanten Interaktionsfelder im Fokus. Die berechneten *hot spots* deuteten generell auf einen ausgeprägt hydrophilen Charakter der Zielregion hin, was aufgrund der solvensexponierten Lokalisierung des entsprechenden Proteinbereichs und der relativ offenen Bindetaschenform plausibel und nachvollziehbar war (siehe Abb. 41). Aufgrund der zahlreich vorhandenen hydrophilen Aminosäuren existierte prinzipiell für zukünftige Liganden eine Vielzahl an potenziellen Interaktionspartnern für die Ausbildung gerichteter Wechselwirkungen.

Für H-Brückenakzeptoren wurden fünf Wechselwirkungsbereiche detektiert: Innerhalb der die Bindetasche seitlich begrenzenden Bögen der linken (a) und rechten (b) Kavitätsseite sowie an drei zentral lokalisierten Stellen, wobei ein besonders prägnanter Bereich zwischen Gln520 und der durch die drei Aminosäuren Leu210, Phe217 und Val219 geformten hinteren Subtasche resultierte (c), der prinzipiell für die Ausbildung von mehreren H-Brücken mit

Thr177, Gln520 sowie mit der Haupt- und Seitenkette von Asn174 geeignet war. Ein *hot spot* befindet sich im Zentrum zwischen den vier Aminosäuren Arg155, Asn174, Gln520 und Glu523, der entsprechende Wechselwirkungen mit den Seitenketten der jeweiligen Aminosäuren erlaubt (d). Ein weiteres Interaktionsfeld ist zentral zwischen Phe217, Glu516 und Gln520 (e) lokalisiert.

Bevorzugte Positionen für H-Brückendonoren sind ebenfalls an den beiden seitlichen Randbereichen der Bindetasche sowie punktuell im Zentrum der Kavität lokalisiert. Von diesen Interaktionspunkten sei vor allem der ausgedehnte Bereich auf der linken Seite des Interfaces (f) zu erwähnen, wo bei einer Adressierung durch entsprechende Ligandenreste Ala148, Phe150, Arg155 und Glu523 als Interaktionspartner bereitstehen.

Darüber hinaus detektierten beide Programme auch ein paar vereinzelte, scharf umgrenzte hydrophobe Regionen, wobei die Positionen der hydrophoben und aromatischen Wechselwirkungsfelder deutliche Überschneidungen zeigten und als nahezu identisch angesehen werden können. Aufgrund der Tatsache, dass für die jeweiligen hydrophoben Sondentypen (Methylgruppe, C.3) im Vergleich zu den aromatischen *hot spots* durchgängig ungünstigere Interaktionswerte bzw. -energien berechnet wurden, blieben diese bei der nachfolgenden Pharmakophormodellentwicklung unberücksichtigt. Innerhalb des Interdomäneninterfaces konnten vor allem drei prägnante aromatische Areale lokalisiert werden: Ein *hot spot* befindet sich auf der linken Seite der Bindetasche innerhalb des Bogens, der durch die ladungsgestützte H-Brücke zwischen Asp152 und Lys524 sowie durch Glu523 und Arg155 geformt wird (g). Eine weitere Position liegt im Zentrum des Interfaces zwischen Gln520 und Ile173 (h) und ein vergleichsweise tief vergrabenes Feld ist im Bereich der von Leu210, Phe217 und Val219 geformten Subtasche (i) zu finden.

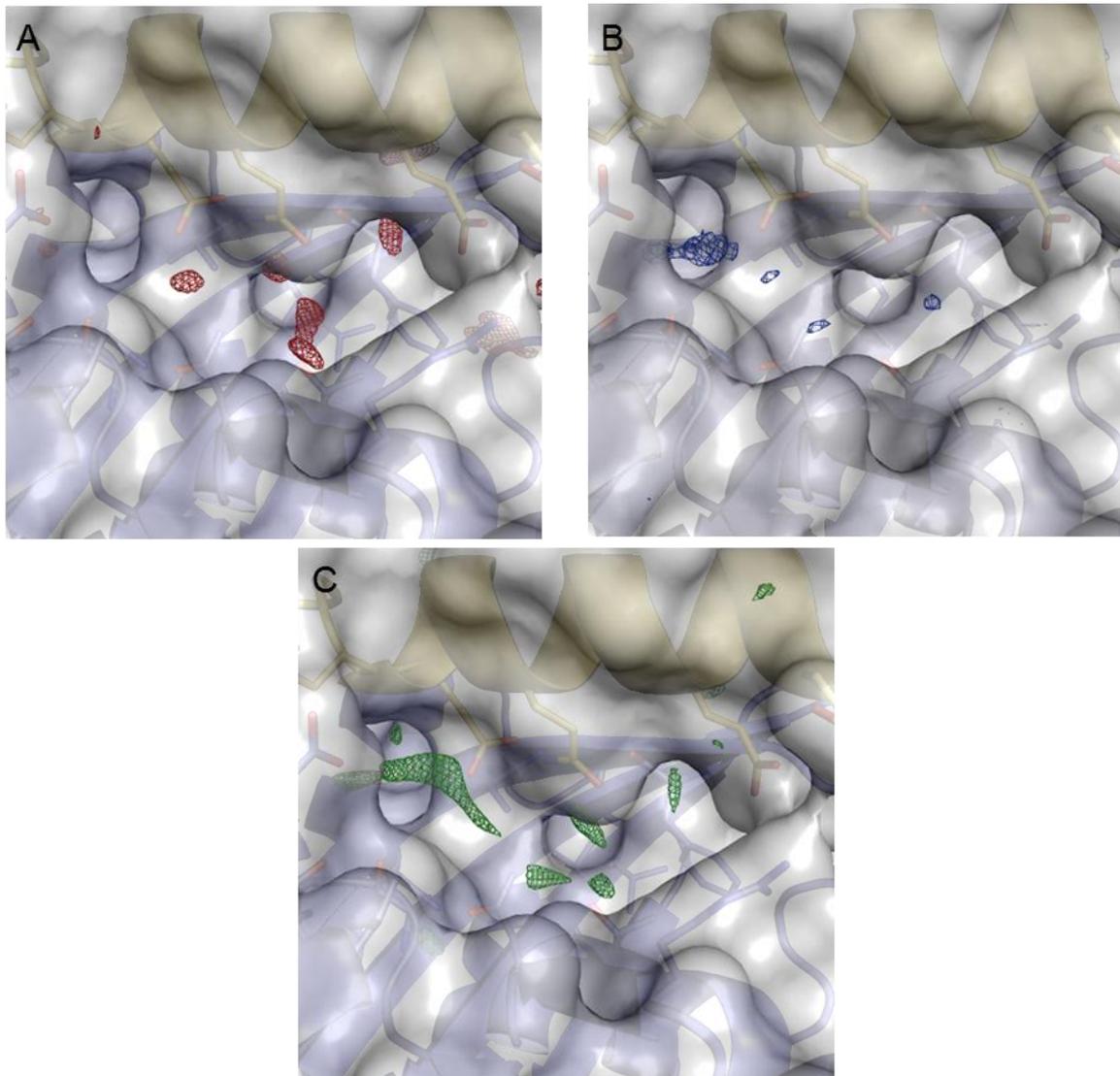


Abb. 41. Darstellung relevanter Interaktionsbereiche innerhalb der unmittelbaren Interdomänenkavität der bHsc70 Kristallstruktur 1YUW. Darstellung der mittels *GRID* (**A** und **C**) und *DrugScore^{CSD}* (**B**) berechneten Interaktionspunkte für verschiedene Sondenatome. **A**) Sondenatom O.2 als H-Brückenakzeptor (K.I. -7,48; rot). **B**) Sondenatom N.3 als H-Brückendonor (K.I. 0,52; blau). **C**) Sondenatom C.1= für aromatische Systeme (K.I. -3,70; grün).

Die im Rahmen der Bindetaschenanalyse identifizierten potenziellen Wechselwirkungsfelder bildeten die Grundlage für den nächsten Schritt des virtuellen Screenings, der Entwicklung geeigneter Pharmakophormodellhypothesen für nachfolgende virtuelle Datenbanksuchen.

Entwicklung von Pharmakophormodellen und virtuelle Datenbanksuche

Die Suche nach ersten Hsp70-Liganden, die die Interfacekavität adressieren, erfolgte im Rahmen des proteinbasierten virtuellen Screeningansatzes anhand von Pharmakophormodellen, die auf der Grundlage der gesammelten Informationen über prädestinierte

Interaktionsstellen (*hot spots*) der vorangegangenen Bindetaschenanalyse abgeleitet wurden.

Entwicklung von Pharmakophormodellen

Die Konstruktion der dreidimensionalen Pharmakophormodelle erfolgte mit Hilfe des *Pharmacophore Query Editors* des Programmpakets *MOE* (Version 2009.10) anhand der Enzymkristallstruktur 1YUW unter Berücksichtigung der zuvor berechneten *hot spots*. Während der Entwicklung eines Pharmakophormodells wurde stets versucht möglichst viele prägnante Wechselwirkungsfelder zu adressieren, weshalb die resultierenden Pharmakophormodelle im Zentrum der Interdomänenbindetasche lokalisiert waren. Weiterhin wurde bei der Formulierung der Pharmakophorhypothesen darauf geachtet, dass die gesuchten, die Pharmakophormodelle erfüllenden Moleküle über eine gewisse Größe verfügen, damit die auf diese Weise identifizierten Verbindungen möglichst selektiv und mit hoher Affinität an die intramolekulare Domänenschnittstelle des Enzyms binden.

Nach mehreren iterativen Optimierungszyklen, bestehend aus Pharmakophormodellkonstruktion mit anschließendem virtuellen Screening kleiner Testmoleküldatenbanken, visueller Betrachtung der identifizierten Moleküle (*hits*) und nachfolgender Modifizierung der Pharmakophormodelle entstand schließlich das finale, für die Datenbanksuche als Suchanfrage verwendete und in Abbildung 42 dargestellte Pharmakophormodell.

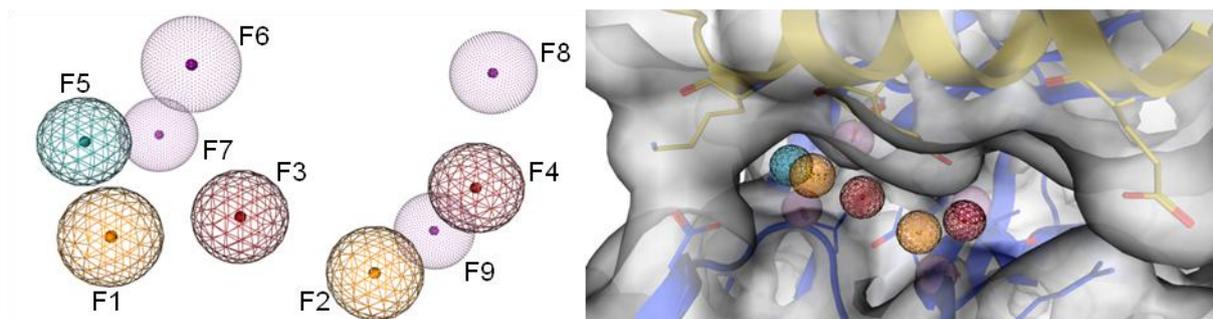


Abb. 42. Darstellung des finalen Pharmakophormodells und dessen Positionierung innerhalb der Interdomänenkavität von bHsc70 (PDB-Code 1YUW).

Das Pharmakophormodell setzt sich aus insgesamt zwölf Definitionen zusammen, untergliedert in neun Pharmakophorfeatures, die sich wiederum in fünf reguläre und vier *projected features* unterteilen lassen, zwei Bedingungen (*constraints*) sowie einem unzugänglichen Raum um die Aminosäuren der Interfacekavität, bestehend aus *excluded volumes* (siehe Tab. 15). Die Platzierungen der einzelnen Pseudozentren der

Pharmakophorfeatures im dreidimensionalen Raum der Bindetasche erfolgten anhand der globalen Minima der jeweiligen *hot spots*. Den Kern des Modells bildeten zwei aromatische *features* (F1, F2), wobei F1 direkt oberhalb von Arg155 positioniert wurde, um prinzipiell die Ausbildung entsprechender π - π -Interaktionen zwischen Protein und Ligand zu ermöglichen. Für die Ausbildung gerichteter Wechselwirkungen wurden zwei hydrophile *features* definiert, die durch H-Brückenakzeptoren oder -donoren erfüllt wurden (F3, F4). Die Positionen der beiden *features* eigneten sich für die Ausbildung mehrerer H-Brücken mit den Aminosäuren Arg155, Asn174, Gln520 und Glu523 (F3) sowie mit Asn174, Thr177 und Gln520 (F4). Darüber hinaus wurde noch ein weiteres *feature* als H-Brückendonator für potenzielle Interaktionen mit Ala148, Phe150, Arg155 und Glu523 auf der linken Seite der Zielregion platziert (F5). Zusätzlich wurde das Modell noch um vier *projected features* erweitert, jeweils zwei auf beiden Seiten des Pharmakophormodells, die auf den Aminosäuren Ala148, Asn174, Thr177 und Glu523 platziert wurden, mit der Intention, die gesuchten Liganden zentral innerhalb der Bindetasche zu positionieren. *Projected features* kennzeichnen die Position potenzieller H-Brückenbindungspartner des Rezeptors, mit denen ein Ligand interagieren kann bzw. soll. Mit Hilfe der Definition von *excluded volumes* um die Aminosäuren der unmittelbaren Bindetasche wurden die morphologischen Informationen der Interfaceregion in das bestehende Pharmakophormodell integriert. Damit während des virtuellen Screeningprozesses Datenbankmoleküle als *hits* erkannt werden, mussten die Moleküle alle vorgegebenen *features* erfüllen sowie mindestens ein *projected feature* auf jeder Seite der Zielregion adressieren.

ID	Status	Definition	Radius [Å]	Position
F1	essenziell	aro	1,0	g
F2	essenziell	aro	1,0	h
F3	essenziell	Akz Don	1,0	c
F4	essenziell	Akz Don	1,0	d
F5	essenziell	Don	1,0	f
F6	-	proj Don	1,0	Glu523
F7	-	proj Don	1,0	Ala148
F8	-	proj Don	1,0	Thr177
F9	-	proj Akz	1,0	Asn174
V2	essenziell	<i>excluded volumes</i>	variierend	-
C1	essenziell	At least one F[6,7]	-	-
C2	essenziell	At least one F[8,9]	-	-

Tab. 15. Übersicht über die einzelnen Bestandteile des für die virtuellen Datenbanksuchen verwendeten Pharmakophormodells. Bedeutung der Abkürzungen: „aro“ aromatisches System, „Akz“ H-Brückenakzeptor, „Don“ H-Brückendonator, „proj Akz“ *projected feature* H-Brückenakzeptor, das die Position eines potenziellen H-Brückendonors des Proteins und „proj Don“ *projected feature* H-Brückendonator, das die Position eines potenziellen H-Brückenakzeptors des Rezeptors kennzeichnet.

Virtuelle Datenbanksuche

Auf der Suche nach potenziellen Liganden der Interfacekavität wurden anhand des beschriebenen Pharmakophormodells zwei Moleküldatenbanken unter Verwendung von *MOE* durchsucht. Bei den Datenbanken handelte es sich um die von der *Chemical Computing Group* zusammengestellte Datenbank (CCG-Datenbank) mit ~661.000 leitstrukturähnlichen Verbindungen (siehe Abschnitt III.4.2.1.3) sowie um eine arbeitskreisinterne Variante des *druglike subsets* der ZINC-Datenbank (Interne-Datenbank)¹⁷³, bestehend aus ~2,9 Millionen niedermolekularen Verbindungen.

Das erstellte Pharmakophormodell erwies sich als sehr spezifisch und restriktiv, da von den insgesamt analysierten ~3,6 Millionen Molekülen letztendlich nur **265** Verbindungen, von denen **44** aus der CCG-Datenbank und **221** aus der Internen-Datenbank stammten, die an sie gestellten Anforderungen erfüllten und als *in silico hits* für nachfolgende Docking-simulationen ausgewählt wurden.

IV.3.2.1.2 Ligandbasierter Ansatz

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei dieser Studie um den ersten Versuch der Identifizierung von Liganden des Hsp70-Interdomäneninterfaces handelte, erschien es im Rahmen des initialen virtuellen Screenings sinnvoll, eine Vielzahl möglichst verschiedener Grundgerüste (*Scaffolds*) zu identifizieren, um diese im weiteren Verlauf hinsichtlich ihres Bindungspotenzials zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde als Ergänzung zu dem proteinbasierten Ansatz eine ligandbasierte Strategie verfolgt, wobei der potente und experimentell bestätigte Hsp70-Ligand Apoptozol (Az) als Templatstruktur diente. Dieser Ansatz stützt sich auf die konsistenten Resultate der durchgeführten Dockingstudien (siehe Abschnitt IV.3.1), die auf eine Bindung des Az an die Interfacekavität deutlich hinweisen. Die computergestützte Suche nach möglichen Kandidatenmolekülen innerhalb der Internen-Datenbank¹⁷³ erfolgte mittels *FTreesXL*^{58,59,169} (Version 1.1.4).

Im Anschluss an die Berechnungen der molekularen Ähnlichkeit zwischen Az und den Datenbankverbindungen wurde die Anzahl resultierender *hits* für einen Ähnlichkeitsbereich zwischen 80-100% ermittelt (siehe Tab. 16), d.h. wie viele Moleküle der Datenbank über eine berechnete Ähnlichkeit von 80% bis 100% im Vergleich zur Referenzstruktur Az verfügten. Dabei wurden die Moleküle jedes Ähnlichkeitslevels stichprobenartig hinsichtlich ihrer chemischen Konstitution inspiziert. Die visuelle Analyse bestätigte die prinzipielle Eignung von *FTreesXL* für ein sogenanntes *scaffold hopping*, die Identifizierung chemisch nicht verwandter Grundgerüste mit biologisch vergleichbaren Wirkungen anhand einer biologisch aktiven Ausgangsverbindung, da zahlreiche inspizierte Moleküle keine offensichtlich erkennbaren strukturellen Übereinstimmungen zu Az zeigten.³²⁰ Als Kompromiss zwischen einer detailliert analysierbaren Molekülanzahl und einer gewissen Strukturvielfalt, wurden alle **189** Moleküle mit einer berechneten molekularen Ähnlichkeit von mindestens 86% gegenüber Az für die nachfolgenden Dockingsimulationen ausgewählt.

Ähnlichkeit [%]	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Hits	21715	13883	8246	4381	1948	688	189	53	6	1	0

Tab. 16. Übersicht über die jeweilige Anzahl an Molekülen mit berechneten Ähnlichkeitswerten zwischen 80 und 90% in Bezug auf den Referenzliganden Apoptozol.

Eine Überprüfung möglicher Übereinstimmungen an identifizierten *hits* des pharmakophor- und des *FTreesXL*-basierten Screeningverfahrens ergab, dass kein Datenbankmolekül in beiden Screeningansätzen herausgefiltert wurde. Dieses Resultat ist nicht überraschend und

ist auf die deutlichen Unterschiede zwischen dem verwendeten Pharmakophormodell und der chemischen Struktur von Az zurückzuführen.

IV.3.2.1.3 Dockingsimulationen an der Interdomänenkavität

Durch die Anwendung zweier etablierter Verfahren zur Identifizierung neuer Hsp70-Liganden, einem pharmakophorbasierten Screening und einer ligandbasierten Ähnlichkeitsuche, konnten aus Datenbanken mit insgesamt ~3,6 Millionen Verbindungen gezielt **454** Kandidatenmoleküle herausgefiltert werden, um sie hinsichtlich ihres Bindungspotenzials an die Zielregion mittels Dockingsimulationen weiter zu untersuchen. Die Dockingsimulationen wurden mit *AutoDock3.0* und anhand der Kristallstruktur 1YUW gemäß des in Abschnitt III.4.1 getesteten und beschriebenen Protokolls durchgeführt. Der Bereich der Bindetasche wurde durch ein kubisches Gitter um Gln520 mit einer Kantenlänge von 27 Å in jeder Dimension mit einem Abstand von 0,375 Å zwischen den einzelnen Gitterpunkten repräsentiert. Für jedes Ligandenmolekül wurden 50 Dockingläufe des genetischen Algorithmus durchgeführt, deren Dockinglösungen gemäß einer definierten Toleranz von 1,0 Å in Clustern zusammengefasst wurden.

Aufgrund des Fehlens von Liganden, die die Interfaceregion adressieren, existierten keine Informationen über spezielle Enzym-Ligand-Interaktionsmuster, die während der Auswertung der Dockingresultate hätten berücksichtigt werden können. Daher wurde für die weiteren Analysen von allen Kandidatenmolekülen ausschließlich die bestbewertete Dockinglösung berücksichtigt.

IV.3.2.1.4 Re- und Consensus-Scoring

Da für die Zielregion des Interdomäneninterfaces zum Zeitpunkt der Arbeit kein niedermolekularer Ligand bekannt war und aus diesem Grund auch keine Informationen über relevante Protein-Ligand-Interaktionsmuster existierten, bestand die Schwierigkeit bei der Auswertung der berechneten Dockinglösungen darin, potenziell relevante Bindemodi der Kandidatenmoleküle von vermeintlich artifiziellen zu unterscheiden und essenzielle Protein-Ligand-Wechselwirkungen abzuleiten, die zu einer Bindung des Liganden und in weiterer Folge möglicherweise zu einer Hemmung von Hsp70 führen. Diese Problematik verdeutlicht einmal mehr die Schwierigkeiten des strukturbasierten Ligandendesigns an neuen, noch nicht umfassend charakterisierten Targets. Daher wurden zusätzliche Berechnungen zur Abschätzung der Bindungsaffinitäten der **454** Kandidatenmoleküle vorgenommen.

Dieses Re-Scoringverfahren wurde mit *SFCscore*, unter Anwendung der *SFC_290m*-Scoringfunktion, durchgeführt. Die Berechnungen basierten auf den Komplexen der Proteinstruktur 1YUW und den jeweils auf Rang 1 geführten Dockinglösungen jedes Ligandenmoleküls. Um sich bei der Auswahl der Kandidatenmoleküle für die experimentellen Untersuchungen auf die vielversprechendsten Verbindungen konzentrieren zu können, wurden diese durch ein Consensus-Scoring ermittelt. Dabei wurde den Verbindungen zunächst basierend auf den für sie von *AutoDock3.0* und *SFCscore* berechneten Bindungsaffinitäten jeweils ein Rang zugewiesen. Aus den beiden zugewiesenen Rängen jedes Moleküls wurde anschließend der Mittelwert gebildet, der schließlich für die Erstellung einer finalen Affinitätsrangliste verwendet wurde. Um eine Vergleichsgröße für die berechneten Bindungsaffinitäten der Kandidatenmoleküle zu haben und die auf diese Weise ermittelten Affinitätsränge einordnen zu können, wurde das beschriebene Prozedere ebenfalls für den Liganden Az auf Grundlage der für die Interfaceregion resultierenden Rang 1-Dockinglösung (siehe Abschnitt IV.3.1) durchgeführt. Auf der Grundlage der für Az berechneten Bindungsaffinitäten, würde dem Liganden mit einem Rangmittelwert von 9,0 der 8. Affinitätsrang zugewiesen werden. Die finale Affinitätsrangliste mit Rangmittelwerten von 4,5 bis 46,0 umfasste insgesamt 77 Affinitätsränge. Für die anschließende Auswahl geeigneter Testsubstanzen wurden ausschließlich Verbindungen oberhalb eines festgelegten Grenzwerts, einem Rangmittelwert von mindestens 15 berücksichtigt. Als Konsequenz dieser Entscheidung wurde die Anzahl der verbliebenen Moleküle von **454** auf **55** reduziert (siehe Anhang VI.5). Der erstellten Affinitätsrangliste zufolge würden 15 der **55** Verbindungen über eine höhere Bindungsaffinität als Az zu der Interfacekavität verfügen.

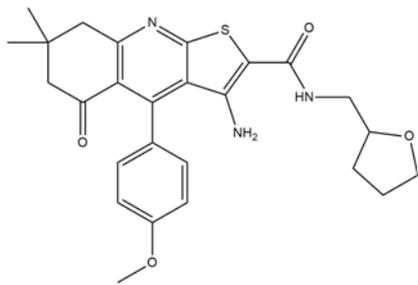
IV.3.2.1.5 Auswahl der Kandidatenmoleküle für experimentelle Analysen

Die Zielsetzung des virtuellen Screenings bestand darin, erste Liganden des Interdomäneninterfaces von Hsp70 zu identifizieren, die die enzymatische Aktivität inhibieren. Damit die ausgewählten Verbindungen sowohl mit hoher Affinität als auch mit ausreichender Selektivität an Hsp70 binden, ist eine möglichst große chemische und strukturelle Komplementarität zwischen den Liganden und der Bindetasche notwendig. Aus diesem Grund kam den berechneten Bindeposen sowie den prognostizierten Bindungsaffinitäten während des Auswahlprozesses eine zentrale Bedeutung zu. Bei der eingehenden Analyse der entsprechenden Dockinglösungen der **55** verbliebenen Moleküle wurde besonders die Qualität und Anzahl der ausgebildeten Protein-Ligand-Interaktionen sowie die chemische und morphologische Komplementarität untersucht. Des Weiteren wurden auch die

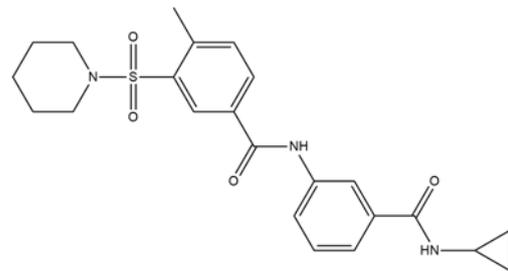
intramolekularen Konformationsenergien der Bindeposen überprüft, da außergewöhnlich hohe Werte auf sehr ungünstige Geometrien hindeuten, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass der Ligand die jeweilige Konformation tatsächlich einnimmt, abnimmt. Ein weiteres Hauptaugenmerk lag auf der Auswahl chemisch möglichst diverser Verbindungen, um ein breites Spektrum verschiedener Verbindungsklassen experimentell zu untersuchen.

Da es sich bei dem verwendeten Assay zur Bestimmung der biologischen Aktivität der ausgewählten Moleküle um einen zellbasierten Assay handelte, spielte weiterhin die Polarität der Verbindungen eine entscheidende Rolle. Die zu testenden Moleküle sollten unter den Assaybedingungen idealerweise keine oder eine äußerst geringe Anzahl expliziter Ladungen aufweisen, da die Substanzen zunächst die Zellmembran passieren müssen, um mit dem biologischen Target Hsp70 interagieren zu können.

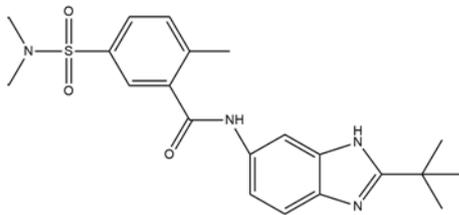
Von den verbliebenen **55** Verbindungen wurden schließlich auch unter Berücksichtigung der kommerziellen Verfügbarkeit die **9** vielversprechendsten Verbindungen (siehe Abb. 43) für die experimentelle Analyse von den entsprechenden Anbietern bezogen. Eine zusammenfassende Übersicht über die Resultate der Dockingsimulationen und der Re-Scoringstudie der final ausgewählten Kandidatenmoleküle zeigt Tabelle 17.



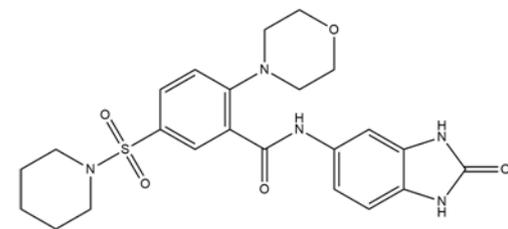
HIL-1



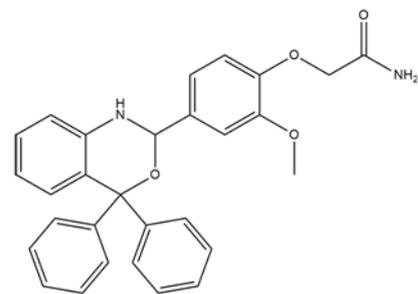
HIL-2



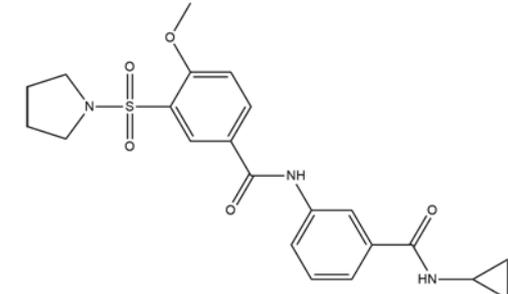
HIL-3



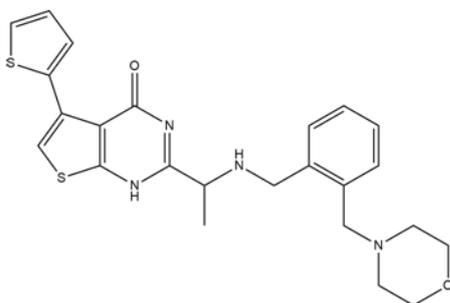
HIL-4



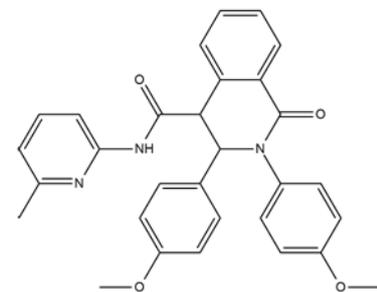
HIL-5



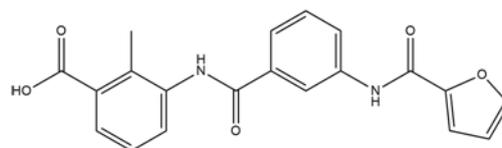
HIL-6



HIL-7



HIL-8



HIL-9

Abb. 43. Strukturformeln der neun ausgewählten Kandidatenmoleküle.

Ligand	ΔG [kca/mol]	SFCscore pK _i	Affinitätsrang	Screeningverfahren
HIL-1	-12,57	7,6	2	Pharmakophor
HIL-2	-12,14	8,0	3	Pharmakophor
HIL-3	-12,23	7,5	5	Pharmakophor
HIL-4	-11,87	7,6	7	Pharmakophor
HIL-5	-11,78	7,7	7	FTreesXL
HIL-6	-11,91	7,5	8	Pharmakophor
HIL-7	-13,48	6,2	11	Pharmakophor
HIL-8	-10,88	7,5	18	FTreesXL
HIL-9	-11,30	7,1	18	Pharmakophor

Tab. 17. Übersicht über die von *AutoDock3.0* berechneten freien Bindungsenthalpien (ΔG), der von *SFCscore* berechneten pK_i-Werte und des Affinitätsranges der für experimentelle Untersuchungen ausgewählten Kandidatenmoleküle sowie des jeweiligen Screeningverfahrens, das die niedermolekulare Verbindung identifizierte.

Die Bindemodi der berechneten und analysierten Dockinglösungen der **9** Kandidatenmoleküle zeigten, dass die Liganden durchweg das Zentrum der Interfacekavität adressierten und aufgrund ihrer Größe und Konstitution geeignet waren, den verfügbaren Raum umfassend auszufüllen. Der potenzielle Hsp70-Interfaceligand **HIL-1** zeigte trotz des starren trizyklischen Ringsystems eine sehr gute Anpassung an die Morphologie der Interfacekavität (siehe Abb. 44). Durch den Trizyklus und den Hydrofuranring, der in Richtung der von Leu210, Phe217 und Val219 ausgebildeten Subtasche im hinteren Bereich der Bindetasche ragte, wurden alle detektierten *hot spots* für hydrophobe bzw. aromatische Interaktionspunkte adressiert sowie eine H-Brücke mit Thr177 ausgebildet. Darüber hinaus ermöglichte der Bindemodus prinzipiell noch die Ausbildung zwei bis drei weiterer H-Brücken mit den Aminosäuren Gln520, Asn174 und bzw. oder mit Arg155.

Bei den Verbindungen **HIL-2** und **HIL-6** handelte es sich um sehr ähnliche Derivate einer Molekülserie, deren Dockinglösungen einen konsistenten Bindemodus zeigten. Die beiden zentralen Phenylringe lagen in einer Ebene, dass beiden Liganden eine Bindung an den hinteren Bereich der Bindetasche unter Ausbildung von π - π -Kontakten mit Arg155 sowie die Adressierung der vergleichsweise vergrabenen Subtasche durch den Piperidin- bzw. Pyrrolidinring ermöglichte. Der Cyclopropylrest war im linken Randbereich gegenüber von Val219 platziert. Die Carbamidbindungen standen senkrecht zur Ebene der Phenylringe, optimal für die Ausbildung von H-Brücken mit Gln520 und Glu523. Für zusätzliche H-Brücken standen Asn174 und Thr177 als Donoren zur Verfügung, die Sulfonylgruppe der

Liganden fungierte als Akzeptor, wodurch insgesamt von den Molekülen drei der vier vorgegebenen *projected features* des Pharmakophormodells adressiert wurden. Die Auswahl zweier derart ähnlicher Verbindungen basierte einerseits auf überzeugenden Resultaten der *in silico* Untersuchungen und erlaubte andererseits eine Überprüfung der verwendeten Assays, ob für die beiden Strukturanaloga vergleichbare Ergebnisse gemessen werden würden.

Bedingt durch eine gewisse strukturelle Parallelität gegenüber **HIL-2** und **HIL-6** sowie einer unübersehbaren molekularen Ähnlichkeit untereinander, zeigten die Bindemodi von **HIL-3** und **HIL-4** vergleichbare Interaktionsmuster wie die zuvor beschriebenen Verbindungen. Die Sulfonylgruppe wurde optimal positioniert, um H-Brücken mit Asn174 und Thr177 auszubilden. Zudem konnte die Ausbildung einer H-Brücke mit Gln376 beobachtet werden. Die zentrale amidische NH-Gruppe interagiert mit Gln520, während der Benzimidazolrest eine H-Brücke mit Ala148 einging und dessen Phenylring den aromatischen *hot spot* oberhalb von Arg155 besetzte und für ein π - π -Stacking nutzte.

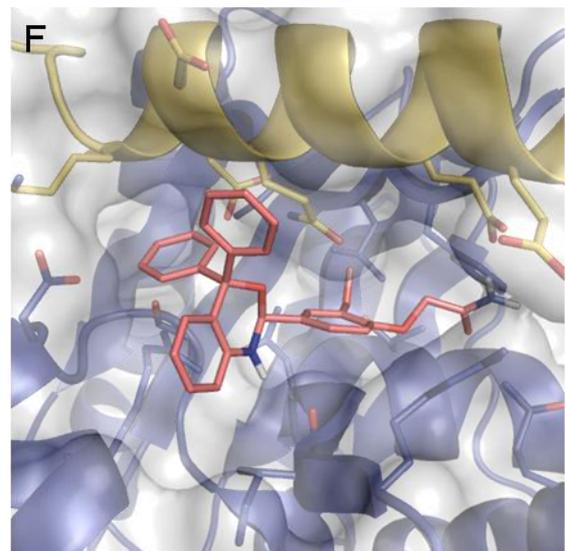
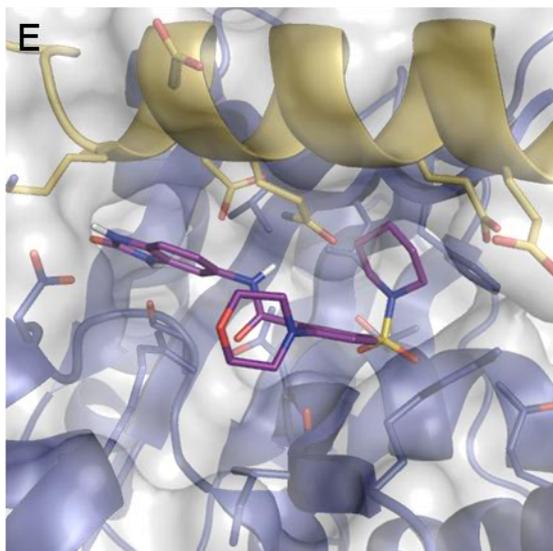
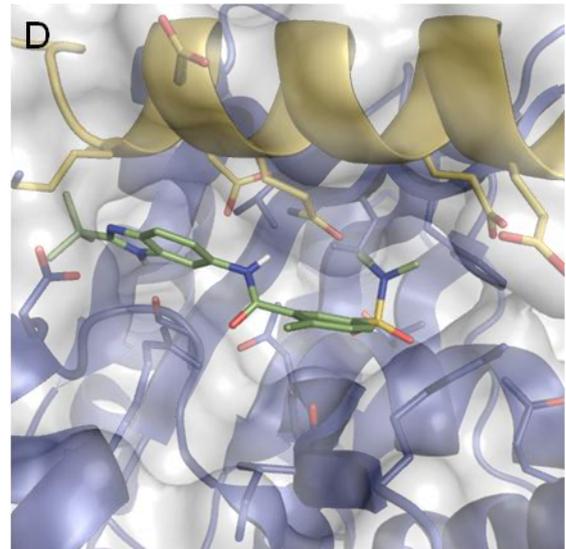
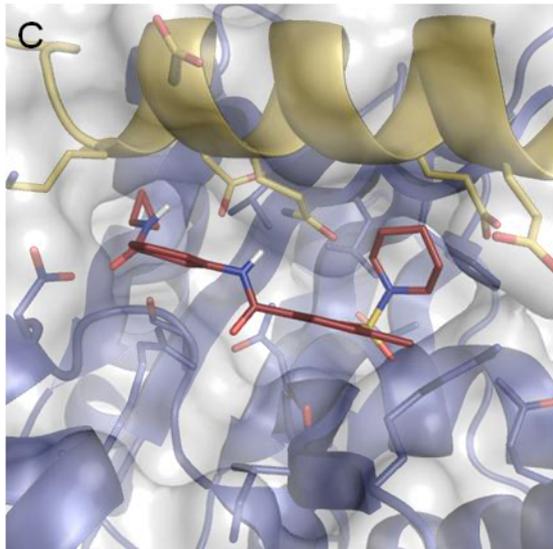
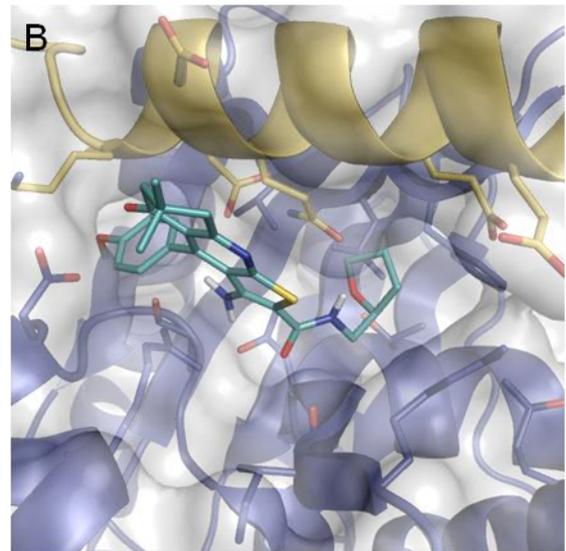
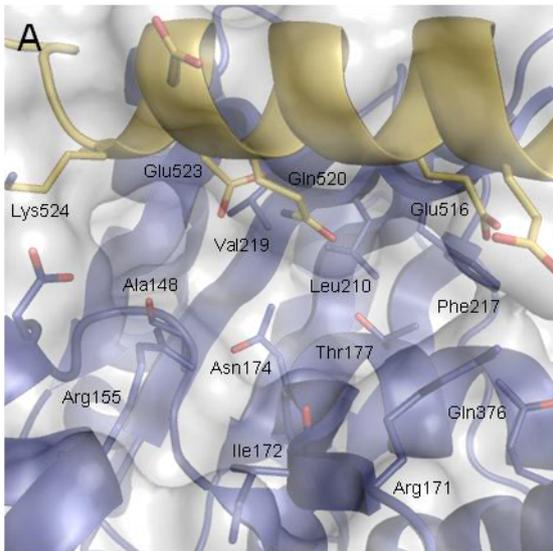
Auch für **HIL-5** wurde ein Bindemodus berechnet, der den verfügbaren Raum der Binde-tasche umfassend ausfüllte und dabei eine sehr gute strukturelle Anpassung zeigte. Das voluminöse bicyklische Ringsystem des Moleküls mit zwei davon abgehenden Benzylsubstituenten adressierte unter Ausbildung einer H-Brücke mit Ile172 den linken vorderen Kavitätsbereich, während die terminale Carbamidgruppe den rechten hinteren Randbereich unter Ausbildung zweier H-Brücken mit Gln376 und Glu516 adressierte. **HIL-5** war die einzige Verbindung der ausgewählten Kandidatenmoleküle, die auch Aminosäuren des rechten Randbereichs der Bindetasche als Interaktionspartner für Wechselwirkungen nutzte. Weitere H-Brücken konnten darüber hinaus von der Methoxygruppe des zentralen Phenylrings, die in Richtung der hydrophoben Subtasche ragte, mit Thr177 sowie Asn174 ausgebildet werden.

Im Gegensatz zu dem Bindemodus von **HIL-5** adressierte **HIL-7** vornehmlich die linke Hälfte der Bindetasche, wobei es aus dem unmittelbaren Bindetaschenbereich seitlich herausragte und sich an eine Furche der linken äußeren Interfacesseite anlagerte. Vom Dockingprogramm wurde für diese Bindepose, trotz des seitlichen Herausragens eines Molekülrests, eine hohe Affinität vorhergesagt, mit der von allen Dockinglösungen der 9 verbliebenen Kandidatenmoleküle (HIL-1 bis 9) günstigsten berechneten freien Bindungsenthalpie. Möglicherweise lässt sich diese Affinitätsabschätzung mit einer sehr guten strukturellen Anpassung an die Morphologie der Kavität sowie der Ausbildung von mehreren gerichteten Wechselwirkungen erklären. Der Bindemodus ermöglichte die Ausbildung von drei H-Brücken, die zwischen der Aminogruppe und Ala148, der Carbonylfunktion des Bicyklus' und Asn174 sowie zwischen dem Morpholinring, dessen Protonierung vorausgesetzt, und der Carbonylfunktion der

Hauptkette von Glu523 mit durchgängig optimalen Distanzen von 2,8-3,3 Å zwischen den Schweratomen. Zusätzlich konnten zwischen dem Bizyklus und Arg155 π - π -Interaktionen eingegangen werden.

Die niedermolekulare Verbindung **HIL-8** wurde im Rahmen des ligandbasierten Screeningansatzes identifiziert und wies eine große, offensichtliche molekulare Ähnlichkeit zu dem bekannten Hsp70-Liganden Az auf. Aus diesem Grund waren auch die beobachtbaren Parallelen der für beide Moleküle mittels Dockingsimulationen berechneten Bindemodi nicht überraschend. Ebenso wie die Rang 1-Dockinglösung des Az' für das Dockingverfahren an der unmittelbaren Interdomänenkavität (siehe Abschnitt IV.3.1) adressierte **HIL-8** den zentralen Bereich der Kavität und zeigte dabei deutliche Parallelen hinsichtlich der Positionierung und Orientierung des Y-förmigen Grundgerüsts. Durch die nahezu identische Adressierung des linken Randbereichs der Interdomänenkavität durch die beiden Methoxyphenylreste des Liganden konnte ebenfalls die Ausbildung einer H-Brücke mit Lys524 beobachtet werden. Die größte Abweichung stellte die entgegengesetzte Positionierung des vom Y-förmigen Grundgerüst abzweigenden Ligandenrests dar. Dieser Molekülteil, bestehend aus einer Carbamidgruppe und einem substituierten Pyridin, ragte nicht in den hinteren Bereich der Kavität, sondern besetzte den vorderen Eingangsbereich, wobei eine H-Brücke zwischen Carbamid und dem Carbonylsauerstoff von Ile172 ausgebildet wurde und Interaktionen zwischen dem Pyridinstickstoff des Liganden und der Aminfunktion von Ile172 eingegangen werden konnten.

Die Verbindung **HIL-9** band mit gestreckter Konformation in die Bindetasche, wobei dessen drei Ringe planar in einer Ebene lagen und sich dadurch tief bis in den hinteren Bereich der Kavität zwischen die beiden Domänen schoben. Die Carboxylatfunktion interagierte am rechten Randbereich mit Gln376 und, je nach dessen Protonierungszustand, möglicherweise mit Arg171, während die NH-Gruppen der Carbamidfunktionen H-Brücken mit Gln520 und Glu523 ausbildeten. Das Interaktionsmuster wurde zudem noch um aromatische Kontakte in Form eines *parallel stackings* mit Arg155 ergänzt.



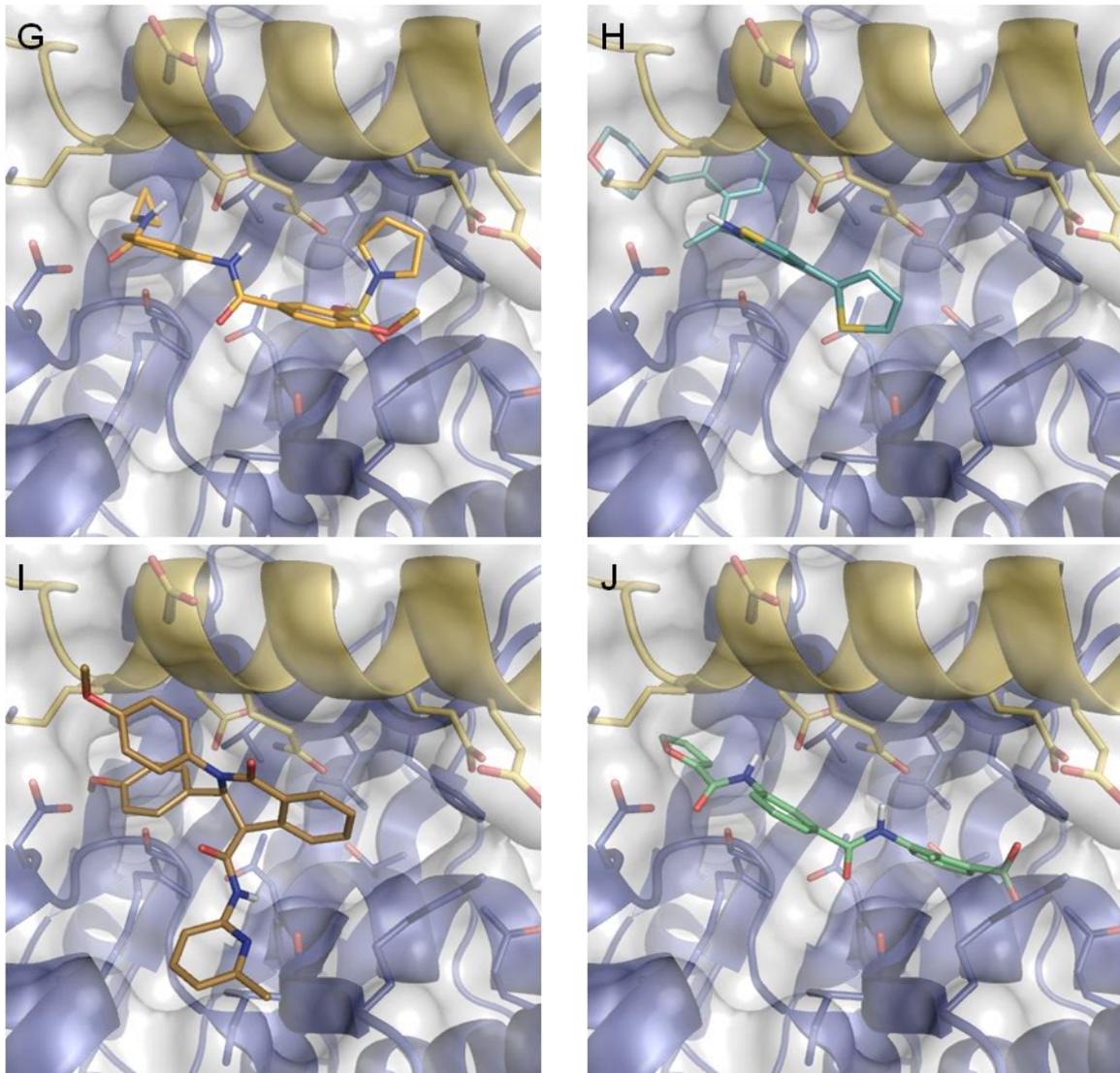


Abb. 44. A) Darstellung der Interdomänenkavität mit einer Übersicht über relevante Aminosäuren. Darstellung der Bindemodi der neun Kandidatenmoleküle innerhalb der Interdomänenkavität **B)** HIL-1 **C)** HIL-2 **D)** HIL-3 **E)** HIL-4 **F)** HIL-5 **G)** HIL-6 **H)** HIL-7 **I)** HIL-8 **J)** HIL-9.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass für alle ausgewählten Kandidatenmoleküle plausible Bindemodi mit einer überzeugenden morphologischen Anpassung an das Protein im Zentrum der Zielregion erhalten wurden, wobei mit Ausnahme von **HIL-5** alle untersuchten Verbindungen bevorzugt gerichtete Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der linken Hälfte der Interdomänenbindetasche eingingen. Darüber hinaus bestätigten die beobachteten Interaktionsmuster die Eignung der vorab definierten *projected features* des Pharmakophormodells als wichtige Interaktionspartner, da mindestens zwei dieser H-Brückenbindungspartner durchgängig von allen Molekülen adressiert wurden. Weiterhin ist noch zu erwähnen, dass durch geringfügige Anpassungen der Seitenketten der zahlreich vorhandenen polaren Aminosäuren bei jeder Dockinglösung zahlreiche weitere

Wechselwirkungen resultieren könnten. Daher ist es bei der Auswertung von *in silico* generierten Bindeposen wichtig, nicht nur die tatsächlich beobachtbaren Interaktionen, sondern auch alle weiteren durch geringfügige strukturelle Anpassungen seitens des Rezeptors potenziell möglichen Wechselwirkungen zu berücksichtigen.

Im Anschluss an die Auswahl der Kandidatenmoleküle für die nachfolgenden *in vitro* Assays erfolgte abschließend eine Überprüfung der Strukturvielfalt der ausgewählten Ligandenmoleküle hinsichtlich der Abdeckung des ursprünglichen chemischen Raumes der **55** bestbewerteten Verbindungen durch die getroffene Molekülauswahl anhand eines hierarchischen Clusterings mit Hilfe von *MOE*. Hierfür wurde ein von der CCG in Person von Dr. Guido Kirsten zur Verfügung gestelltes SVL-Skript verwendet, das eine Ähnlichkeitsmatrix auf Basis der molekularen *fingerprints* der **55** Moleküle berechnete. Die Berechnung der *fingerprints* erfolgte unter Verwendung der *MACCS Structural Keys (Bit packed)* und Verwendung des *Tanimoto coefficient*. Molekulare *fingerprints* kodieren bestimmte Eigenschaften oder Fragmente eines Moleküls mit der Intention, Molekülstrukturen mittels simplen Deskriptoren zu beschreiben, um schnelle computergestützte Molekülvergleiche mit geringem Rechenaufwand zu ermöglichen. In Abhängigkeit vom jeweiligen Schema werden verschiedene Eigenschaften hervorgehoben.³²¹⁻³²³

Auf der Grundlage der ermittelten Ähnlichkeitsmatrix erfolgte anschließend ein *Clustering*, d.h. die Zusammenfassung ähnlicher Moleküle zu einer Molekülgruppe, einem *Cluster*. Die Visualisierung der berechneten Ähnlichkeiten erfolgte in Form eines Dendrogramms, das die gegenseitige Verknüpfung aller Moleküle untereinander entsprechend ihrer molekularen Ähnlichkeit darstellt (*Complete Linkage Clustering*). Das Dendrogramm verfügt über eine Skalierung: je weiter sich die Verbindungslinien zweier Knotenpunkte in Richtung x-Achse befinden, desto größer ist deren berechnete molekulare Ähnlichkeit. Die Auswertung des erzeugten Dendrogramms bestätigt den Erfolg der bewusst vorgenommenen Auswahl möglichst verschiedener Ligandenmoleküle für die experimentellen Analysen und die Abdeckung eines möglichst breiten chemischen Spektrums, da bis auf die sehr ähnlichen Verbindungen **HIL-2** und **HIL-6** ausschließlich Moleküle mit hoher struktureller Diversität ausgewählt wurden (siehe Abb. 45).

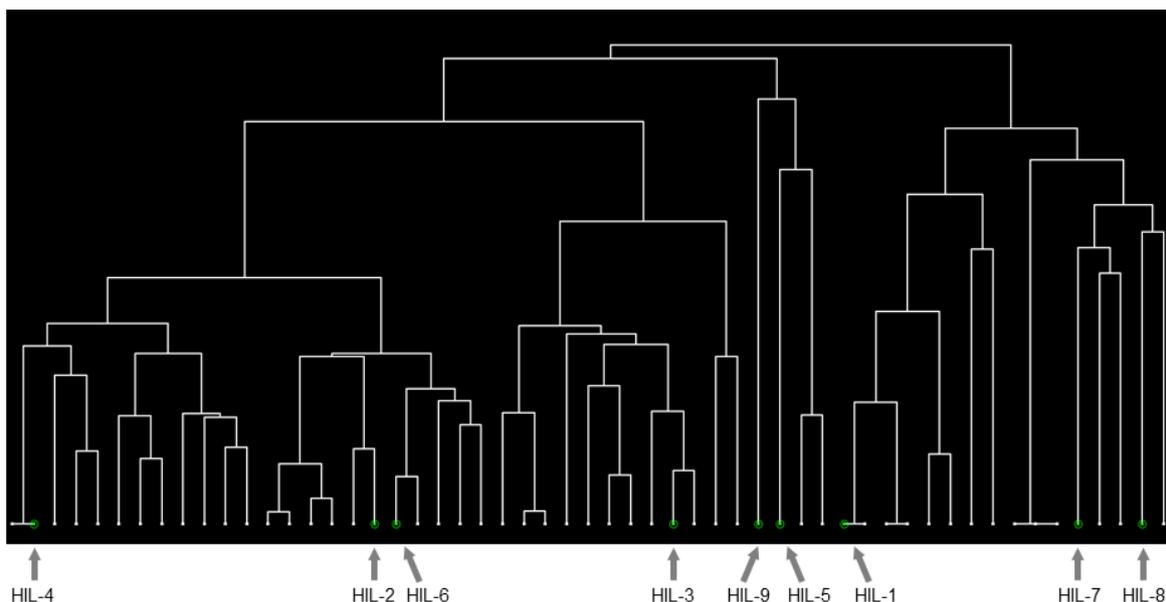


Abb 45. Dendrogramm des hierarchischen Clusterings der 55 bestbewerteten Moleküle des virtuellen Screenings.

IV.3.2.1.6 Experimentelle Untersuchungen der Kandidatenmoleküle

Im letzten Schritt des Screeningverfahrens ging es darum die chemischen Verbindungen experimentell zu untersuchen und dadurch die computergestützten Berechnungen in Bezug auf vermeintliche Bindungsaffinitäten, Bindeposen sowie hinsichtlich der jeweils adressierten Bindestelle zu überprüfen. Hierzu wurden die **9** Kandidatenmoleküle zunächst hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität gegenüber Krebszellen anhand eines Zellviabilitätsassays untersucht. Als humanes Krebszellmodell wurden Multiple Myelomzellen gewählt. Die Entscheidung für diese Zellen beruhte einerseits darauf, dass die Zielstruktur Hsp70 im Rahmen der Klinischen Forschergruppe 216 bearbeitet wurde (siehe Abschnitte I.3 und IV.2) und andererseits für diese bisher unheilbare Krebserkrankung von Kooperationspartnern bereits eine pathogenetische Rolle der beiden Isoformen Hsp72 und Hsc70 nachgewiesen werden konnte.²⁶⁹ Die experimentelle Durchführung der Assays erfolgte durch Elisabeth Müller im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Bargou unter der Aufsicht von Dr. M. Chatterjee, Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg.

Die biologische Wirkung einer vermeintlichen Hsp70-Inhibition auf die Zellviabilität wurde nach einer 72-stündigen Inkubationszeit für jeweils verschiedene Konzentrationen der niedermolekularen Verbindungen an Multiplen Myelomzellen getestet. Die Tests erfolgten an der humanen Zelllinie INA-6³²⁴, die ein etabliertes Model für das Multiple Myelom

repräsentiert, sowie an mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Letzteres diene als eine Art Spezifitätskontrolle, da diese Zellen durch die Substanzen idealerweise nicht abgetötet werden sollten. Der prozentuale Anteil an lebenden, apoptotischen und toten Zellen wurde mit Hilfe einer Annexin V-FITC/Propidiumiodid-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie analysiert. Für die Ermittlung sogenannter *kill curves* (Tötungskurven) wurden verschiedene Konzentrationen der Substanzen titriert und die lebenden Zellfraktionen wurden weiter analysiert, wofür die Software *GraphPad Prism*³²⁵ verwendet wurde. Als Maß für die zytotoxische Aktivität der getesteten Verbindungen wurden EC₅₀-Werte aus den Messergebnissen ermittelt (siehe Tab. 18). Zusätzlich zu den 9 Kandidatenmolekülen wurde auch der im Screening als Ligandtemplatstruktur verwendete Hsp70-Ligand Apoptozol mit dem beschriebenen Assay untersucht, um die Werte der ausgewählten Verbindungen einordnen zu können.

Ligand	M [g/mol]	logP	EC ₅₀ [μM]
Az	626	-	8,0
HIL-1	480	5,10	17
HIL-2	442	4,80	90
HIL-3	415	3,77	-
HIL-4	486	2,0	-
HIL-5	467	4,15*	-
HIL-6	444	1,83	90
HIL-7	467	2,41	18
HIL-8	494	5,55*	0,7
HIL-9	364	3,61	-

Tab. 18. Übersicht über die physiko-chemischen Kenngrößen der neun getesteten Verbindungen und über die experimentell bestimmten EC₅₀-Werte. Als Kenngrößen sind die jeweilige molare Masse (M) und der logarithmische Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP) angegeben. Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient dient als ein Maß für das Verhältnis zwischen Fett- und Wasserlöslichkeit einer Substanz, wobei die Angaben auf den Informationen der Hersteller basierten oder mit Hilfe des Tools *ACD/LogP*³²⁶ computergestützt berechnet wurden (*).

Abschließend sei erwähnt, dass es sich bei dem verwendeten Assay um eine indirekte Methode zur Bestimmung einer potenziell vorliegenden Ligandbindung und ligandinduzierten Inhibition von Hsp70 handelt, da die zytotoxische Aktivität der Kandidatenmoleküle an ganzen Zellen bestimmt wurde, jedoch keine direkte Bestimmung einer Bindung an das separierte Zielprotein erfolgte. Aus diesem Grund wurde bereits und wird auch weiterhin in Folgearbeiten versucht, eine Bindung der Kandidatenmoleküle an Hsp70 näher zu

charakterisieren und eindeutig sowohl *in vitro*, als auch in der Targetzelle nachzuweisen. Diese Arbeiten waren zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Dissertation noch nicht abgeschlossen und sind Bestandteil aktueller Forschungsprojekte, weshalb an dieser Stelle keine abschließenden Ergebnisse präsentiert werden können. Erste Teilergebnisse der experimentellen Untersuchungen können den Dissertationen von A. Hartung³²⁷ und D. Zilian³²⁸ entnommen werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Als Resultat des durchgeführten Protokolls zur Identifizierung einer neuartigen Klasse niedermolekularer Hsp70-Inhibitoren, die das Interdomäneninterface adressieren sollen, gelang es mit Hilfe eines virtuellen Screenings unter iterativer Anwendung eines breiten Spektrums verschiedener Methoden des computergestützten Wirkstoffdesigns aus einer Anzahl von ~3,6 Millionen Molekülen gezielt 9 Kandidatenmoleküle zu identifizieren. Von den 9 Kandidatenmolekülen zeigten 5 Verbindungen in dem Zellviabilitätsassay eine zytotoxische Aktivität gegenüber den Multiplen Myelomzellen (siehe Tab. 18). Diese Ausbeute entspricht einer Trefferquote von 56% und zeigt das große Potenzial der Nutzung computerbasierter Methoden für die Identifizierung neuer Liganden und potenzieller Leitstrukturen für gegebene biologische Zielstrukturen. Die in der Fachliteratur angegebenen Trefferquoten von virtuellen Screeningstudien für die Identifizierung biologisch aktiver Enzyminhibitoren umfassen einen großen Bereich mit Werten von 1%³²⁹ bis 60%³³⁰ oder mehr. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass hohe Trefferquoten mit Werten von über 50% vielfach bei Untersuchungen einer statistisch geringen Anzahl an getesteten Verbindungen resultierten.³³¹⁻³³³ Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass sich die einzelnen Trefferquoten nur schwer bzw. in den wenigsten Fällen direkt miteinander vergleichen lassen, da der Erfolg eines virtuellen Screenings von vielen verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Anzahl und Qualität der verfügbaren Strukturinformationen und der Definition unterschiedlicher Kriterien, wann ein Molekül als *hit* gewertet wird, abhängig ist. Die in dieser Studie erzielte Trefferquote von 56% ist somit als ein sehr gutes Resultat anzusehen, besonders wenn berücksichtigt wird, dass es sich hierbei um eine Suche nach den ersten Liganden für eine neuartige Bindestelle des Enzyms Hsp70 handelt, die bis zum Zeitpunkt der Arbeit nicht näher untersucht wurde und wofür zum Zeitpunkt der Arbeit keine Liganden bekannt waren. Von allen aktiven Verbindungen ist besonders **HIL-8**, als Molekül mit dem größten gemessenen zytotoxischen Potenzial, hervorzuheben. Die biologische Aktivität des Liganden ist aufgrund der vorhandenen strukturellen Parallelen zu Az nicht überraschend. Interessant ist jedoch die vergleichsweise stärkere Zytotoxizität, die möglicherweise auf die „vertauschten“ Positionen der Carbamidfunktion und des aromatischen Systems im Vergleich

zum Az zurückzuführen ist (siehe Abb. 46) und aus **HIL-8** eine vielversprechende Templatstruktur für zukünftige Liganddesignstudien macht.

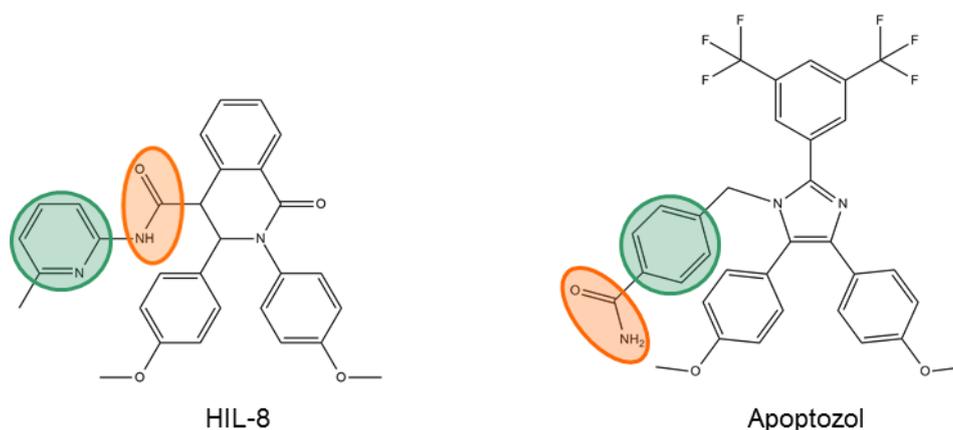


Abb. 46. Vergleich der Molekülstrukturen von HIL-8 und Apoptozol.

IV.3.2.2 Adressierung des Interdomäneninterfaces mit TMAO-Derivaten

Im Rahmen der Arbeit an der Zielstruktur Hsp70 gelang es unserem Kooperationspartner Dr. C. Grimm, Lehrstuhl für Biochemie, Biozentrum, Universität Würzburg zwei weitere Kristallstrukturen des Zweidomänenkonstrukts des Enzyms bHsc70 (As 1-554), die sequenziell analog zu der von Jiang *et al.*²⁰¹ publizierten Proteinstruktur 1YUW sind, aufzuklären. Die Kristallstrukturen verfügen über eine höhere Auflösung als die Kristallstruktur 1YUW und lieferten weitere Strukturinformationen hinsichtlich des Interdomäneninterfaces, u.a. über alternative Seitenkettenkonformationen der Aminosäuren der Interdomänenkavität. In beiden Proteinstrukturen befindet sich jeweils ein Molekül Trimethylaminoxid (TMAO) der Kristallisationspufferlösung, ein Osmolyt mit stabilisierendem Effekt auf biologische Strukturen während der Proteinkristallisation, innerhalb des Bogens der linken Seite des Interdomäneninterfaces, der von Asp152 und Lys524 gebildet wird (siehe Abb. 48). Ausgehend von dieser Beobachtung wurde der Versuch unternommen, das Molekülfragment TMAO als Ankergruppe für eine gezielte Adressierung der Interfacekavität zu nutzen und nach Derivaten des Moleküls als potenzielle Interfaceliganden und vermeintliche Hsp70-Inhibitoren zu suchen, um die Hypothese der Eignung der Interdomänenkavität als potenzielle Bindestelle belegen zu können. Es sei erwähnt, dass es bei diesem Ansatz primär nicht darum ging, möglichst hochaffine Inhibitoren zu finden, sondern mit Hilfe der gesuchten Moleküle nachzuweisen, dass es prinzipiell möglich ist, die Interdomänenkavität

mit Liganden zu adressieren und diesen Ansatz durch weitere experimentelle Daten zu untermauern.

Virtuelles Screening nach TMAO-Derivaten als potenzielle Interfaceliganen

Basierend auf den eingangs genannten kristallographischen Beobachtungen kann TMAO als ein Molekülfragment angesehen werden, von dem erwiesen ist, dass es innerhalb der Interfacekavität an Hsp70 bindet und dadurch eine potenzielle Ankergruppe für zukünftige Liganden darstellen könnte. Diese Strukturinformation wurde für ein weiteres virtuelles Screening genutzt. Die Suche nach niedermolekularen Verbindungen kommerzieller Anbieter, die über eine TMAO-Substruktur verfügen, wurde mit Hilfe der Online-Suchmaschine *eMolecules* anhand einer TMAO-Substruktursuche durchgeführt. Bei der computergestützten Suche wurden insgesamt 230 Moleküle identifiziert, von denen 23 Moleküle unterschiedlichster struktureller Klassen für nachfolgende Dockingexperimente ausgewählt wurden. Bei der getroffenen Vorauswahl wurde neben dem Vorhandensein bestimmter Strukturmerkmale, wie einer bestimmten Molekülgröße, dem Vorhandensein aromatischer Systeme und einer begrenzten Anzahl an rotierbaren Bindungen, und der Erfüllung spezieller physiko-chemischer Parameter, wie der Erfüllung der Kriterien der von Lipinski postulierten *Rule of five* (siehe Abschnitt III.4.6), besonders auf eine hohe strukturelle Diversität der Verbindungen Wert gelegt. Unter den ausgewählten Molekülen befanden sich interessanterweise N-Oxide diverser bekannter Arzneistoffe, wie z.B. Citalopram N-Oxid, Eletriptan N-Oxid und Doxylamin N-Oxid, sowie weitere bekannte pharmakologisch aktive Substanzen.

Durchführung der Dockingsimulationen und Auswahl von Kandidatenmolekülen für experimentelle Untersuchungen

Im Rahmen dieses virtuellen Screenings wurden zwei verschiedene Ansätze von Dockingsimulationen durchgeführt: ein Dockingverfahren mit der expliziten Vorgabe einer Adressierung der kristallographisch aufgeklärten Bindestelle des TMAO durch die entsprechende Substruktur der Liganden und ein Dockingprozess ohne jegliche Restriktionen. Als Rezeptor wurde die mit 1,9 Å höher aufgelöste bHsc70-Zweidomänenstruktur, die seit Oktober 2013 unter dem Code 4FL9 in der PDB publiziert ist, verwendet. Die Interdomänenkavität wurde als Bindestelle definiert. Die Erstellung der dreidimensionalen Ligandenstrukturen erfolgte für beide Dockingverfahren mit dem Tool *Molecule Builder* des Softwarepakets *MOE*. Die nachfolgenden Energieminimierungsprozesse erfolgten mit dem Softwarepaket *SYBYL 8.0* (siehe Abschnitt III.4.1). Die Dockingberechnungen mit der Vorgabe einer Adressierung der kristallographisch ermittelten TMAO Position innerhalb der Interfacekavität wurden mit dem

etablierten Programm *GOLD* (Version 3.2) durchgeführt (siehe Abschnitt II.4). Das Programm ermöglicht die Definition spezieller Parameter, wodurch der Suchraum während der Dockingsimulation gezielt eingeschränkt werden kann und auf diese Weise die Möglichkeit besteht, bestimmte Informationen in das Docking einfließen zu lassen. Für dieses Dockingverfahren wurde die Methode der *Substructure-based distance constraints* (Substruktur-basierte Distanzbeschränkung) verwendet, was hilfreich ist, wenn die zu analysierenden Verbindungen alle über eine gemeinsame Substruktur verfügen. Durch die Definition dieser Bedingung wird dem Programm vorgegeben, ein Atom der gemeinsamen Substruktur aller Liganden in einem vorab definierten Distanzbereich zu einem vorab definierten Proteinatom der Bindestelle zu platzieren. Für jeden Liganden wurden 10 Bindeposen generiert. Als Scoringfunktion für die Dockingsimulationen wurde GoldScore und als Re-Scoringfunktion ChemScore ausgewählt.

Das nicht-restriktive Dockingverfahren ohne Vorgabe einer Adressierung der exakten TMAO-Bindestelle durch den entsprechenden Ligandenrest wurde mit Hilfe des Dockingprogramms *AutoDock3.0* durchgeführt, wobei analog zu Abschnitt IV.3.1 (Dockingverfahren an dem Interdomäneninterface) entsprechende Affinitätsgitter erzeugt sowie das beschriebene Dockingprotokoll verwendet wurden. Die notwendige Aufbereitung der Liganden erfolgte in Analogie zu der in Abschnitt III.4.1 beschriebenen Vorgehensweise, pro Ligand wurden 50 Dockinglösungen generiert.

Die Dockinglösungen beider Dockingverfahren wurden anschließend zunächst mit Hilfe von *PyMOL* visuell auf Plausibilität geprüft. Die von *AutoDock3.0* generierten Dockinglösungen wurden zusätzlich auf Übereinstimmung der Positionierung der TMAO-Substruktur der jeweiligen Liganden mit der kristallographisch determinierten Position analysiert.

Für die weitere Auswertung wurden ausschließlich Liganden berücksichtigt, deren Bindeposen einen plausiblen und vielversprechenden Bindemodus zeigten. Im Rahmen des nachfolgenden Re-Scoringverfahrens, das für eine möglichst realistische Vorhersage der potenziellen Bindungsaffinität mit *SFCscore* unter Verwendung der *SFC_290m*-Scoringfunktion durchgeführt wurde, wurde von jedem Liganden diejenige Bindepose mit der bestmöglichen Übereinstimmung der TMAO-Substruktur im Vergleich zu der experimentell bestimmten TMAO-Position verwendet.

Bei der Auswahl von Verbindungen, welche als Kandidatenmoleküle für experimentelle Untersuchungen am geeignetsten erschienen, wurden primär Moleküle berücksichtigt, bei denen die Positionierung des TMAO-Ligandenrests der von *AutoDock3.0* berechneten Rang 1-Bindepose mit der kristallographisch ermittelten TMAO-Position übereinstimmte. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da die jeweiligen Bindeposen von *AutoDock3.0* ohne

Zwang in Form vorab definierter Restriktionen als globales Minimum und energetisch günstigste Lösungen gefunden wurden. Aus diesem Grund besitzen diese Dockinglösungen im Vergleich zu den von *GOLD* generierten Bindeposen eine höhere Aussagekraft und die Wahrscheinlichkeit erschien höher, dass diese Moleküle tatsächlich die Zielregion wie berechnet adressieren würden. Die Betrachtung der Güte und Plausibilität der mittels *GOLD* generierten Bindeposen diente als zusätzliche Entscheidungshilfe und machte es in weiterer Folge möglich, einen umfassenderen Eindruck potenzieller Bindemodi sowie potenzieller Enzym-Ligand-Wechselwirkungsprofile zu erhalten.

Nach eingehender Analyse und Berücksichtigung der erhobenen Daten wurden die fünf Verbindungen **TMAOD-1**, **TMAOD-2**, **TMAOD-3**, **TMAOD-4** und **TMAOD-5** (siehe Abb. 47) für nachfolgende experimentelle Untersuchungen von kommerziellen Anbietern bezogen. Für alle fünf Kandidatenmoleküle wurde ein vielversprechender Bindemodus berechnet, in Verbindung mit der Vorhersage konsistent hoher Bindungsaffinitäten im Rahmen des Docking- und Re-Scoringverfahrens (siehe Tab. 19).

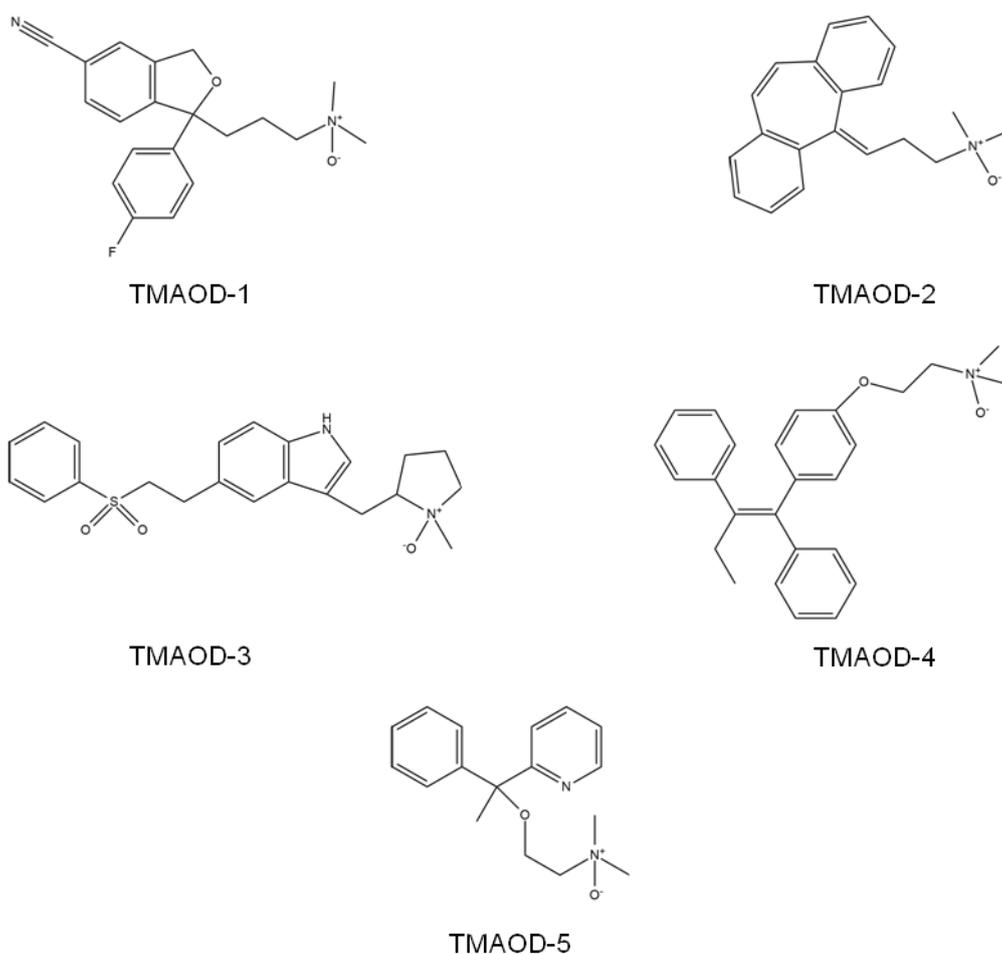


Abb. 47. Strukturformeln der fünf ausgewählten Kandidatenmoleküle.

Ligand	Arzneistoff	ΔG [kcal/mol]	pK_i	M [g/mol]	clogP
TMAOD-1	Citalopram	-7,84	5,94	340	1,2 ³³⁴ , 2,64 ³³⁵
TMAOD-2	Cyclobenzaprin	-9,06	4,66	291	-
TMAOD-3	Eletriptan	-11,60	6,19	399	1,78 ³³⁴ , 2,65 ³³⁵
TMAOD-4	Tamoxifen	-7,42	5,56	388	3,65 ³³⁴ , 5,23 ³³⁵
TMAOD-5	Doxylamin	-6,90	5,23	286	-

Tab. 19. Übersicht über den zugrundeliegenden Arzneistoff des jeweiligen N-Oxids, die von *AutoDock3.0* berechneten Bindungsenthalpien (ΔG), der von *SFCscore* berechneten pK_i -Werte sowie über die physiko-chemischen Kenngrößen molare Masse (M) und des berechneten logarithmischen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (clogP) der für experimentelle Untersuchungen ausgewählten Kandidatenmoleküle.

Ergebnisse und Diskussion

Die berechneten Bindemodi der fünf für experimentelle Untersuchungen bezogenen Kandidatenmoleküle zeichneten sich durchweg durch eine sehr gute morphologische Anpassung an die Interdomänenbindetasche aus, die in einer dichten Bindung resultierte. An dieser Stelle sollen die von *AutoDock3.0* berechneten Bindeposen beschrieben werden.

Die TMAO-Ankergruppe des Liganden **TMAOD-1** adressierte exakt die experimentell aufgeklärte TMAO-Position innerhalb des von Asp152 und Lys524 geformten Bogens der linken Kavitätsseite (siehe Abb. 48). Das Zentrum der Bindetasche wurde optimal durch die beiden Ringsysteme ausgefüllt, während das Stickstoffatom der Nitrilgruppe eine H-Brücke zum Proteinrückgrat von Asn174 ausbildete und der 1,3-Dihydroisobenzofuranrest nahezu parallel zum Arg155 positioniert war, wodurch ein π - π -Stacking ermöglicht wurde.

TMAOD-2 füllte ebenfalls ideal den zentralen Raum der Bindetasche mit dessen trizyklischem Ringsystem aus, das sich direkt unterhalb von Gln520 befand. Durch die nicht planare Konformation des Ringsystems passte sich dieser Rest mit den aus der Ebene seitlich stehenden äußeren Phenylringen optimal der Seitenkette des zentralen Gln520 an, wodurch eine dichte Bindung resultierte. Weiterhin ragte der Ligand tief in die Kavität bis zu der durch Leu210, Phe217 und Val219 gebildeten, überwiegend hydrophoben hinteren Subtasche hinein.

Trotz der Derivatisierung der TMAO-Substruktur von **TMAOD-3** konnte von *AutoDock3.0* die experimentell aufgeklärte Platzierung der TMAO-Substruktur gleich mehrfach gefunden werden. Eine dieser Bindeposen wurde zudem auch als energetisch günstigste Dockinglösung bewertet. Auch der Ligand **TMAOD-3** passte sich sehr gut den Konturen der Bindetasche an und nahm eine Bindepose mit langgestreckter Konformation ein, wodurch der gesamte Raum der Kavität von der linken bis zur rechten Kavitätsseite ausgefüllt wurde.

Eine H-Brücke wurde zwischen der Sulfonylgruppe und dem Asn174 Peptidrückgrat geformt, während zusätzliche H-Brücken prinzipiell durch geringfügige strukturelle, adaptive Seitenkettenrotationen der Bindetaschenamino­säuren zwischen der Sulfonylgruppe des Liganden und Asn174, Thr177 sowie Gln520 hätten resultieren können. Während das Grundgerüst des Liganden tief im Inneren der Bindetasche gebunden war, war dessen Pyrrolrest für die Ausbildung potenzieller H-Brücken Richtung Solvens gerichtet.

Bei der Verbindung **TMAOD-4** handelt es sich um das N-Oxid des bekannten Arzneistoffs Tamoxifen, einem selektiven Estrogenrezeptormodulator zur Therapie von Mamma­karzinomen. Der Ligand adressierte das Zentrum der Interfacekavität und versperrte durch die drei verzweigten Phenylringe, die einen großen Raum beanspruchten, nahezu vollständig die frontale Öffnung der Interfacekavität.

Das Molekül **TMAOD-5** besaß von allen bestellten Kandidatenmolekülen das geringste Molekulargewicht und besetzte aufgrund der vergleichsweise geringeren Größe ausschließlich die linke Hälfte der Bindetasche, wobei die eingenommene Konformation der beiden Ringstrukturen, analog zu **TMAOD-2**, eine sehr gute Anpassung an die Gln520-Seitenkette zeigte, wodurch eine dichte Bindung resultierte.

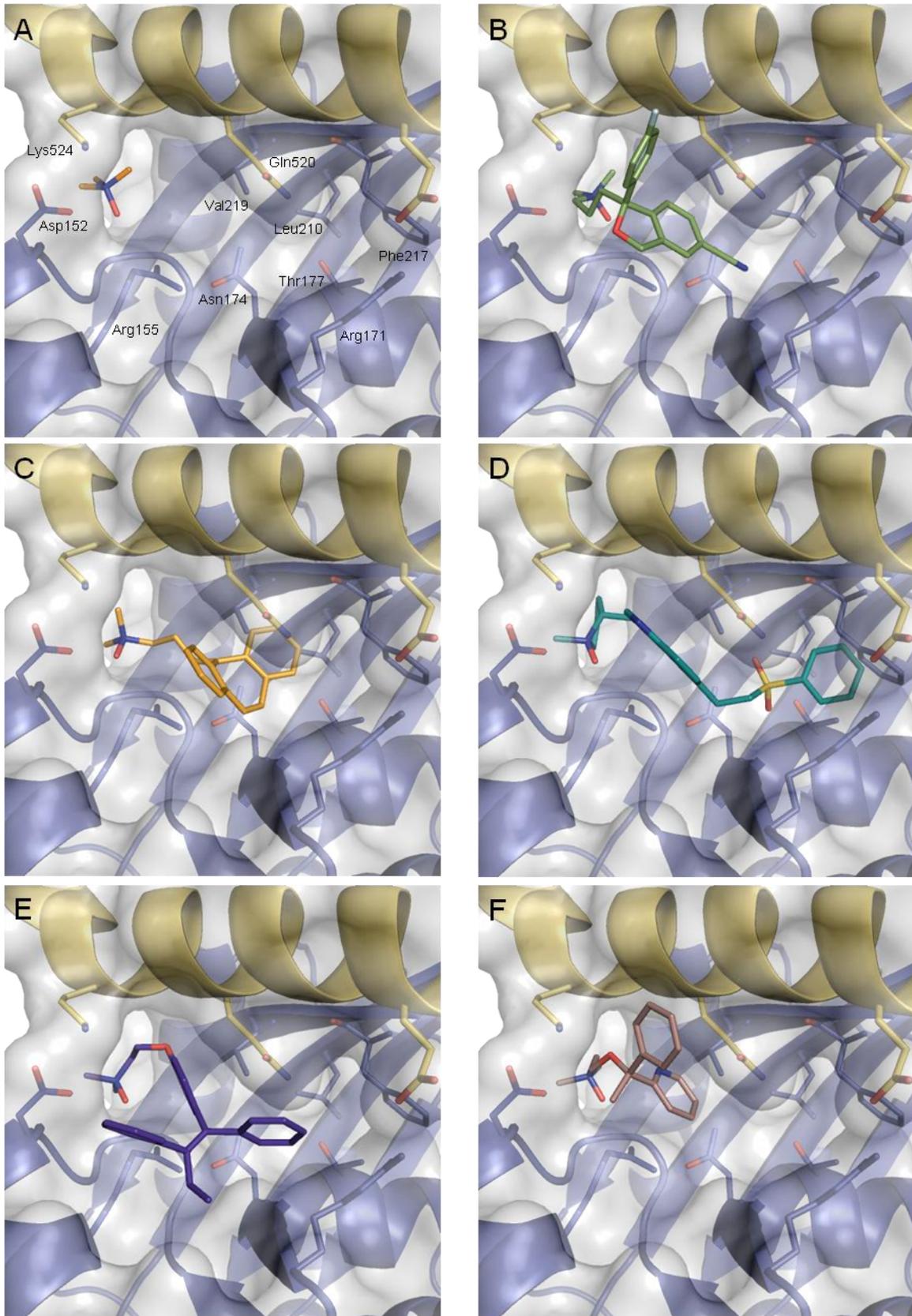


Abb. 48. Darstellung der Interdomänenkavität der aufgeklärten bHsc70-Kristallstruktur (PDB-Code 4FL9) mit dem Lösungsmittelmolekül TMAO (A) sowie mit den Bindeposen der fünf Kandidatenmoleküle TMAOD-1 (B), TMAOD-2 (C), TMAOD-3 (D), TMAOD-4 (E), TMAOD-5 (F).

Experimentelle Untersuchungen

Den Abschluss des virtuellen Screenings bildeten experimentelle Untersuchungen, die von unseren Kooperationspartnern durchgeführt wurden bzw. werden, um die Ergebnisse der zuvor beschriebenen computergestützten Berechnungen zu überprüfen. Das primäre Interesse bestand dabei in der Erbringung des experimentellen Nachweises der Bindung der Liganden an das Hsp70-Interdomäneninterface mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen, um die Hypothese der Eignung dieses Proteinbereichs als eine neue Bindestelle für niedermolekulare Liganden zu verifizieren. Die aufgeklärten Protein-Ligand-Komplexstrukturen hätten weiterhin für eine Überprüfung der Bindeposen und eine erste Ableitung von Protein-Ligand-Wechselwirkungsprofilen genutzt werden können, die wiederum wichtige Informationen für zukünftige Inhibitor-designstudien hätten liefern können.

Die experimentellen Untersuchungen waren allerdings zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Dissertation noch nicht abgeschlossen und sind Bestandteil aktueller Forschungsprojekte, weshalb an dieser Stelle keine abschließenden Ergebnisse präsentiert werden können.

IV.3.3 Erweiterung der Substratbindedomäne einer Hsc70-Zweidomänenstruktur mit Hilfe eines Homologiemodelansatzes

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien an der biologischen Zielstruktur Hsp70 war die Kristallstruktur des bovinen Hsc70 (bHsc70) mit dem PDB-Code 1YUW, als bis dato einzige publizierte Proteinstruktur eines eukaryotischen, funktionell intakten Zweidomänenkonstrukts eines Hsp70-Enzyms, von zentraler Bedeutung (siehe auch Abschnitt IV.1.2). Die von Jiang *et al.*²⁰¹ aufgeklärte bHsc70-Tertiärstruktur, die anstelle der insgesamt 650 nur 554 Aminosäuren (As) umfasst, gliedert sich in NBD (As 1-383), einem exponierten Linkersegment (As 384-394) und SBD (As 395-554). Die fehlenden 96 Aminosäuren sind im nativen Enzym Bestandteil von drei zusammengelagerten C-terminalen α -Helices (α -Helices C-E), wie entsprechende Kristallstrukturen isolierter SBDs belegen.^{196,336} In der Kristallstruktur 1YUW liegt die α -Helix B (As 527-554) teilweise entspiralisiert vor, wobei die Aminosäuren 539-544 durch die Substratbindetasche intramolekular gebunden werden (siehe Abb. 49). Weiterhin unterscheidet sich die aufgeklärte Enzymstruktur von der Struktur des nativen bHsc70 durch zwei, aus kristallographischen Gründen vorgenommenen Mutationen (E213A, D214A), die sich jedoch nicht im Bereich des unmittelbaren Interdomäneninterfaces befinden.

Für die eigene Forschung an der Zielstruktur Hsp70 erschien es sinnvoll und notwendig den Mangel der Kristallstruktur 1YUW in Form der drei fehlenden C-terminalen α -Helices zu korrigieren, um die bHsc70-Tertiärstruktur für computerbasierte Untersuchungen, wie Dockingexperimente und MD Simulationen (siehe Abschnitte IV.3.1 und IV.3.4), der Struktur des nativen Enzyms anzugleichen. Dabei erfolgte zudem eine Korrektur der Enzymstruktur hinsichtlich der artifiziellen, nicht nativen intramolekularen Bindung der teilweise entwundenen α -Helix B durch die Substratbindetasche, wodurch erst die Substratbindetasche für die Dockingsimulationen erschlossen wurde.

Hierfür wurden verschiedene computergestützte Methoden aus dem Bereich des *Molecular Modelling* iterativ angewendet, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf der Erstellung von Homologiemodellen fehlender Proteintertiärstrukturen lag. Unter einem Homologiemodell versteht man in der Bioinformatik ein Modell des räumlichen Aufbaus einer biologischen Struktur, wie z.B. eines Proteins oder eines bestimmten Proteinbereichs, mit bekannter Primärstruktur jedoch unbekannter Tertiärstruktur, das basierend auf einer homologen, bereits experimentell aufgeklärten dreidimensionalen Struktur berechnet wurde.^{4,337,338} Bei der Erstellung von Homologiemodellen wird die Tatsache ausgenutzt, dass sequenziell verwandte Proteine häufig einen vergleichbaren räumlichen Aufbau aufweisen, weshalb eine möglichst hohe Sequenzidentität zwischen Templatstruktur und der zu erstellenden Struktur die Berechnung erleichtert und zugleich die Aussagekraft des Modells erhöht.^{339,340} Die Berechnung von Homologiemodellen, besonders eines Modells der drei α -Helices C-E, war zum damaligen Zeitpunkt notwendig, da die PDB keine verwendbaren Strukturen dieses Proteinbereichs eines bHsp70-Enzyms enthielt. Im Folgenden wird die Vorgehensweise der computerbasierten Erstellung einer nahezu vervollständigten bHsc70-Proteinstruktur beschrieben.

Identifizierung von geeigneten Templatstrukturen für die Erstellung eines Homologiemodells der bHsc70-Oligomerisierungsdomäne

Eine essenzielle Voraussetzung für die Vervollständigung der dreidimensionalen bHsc70-Proteinstruktur 1YUW um die fehlenden C-terminalen α -Helices war die Kenntnis der Sekundärstrukturen sowie des Faltungsmusters dieses Sequenzbereichs, wofür die Strukturinformationen von SBD-Tertiärstrukturen verwendet wurden. Aus diesem Grund wurde im ersten Schritt eine umfangreiche Suche nach entsprechenden bereits publizierten Hsp70-Tertiärstrukturen durchgeführt, um einerseits Proteinstrukturen des fehlenden Segments zu identifizieren und andererseits einen umfassenden Überblick über sämtliche bereits

aufgeklärte dreidimensionale Hsp70-Enzymstrukturen zu erhalten, die als mögliche Templatstrukturen für strukturbasierte Ligandendesignstudien hätten verwendet werden können.

Im Rahmen dieser Suche kamen drei verschiedene Suchstrategien zum Einsatz: Eine Suchanfrage wurde mit Hilfe des Programms *Relibase* (Version 2.2.1) durchgeführt.³⁴¹ Die PDB wurde nach allen Tertiärstrukturen mit einer Hsp70-ähnlichen Primärstruktur durchsucht, wobei als Templat die Aminosäuresequenz der Isoform Hsp70-1a fungierte. Als Anforderungen an die gesuchten Proteinstrukturen wurden eine minimale Sequenzidentität von 40% sowie eine maximale von 100% festgelegt. Weiterhin wurden Stichwortsuchen innerhalb der PDB und zusätzlich eine Literaturrecherche einhergehend mit der Sammlung von PDB-Codes von Hsp70-Kristallstrukturen aus Publikationen durchgeführt. Mit Hilfe der angewandten Suchstrategien konnten im November 2008 insgesamt 45 Proteinstrukturen identifiziert werden (siehe Anhang VI.3). Die ermittelten Kristallstrukturen zeigten die Tertiärstrukturen verschiedener Hsp70-Isoformen und stammten ausschließlich von einem der folgenden fünf Organismen: *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Escherichia coli*, *Rattus norvegicus* und *Caenorhabditis elegans*. Alle Strukturen, mit Ausnahme der bereits beschriebenen bHsc70-Zweidomänenstruktur, repräsentierten entweder die N-terminale Nukleotidbindedomäne (NBD) oder die Substratbindedomäne (SBD) oder bestimmte Sequenzabschnitte einer der beiden Domänen.

Auswahl geeigneter Templatstrukturen für die Erstellung von Homologiemodellen

Im Anschluss an die Identifizierung experimentell aufgeklärter Hsp70-Tertiärstrukturen ging es im zweiten Schritt um die Auswahl einer geeigneten Templatstruktur, die idealerweise im zu modellierenden Proteinabschnitt eine hohe Sequenzidentität gegenüber der bHsc70-Primärstruktur aufweisen sollte. Zu diesem Zweck wurde innerhalb der PDB eine sequenzbasierte Suchanfrage basierend auf der Aminosäuresequenz 525-650 von bHsc70 im FASTA-Format³⁴² mit der Suchmaschine BLAST³⁴³ durchgeführt. Nach eingehender Überprüfung der gefundenen Enzymstrukturen hinsichtlich Sequenzlänge, Sequenzübereinstimmungen mit der Templatsequenz, Güte der Proteinstruktur, Höhe der Auflösung und der Überprüfung des Vorhandenseins von Sequenzlücken (*gaps*) stellte sich schließlich die Kristallstruktur 2P32 als bestes Templat für die Erstellung eines Homologiemodells des fehlenden Enzymsegments heraus. Die Kristallstruktur 2P32 der C-terminalen α -Helices eines Hsp70-Enzyms des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* besteht aus 120 Aminosäuren, die in Form dreier zusammengelagerter α -Helices vorliegen. Für die ausgewählte Kristallstruktur als Templatstruktur sprach eine zufriedenstellend hohe Sequenzidentität von 65%, bezogen auf die gesamten 120 Aminosäuren der Kristallstruktur

sowie von 72% in Bezug auf die für die finale Zweidomänenstruktur letztlich genutzten 76 Aminosäuren des bHsc70-Sequenzbereichs 538-613 und die Abwesenheit von Sequenzlücken in diesem Proteinabschnitt.

Die Erstellung des Homologiemodells anhand der gewählten Templatstruktur 2P32 (Homologiemodell a) erfolgte mit Hilfe des Tools *Homology Model* des Softwarepakets *MOE*³⁴⁴ (Version 2009.10). Aufgrund der zum Teil entspiralisierten α -Helix B der Kristallstruktur 1YUW im Sequenzbereich der Aminosäuren 527-554 und der teilweisen intramolekularen Bindung durch die Substratbindetasche, war es weiterhin notwendig, das entsprechende Proteinsegment aus der ursprünglichen Proteinstruktur zu entfernen sowie in Analogie zu der Vorgehensweise der Berechnung von Homologiemodell a ein Homologiemodell der nativen Helix B des bHsc70 (Homologiemodell b) zu erstellen. Ein Segment dieses Modells diente als Verbindungsstück zwischen der Kristallstruktur 1YUW und Homologiemodell a. Bei Homologiemodell b handelte es sich um ein Modell der bovinen SBD, das auf Basis der Kristallstruktur 1DKZ, einer Tertiärstruktur der DnaK-SBD, erstellt wurde und 219 Aminosäuren des bovinen Sequenzbereichs 391-610 umfasst. In diesem Sequenzbereich existieren drei Sequenzlücken: zwischen 554 und 555 der bovinen SBD-Sequenz liegen in der DnaK-SBD-Sequenz 8 Aminosäuren und zwischen 557 und 558 9 Aminosäuren, während die 6 Aminosäuren des bovinen Sequenzabschnitts 579 bis 584 in der DnaK-Sequenz fehlen. Da diese Sequenzunterschiede jedoch in einem Sequenzabschnitt liegen, der von dem Homologiemodell b für die finale, erweiterte Proteinstruktur nicht benötigt wurde, waren diese Abweichungen nicht von Bedeutung.

Finale Erstellung der erweiterten bHsc70-Zweidomänenstruktur

Im dritten und letzten Schritt erfolgte schließlich in *MOE* der Zusammenbau der finalen erweiterten bHsc70-Zweidomänenstruktur durch die Fusionierung der Kristallstruktur 1YUW mit ausgewählten Struktursegmenten der beiden erstellten Homologiemodelle. Für die Zusammensetzung der einzelnen Proteinstrukturen zu dem finalen Konstrukt wurde zunächst das Homologiemodell b auf die SBD der Kristallstruktur 1YUW und anschließend das Homologiemodell a der drei α -Helices auf das entsprechende Proteinsegment des Homologiemodells b für die benötigte räumliche Anordnung und Ausrichtung der Strukturen zueinander überlagert. Im Anschluss wurden an den zwei Schnittstellen die drei Proteinstrukturen mit Hilfe des in *MOE* integrierten Tools *Molecule Builder* über zwei kovalente Säureamidbindungen miteinander verknüpft, gefolgt von einem mit dem in *MOE* integrierten Tool *GizMOE Minimizer* durchgeführten Minimierungsprozess. Der Minimierungsprozess war auf die Aminosäurenatome der Verknüpfungsstellen begrenzt und diente dazu, die

Geometrien zwischen den Bindungspartnern zu optimieren. Im Rahmen dieses Projekts wurden mehrere auf 613 Aminosäuren erweiterte Enzymstrukturen, bestehend aus der bHsc70-Kristallstruktur, Homologiemodell b als Linkersegment zwischen Kristallstruktur und dem Homologiemodell a der α -helikalen SBD-Subdomäne, nach der beschriebenen Vorgehensweise erstellt. Die einzelnen Gesamtstrukturen unterschieden sich in den jeweiligen Sequenzlängen der drei verwendeten Proteinstrukturen sowie in den jeweiligen Verknüpfungspositionen. Die finale, für die computergestützten Simulationen verwendete bHsc70-Gesamtstruktur bestand letztendlich aus der Kristallstruktur 1YUW (As 1-524), dem Homologiemodell b (As 525-537) und dem Homologiemodell a (As 538-613). Bei der Analyse der verschiedenen erweiterten Proteinstrukturen und Auswahl der Struktur wurden folgende Kriterien berücksichtigt: Abwesenheit oder Vorhandensein von möglichst wenigen sichtbaren Deformationen der Sekundärstrukturelemente, Abwesenheit oder Vorhandensein von möglichst wenigen zu geringen Seitenkettenabständen zwischen der α -helikalen Subdomäne und der β -Faltblattsubdomäne, Vorhandensein möglichst sinnvoller Geometrien an den Schnittstellen zwischen den Struktursegmenten. Die beschriebene finale Proteingestamtstruktur wurde abschließend einem Equilibrierungsprozess in wässriger Lösung unterzogen (siehe Abschnitt IV.3.4.2), um vorhandene strukturelle Spannungen, z.B. aufgrund zu kurzer oder zu langer interatomarer Abstände und bzw. oder ungünstiger Bindungswinkel, aufzulösen. Daraus ergab sich schließlich eine computergestützte Erweiterung der bHsc70-Kristallstruktur 1YUW um 59 Aminosäuren von 554 auf insgesamt 613 Aminosäuren in Form der drei terminalen α -Helices (siehe Abb. 49) zusammen mit der Rekonstruktion einer freien Substratbindetasche für computerbasierte Simulationen (siehe Abschnitte IV.3.1 und IV.3.4). Die erweiterte Enzymstruktur wird in der Arbeit als HM-Hsc70 bezeichnet.

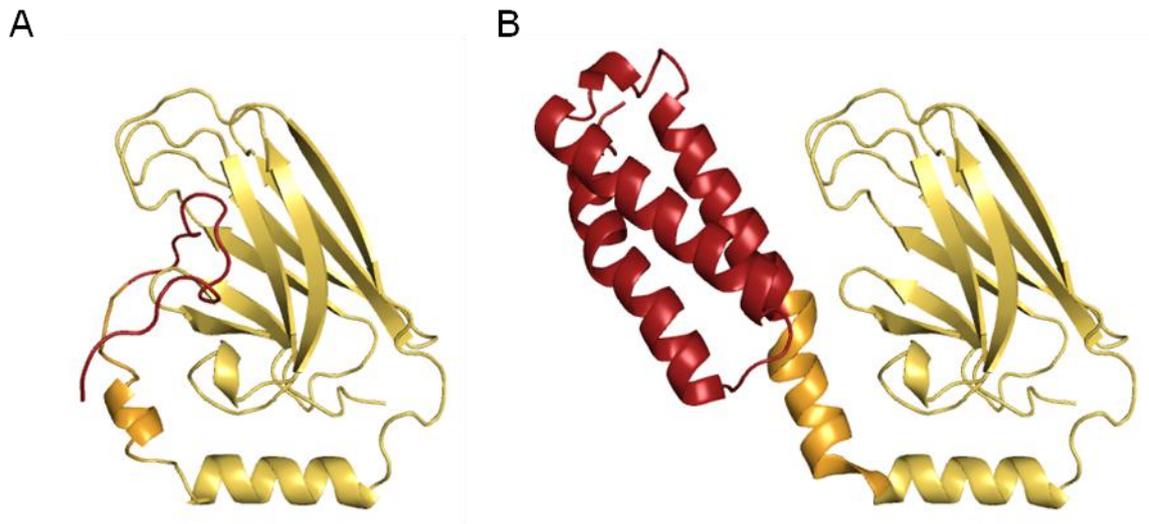


Abb. 49. Darstellung der SBD von bHsc70. **A)** Darstellung der SBD mit intramolekular gebundener α -Helix B (rot) der Kristallstruktur 1YUW. **B)** Darstellung der mit Hilfe von Homologiemodellen erweiterten SBD, wobei die verwendeten Struktursegmente des Homologiemodells a rot und des Homologiemodells b orange eingefärbt sind.

IV.3.4 Molekulardynamische Untersuchungen von Hsp70

IV.3.4.1 Rationale und Zielsetzung

Die Gesamtstruktur von Hsp70 war aus strukturbiochemischer Sicht zum Zeitpunkt der Arbeit lediglich rudimentär erforscht, was sich in einer geringen Anzahl an verfügbaren experimentell aufgeklärten Zweidomänenstrukturen widerspiegelte. Vergleichsweise wenig war auch über intrinsische Proteindynamiken und die jeweiligen Konformationsräume der verschiedenen Hsp70-Isoformen bekannt. Intrinsische Proteinbewegungen führen zu verschiedenen Proteinkonformationen und haben dadurch erhebliche Auswirkungen auf die Entwicklung niedermolekularer Liganden als Proteinmodulatoren im Rahmen des struktur-basierten Wirkstoffdesigns.³⁴⁵⁻³⁴⁷ Aus diesem Grund erschien es neben der Identifizierung und Entwicklung potenzieller Liganden für eine Bindetasche einer gegebenen, experimentell aufgeklärten Proteinkonformation sinnvoll, die Hsp70-Proteinstruktur mit Hilfe von Molekulardynamik (MD) Simulationen computergestützt zu untersuchen.

Die Zielsetzung dieser Studie bestand in der Identifizierung und Charakterisierung der Proteinflexibilität von Hsp70, in Form einer Untersuchung intrinsischer Proteinbewegungen, einhergehend mit einer Analyse des Konformationsraumes. Der Fokus lag dabei auf einer Untersuchung der Stabilität der Proteinkonformation mit aneinander aggregierten Domänen der Kristallstruktur 1YUW sowie der Stabilität der Interdomänenkavität als Zielregion der

zuvor präsentierten Ligandendesignstudien. Darüber hinaus ging es im Rahmen der Studie auch um den Versuch einer Identifizierung charakteristischer Proteinkonformere des generierten Konformationsensembles, die für zukünftige strukturbasierte Wirkstoffdesignprojekte als Templatstrukturen genutzt werden können. Weiterhin erfolgte eine Bestimmung des Flexibilitätsgrads der einzelnen Aminosäuren der untersuchten Hsp70-Isoform, um einen generellen Überblick über bevorzugt variable Bereiche ausgeprägter Flexibilität und vergleichsweise rigider Proteinregionen, speziell im Bereich der Interdomänenschnittstelle zu erhalten.

Hierfür wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit MD Simulationen von verschiedenen Protein- bzw. Protein-Ligand-Strukturen in wässriger Lösung durchgeführt. Bei der untersuchten Zielstruktur handelte es sich um bHsc70-Zweidomänenstrukturen, wodurch die Studie das Spektrum an in der Literatur beschriebenen MD Simulationen von Hsp70 erweiterte, die sich zum Zeitpunkt der Arbeit auf Simulationen einzelner Hsp70-Domänen beschränkten.³⁴⁸

IV.3.4.2 Durchführung der Molekulardynamik Simulationen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden MD Simulationen von zwei verschiedenen Proteinstrukturen und eines Protein-Ligand-Komplexes durchgeführt. Als Ausgangskonfigurationen dienten die jeweiligen Atomkoordinaten der bHsc70-Kristallstruktur 1YUW, der erweiterten bHsc70-Proteinstruktur HM-Hsc70 (siehe Abschnitt IV.3.3) sowie des bHsc70-Apoptozol-Komplexes, wofür die Rang 1-Dockinglösung des Interdomäneninterfacedockings verwendet wurde (siehe Abschnitt IV.3.1).

Alle Parametrisierungsschritte und Simulationen wurden mit der Version 10 des Programmpakets *AMBER*¹⁶⁴ durchgeführt. Für die Parametrisierung der Proteinatome wurde das Parm99SB-Kraftfeld³⁴⁹ aus *AMBER* verwendet. Mit Hilfe des Programms *LEaP* wurden die Enzymstrukturen um fehlende Wasserstoffatome ergänzt. Die Bestimmung der RESP-Ladungen des Liganden Apoptozol erfolgte, indem zunächst mittels der HF/6-31G* Methode in *Gaussian 03*³⁵⁰ elektrostatische Potenziale berechnet und anschließend mit Hilfe von *ANTECHAMBER*³⁵¹ die RESP-Ladungen³⁵² berechnet wurden. Fehlende Kraftfeldparameter des Liganden wurden mit dem Programm *PARMCHK*³⁵¹ passend zum jeweiligen GAFF-Atomtyp³⁵³ bestimmt.

Im Vorfeld der MD Simulationen wurden die untersuchten Strukturen mit *SANDER* über 200 Schritte mit einem *steepest descent* Algorithmus minimiert. Da hierbei noch kein Solvens vorhanden war, wurde ein modifiziertes „Generalized Born“ implizites Solvensmodell³⁵⁴

genutzt. Im Nachgang wurden den minimierten Strukturen bis zur Neutralität Na⁺-Gegenionen hinzugefügt. Danach wurden die aufbereiteten Systeme mit dem Programm *LEaP* mit dem TIP3P Solvensmodell⁷⁹ in einer Box aus mehreren tausend Wassermolekülen solvatisiert, wobei ein Mindestabstand von 8,0 Å zwischen dem Protein und den Kanten der Box gewählt wurde. Über die konkrete Anzahl an jeweils involvierten Wassermolekülen sowie über weitere Informationen zu den untersuchten Systemen gibt Tabelle 20 Auskunft. Im Anschluss an die Solvatisierung wurde ein Equilibrierungsprozess durchgeführt, wobei das System zunächst von 100 K auf 300 K über einen Zeitraum von 20 ps aufgeheizt und danach innerhalb von 5 ps wieder auf 100 K im *NVT*-Ensemble abgekühlt wurde. Bei dem Prozess wurden die Positionen aller Atome des Systems mit Ausnahme der Solvensmoleküle unter Anwendung der „ibelly“ Option fixiert. Im nächsten Schritt wurde das jeweilige Gesamtsystem, bestehend aus Protein bzw. Protein-Ligand-Komplex und Solvens ohne positionslimitierende Kräfte im *NPT*-Ensemble über 25 ps auf 300 K erwärmt. Für die auf diese Weise aufbereiteten Systeme wurden Trajektorien über einen Zeitraum von 10-20 ns berechnet (siehe Tab. 20). Die einzelnen MD Simulationen erfolgten unter periodischen Randbedingungen, einem konstanten Druck (1 atm) und einer konstanter Temperatur (300 K)³⁵⁵, wobei Zeitschritte von 2 fs gewählt wurden. Auf alle Bindungen zu Wasserstoffatomen wurde der SHAKE Algorithmus³⁵⁶ angewandt, während die „Particle Mesh Ewald“ Methode³⁵⁷ für elektrostatische Wechselwirkungen genutzt wurde. Für van der Waals Wechselwirkungen wurde ein Distanzausschlusskriterium von 8.0 Å definiert. Die berechneten Koordinaten der Trajektorien wurden alle 1 ps gespeichert.

Parameter	Hsc70	HM-Hsc70	Hsc70-Az
Simulationszeit	20 ns	15 ns	10 ns
Solvensmoleküle	4 Na ⁺ , 23870 H ₂ O	8 Na ⁺ , 27312 H ₂ O	3 Na ⁺ , 24250 H ₂ O
Gesamtatomanzahl	80215	91531	81424

Tab. 20. Informationen zu den mittels MD Simulationen untersuchten Systemen der Hsc70-Zweidomänenstruktur 1YUW, der HM-Hsc70-Enzymstruktur sowie des Hsc70-Az-Komplexes.

Die nach dieser Vorgehensweise generierten Trajektorien wurden mit dem *AMBER*-Tool *PTRAJ* auf das Protein zentriert, in die ursprüngliche Solvensbox zurück projiziert und einem RMSD-Fit bezüglich der C_α-Atompositionen zu Beginn der Trajektorie unterzogen. Für die Visualisierung der Trajektorien wurde das Programm *VMD*³⁵⁸ verwendet, die Visualisierung ausgewählter Proteinkonformationen erfolgte mit *PyMOL*. Ein wesentlicher Teil der im

Rahmen der Auswertung ermittelten strukturellen Deskriptoren, wie RMSD-Werte sowie bestimmte Atomabstände, wurde mit den *AMBER*-Tools *PTRAJ* und *Carnal* berechnet.

Die präsentierten Ergebnisse beziehen sich auf die jeweiligen, in Tabelle 20 angegebenen Zeiträume der Trajektorien. Die Equilibrierungsphasen blieben bei der Auswertung unberücksichtigt.

IV.3.4.3 Ergebnisse und Diskussion

IV.3.4.3.1 Molekulardynamik Simulation von Hsc70

Im Rahmen der durch *Essential Dynamics*³⁵⁹ unterstützten visuellen Analyse der generierten Trajektorie der Hsc70-Proteinstruktur zeigte sich, dass sich die Proteinkonformation der Kristallstruktur 1YUW mit aneinander aggregierten Domänen unter Ausbildung eines Interdomäneninterfaces über den gesamten Simulationszeitraum von 20 ns weitestgehend stabil verhält, insbesondere unter dem Aspekt, dass es zu keiner Trennung der Domänen voneinander und zu keinem Verlust der Interdomänenschnittstelle kam. Nichtsdestotrotz wies die Trajektorie deutlich darauf hin, dass es sich bei Hsp70 um eine biologische Zielstruktur mit ausgeprägter Proteinflexibilität handelt, die während der Simulation diversen strukturellen Änderungen unterlag, wodurch eine Vielzahl verschiedener Konformationen resultierte. Als ein Maß für die Intensität der strukturellen Änderungen infolge intrinsischer Proteinbewegungen und damit indirekt für die Stabilität der Proteinkonformation der Startstruktur können die RMSD-Werte der C_α-Atome des Enzyms Auskunft geben. Abbildung 50 zeigt, dass das Enzym deutlichen strukturellen Änderungen mit einem durchschnittlichen C_α-RMSD-Wert von $5,49 \pm 2,82 \text{ \AA}$ während der Simulation unterlag. Der RMSD-Mittelwert aller Aminosäurenatome der unmittelbaren Interdomänenkavität beträgt $6,18 \pm 1,88 \text{ \AA}$.

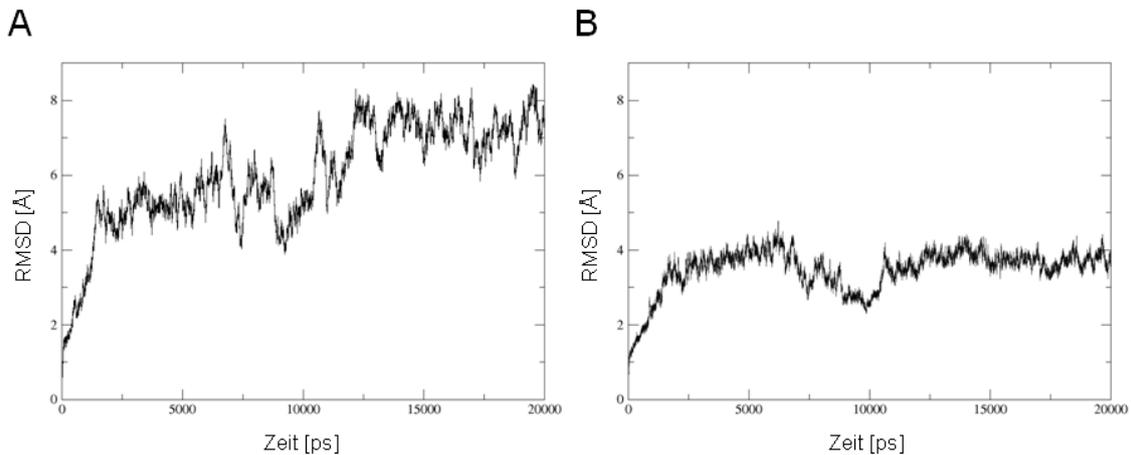


Abb. 50. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der RMSD-Werte aller C_{α} -Atome des Hsc70-Enzyms (**A**) sowie aller Atome der unmittelbaren Interdomänenkavität (**B**) als ein Maß für die Stabilität der Proteinkonformation sowie der Interfacekavität.

Die umfassende Auswertung der Trajektorie der Hsc70-Enzymstruktur zeigte deutlich, dass die Proteinbewegungen, die zu strukturellen Änderungen im Bereich der Interdomänenschnittstelle mit teils erheblichen Auswirkungen auf die Morphologie der Interfacekavität führten, vor allem von der SBD ausgingen, während sich die Aminosäuren der NBD in dem Interfacebereich vergleichsweise stabil verhielten.

Der primäre, übergeordnete Bewegungsablauf der Trajektorie bestand darin, dass sich die β -Faltblattsubdomäne und die α -Helix A der SBD im Verlauf der Simulation von der NBD entfernten und sich das exponierte Linkersegment in Richtung des Loops 187-190 der NBD bewegte. Hierbei konnten jedoch nicht die Bewegungsabläufe der von Jiang *et al.*²⁰¹ postulierten Hypothese beobachtet werden, wonach das Linkersegment, einem allosterischen Mechanismus folgend, während der Katalyse in das Interdomäneninterface eindringt und die Interdomänenschnittstelle zerstört sobald ATP durch die NBD gebunden wird. In der untersuchten Trajektorie konnte ein derartiger Bewegungsablauf und eine Störung des Interdomäneninterfaces nicht beobachtet werden, da sich das Linkersegment einerseits nicht in die Interdomänenregion hinein bewegte, wodurch diese zerstört werden würde, und andererseits auch keine Kopplung der Bewegung der SBD mit jener des exponierten Linkers zu erkennen war. Aufgrund des beschriebenen Bewegungsablaufs kam es zu einer Öffnung der linken Seite der Interdomänenkavität einhergehend mit einem Verlust der Wechselwirkung zwischen Asp152 und Lys524 (siehe Abb. 52). Die β -Faltblattsubdomäne verblieb nach dieser Bewegung auch für die restliche Simulationszeit konstant in dieser „hochgeklappten“ Position, während die α -Helix A unter Ausbildung der Wechselwirkungen zwischen Arg155 und Glu523 auf der linken und Arg171 und Gln520 sowie

Arg171 und Glu516 auf der rechten Kavitätsseite sich vorübergehend der NBD annäherte. Dadurch wurde weitestgehend die bekannte Morphologie der Interfacekavität der Startstruktur für ~700 ps ausgebildet. Allerdings wurde der adressierbare Raum im Zentrum der Kavität im Vergleich zu der 1YUW-Konformation durch die Interdomäneninteraktionen zwischen Arg171 und Glu516 und Arg171 und Gln520 sowie aufgrund der Seitenkettenkonformation des zentralen Gln520 erheblich reduziert, wodurch keine Bindungsmöglichkeit für Liganden im Zentrum der Interfacekavität zur Verfügung stand (siehe Abb. 51). Im Gegensatz zu der vergleichsweise flexiblen linken Kavitätsseite blieb die rechte Seite der Kavität aufgrund der wechselnden Interaktionen zwischen Arg171 und Glu513 sowie zwischen Arg171 und Glu516 weitestgehend stabil. Die letztgenannten Kontakte waren auch dafür mitverantwortlich, dass sich die SBD während der gesamten Simulationszeit nicht weiter oder vollständig von der NBD löste, wie dies in der Enzymkonformation der Kristallstruktur 2KHO beobachtet werden kann (siehe Abb. 30). Weitere temporäre Interdomänenkontakte, die zusätzlich verhinderten, dass sich die SBD vollständig von der NBD entfernte, konnten zwischen Gln520 und Phe217, Gln520 und Glu218 sowie Gln520 und Val219 beobachtet werden.

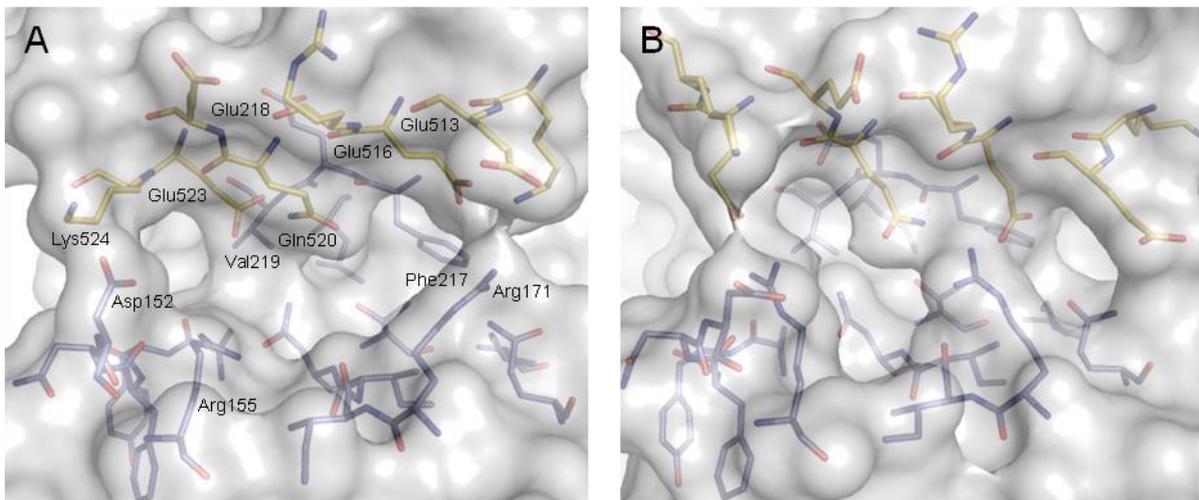


Abb. 51. Vergleich der Interdomänenkavität der 1YUW-Kristallstruktur (A) und der Enzymkonformation zum Zeitpunkt 10000 ps (B).

Die beschriebenen intrinsischen Proteinbewegungen hatten erhebliche strukturelle Auswirkungen auf die Stabilität der Interdomänenkavität, die über die gesamte Simulationszeit äußerst begrenzt war und maßgeblich durch die Bewegungen der SBD beeinflusst wurde. Die Interfacekavität lag im Verlauf der Simulation lediglich für insgesamt ~1900 ps, ungefähr einem Zehntel der Simulationszeit, zu Beginn und nach der Hälfte der Simulation in

den Zeiträumen 0-1200 ps und ~9600-10300 ps, weitestgehend in der Morphologie der Proteinstruktur 1YUW vor. Während der restlichen Simulationszeit war der Kavitätsbereich auf der linken Seite durch das Hochklappen der SBD einseitig geöffnet, wodurch sich der Grad der Solvensexposition erheblich erhöhte und der Kavitätscharakter zu einem Teil verloren ging. Als ein Maß für die durch die Proteinbewegungen bedingten strukturellen Änderungen im Kavitätsbereich, insbesondere bedingt durch die Entfernung der SBD von der NBD, und zur Verfolgung des zeitlichen Verlaufs dieses Bewegungsablaufs diente die Bestimmung der Distanzen zwischen Asp152 und Lys524 auf der linken Kavitätsseite sowie zwischen Arg171 und Glu513 auf der rechten Kavitätsseite in Abbildung 52.

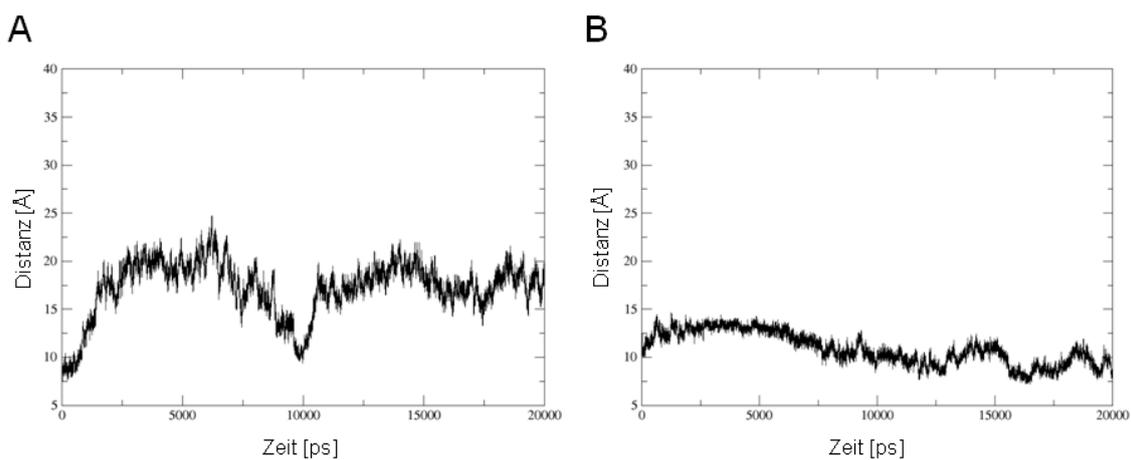


Abb. 52. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Abstände zwischen Asp152 und Lys524 auf der linken Seite der Interdomänenkavität (A) und Arg171 und Glu513 auf der rechten Kavitätsseite (B).

Neben den beschriebenen Bewegungen der SBD konnten ebenso strukturelle Änderungen innerhalb der NBD beobachtet werden, darunter eine Konformationsänderung der NBD mit Auswirkungen auf die Nukleotidbindetasche. Dabei erfolgte ein Übergang der „geöffneten“ Konformation der Startstruktur in die „geschlossene“ Konformation, die vorrangig in NBD-Kristallstrukturen mit gebundenem Nukleotid vorliegt. In Übereinstimmung mit der Publikation von Shida *et al.*³⁶⁰ war zu beobachten, dass die „geöffnete“ Konformation durch die Wechselwirkung zwischen Gly230 der Subdomäne IIb und Ser340 der Subdomäne IIa, während die „geschlossene“ Konformation durch die Interaktion zwischen Lys56 der Subdomäne Ib und Glu268 der Subdomäne IIb stabilisiert wurde. Im Gegensatz zu der Beobachtung der Publikation konnte hier jedoch keine Beteiligung des „Gatekeepers“ Tyr15 bei der Stabilisierung der „geschlossenen“ Konformation beobachtet werden. Die Bezeichnung „Gatekeeper“ resultiert daher, dass Tyr15 je nach Konformation der Seitenkette die Nukleotidbindetasche zu öffnen oder zu verschließen vermag. Eine Distanzbestimmung

zwischen den beiden C_{α} -Atomen von Asp46 und Glu289, die jeweils im Zentrum der beiden äußeren Loops der Ib und IIb NBD-Untereinheiten unterhalb der Nukleotidbindetasche lokalisiert sind, veranschaulichte sehr gut den jeweiligen Öffnungsgrad der Nukleotidbindetasche im Verlauf der Simulation (siehe Abb. 53). Der Abstand der beiden NBD-Subdomänen betrug zwischen den besagten Atomen für die „geschlossene“ Konformation der Kristallstruktur 1KAX 27,64 Å und 34,15 Å für die „geöffnete“ Konformation der Kristallstruktur 1YUW.

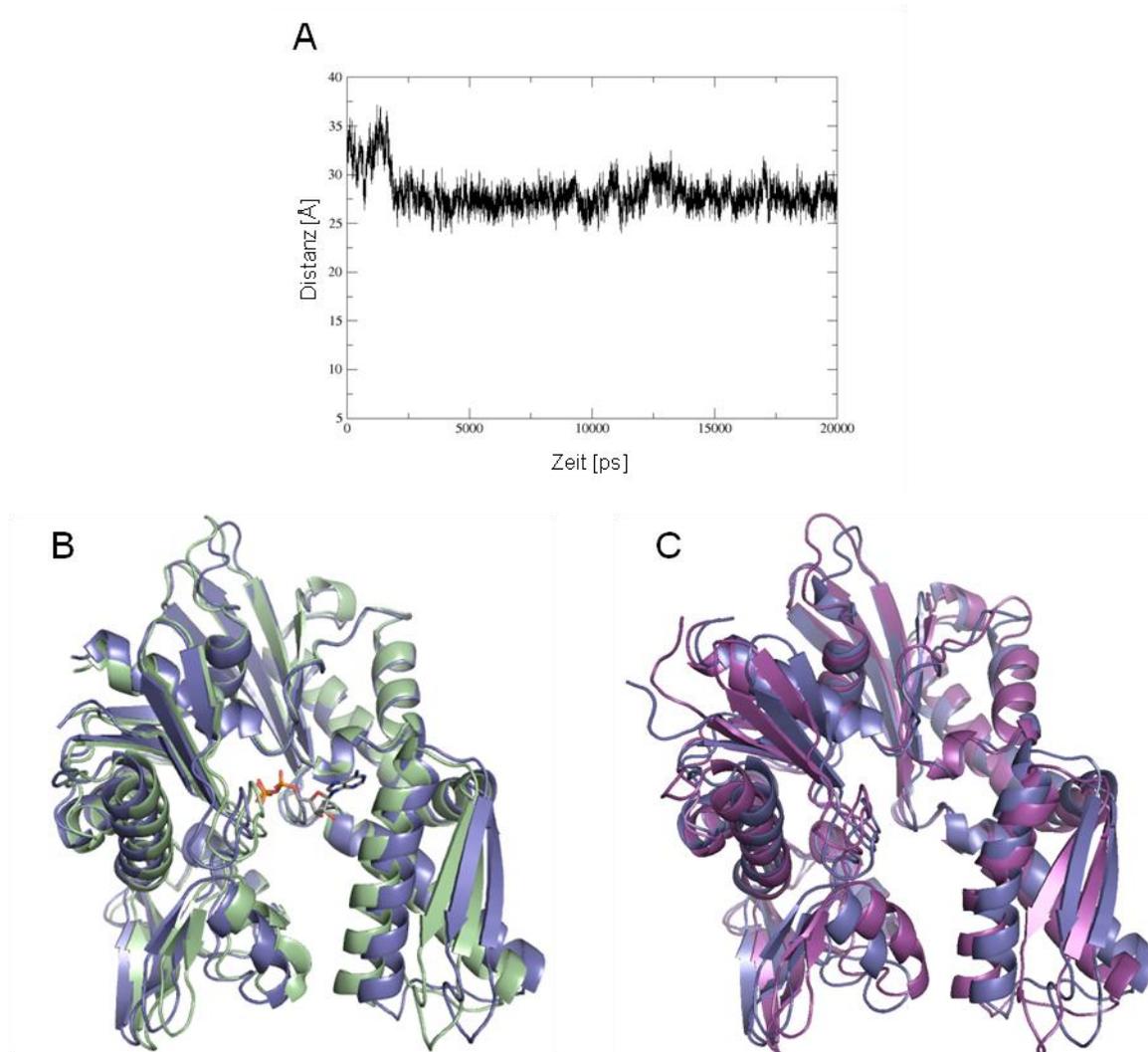


Abb. 53. A) Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Abstände zwischen Asp46 und Glu289 der NBD-Subdomänen Ib und IIb für eine Visualisierung des Öffnungsgrads zwischen den beiden Subdomänen. B) Vergleich der NBD von 1YUW (blau, offene Konformation) und 1KAX (grün, geschlossene Konformation). C) Vergleich zwischen zwei NBD Snapshots der Hsc70 MD Simulation, die die offene (blau, Startstruktur) und geschlossene (violett, Zeitpunkt 4250 ps) Konformation der NBD zeigen. Die Auswahl der Snapshots erfolgte anhand des Distanzdiagramms (A).

Weiterhin konnte eine Kettenreaktion struktureller Änderungen mit Einfluss auf die Konformation der NBD beobachtet werden: Auf der einen Seite der Nukleotidbindestelle verschob sich die α -Helix Gly230-His249 gegen den benachbarten Loop Gly201-Phe205, der wiederum den Loop Gly12-Tyr15 auf der gegenüberliegenden Seite der Bindetasche verschob (siehe Abb. 54). Diese strukturellen Veränderungen hatten direkte Auswirkungen auf die ATP-Bindestelle, da Aminosäuren beteiligt waren, die sowohl bei der Stabilisierung beider Konformationen der Nukleotidbindetasche involviert sind als auch die Position des „Gatekeepers“ Tyr15 beeinflussen. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass es sich bei der Konformationsänderung von der „offenen“ in die „geschlossene“ Konformation um eine intrinsische Proteinbewegung handelt, die nicht zwangsläufig durch einen Liganden induziert werden muss, sondern auch ohne einen derartigen Stimulus ablaufen kann.

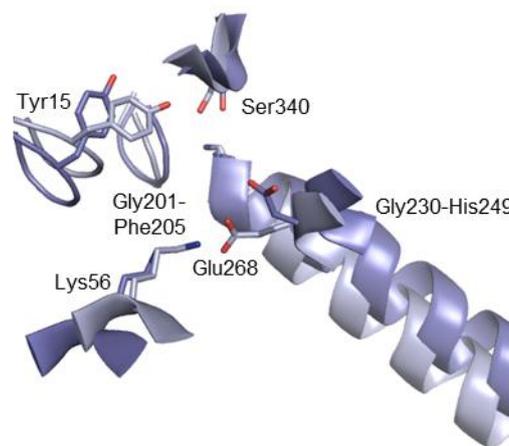


Abb. 54. Darstellung ausgewählter Aminosäuren der NBD-Subdomänen Ia, Ib und IIb der Kristallstruktur 1YUW (blau) und der MD-Konformation zum Zeitpunkt 2500 ps (hellblau).

Neben der Analyse übergeordneter Bewegungsabläufe wurde der Flexibilitätsgrad aller Aminosäuren des Proteins untersucht, wobei die Aminosäuren der unmittelbaren Interfacekavität besonders im Fokus standen (siehe Abb. 55). Die Bestimmung der RMSD-Werte jeder Aminosäure, gemittelt über die Trajektorie erfolgte mit Hilfe des Tools *Carnal* des Softwarepakets *AMBER*. Die ermittelten RMSD-Werte aller 554 Aminosäuren umfassten einen Bereich von 1,50-16,02 bzw. 21,41 Å (siehe Anhang VI.6.1), wobei die mit Abstand höchste Abweichung mit einem RMSD-Wert von 21,41 Å einen „Ausreißer“ darstellte und für die endständige Aminosäure Glu554 bestimmt wurde. Die höchsten RMSD-Werte entfielen nahezu vollständig auf Aminosäuren der SBD sowie des exponierten Linkersegments. Die Aminosäuren der SBD, die die größten Abweichungen zeigten, waren in den beiden äußeren, die Substratbindetasche flankierenden Loops, Loop_{3,4} (As 428-433) und Loop_{5,6}

(As 462-472) sowie in dem Loopsegment Val491-Lys497 und innerhalb der C-terminalen entspiralisierten α -Helix B lokalisiert. Mit Glu523 und Lys524 zählen auch zwei Reste der unmittelbaren Interfacekavität zu den hochflexiblen Aminosäuren des Enzyms.

Die Aminosäuren der NBD wiesen im Vergleich zu denen der SBD durchschnittlich deutlich geringere strukturelle Abweichungen auf, was anhand eines RMSD-Mittelwerts von 4,81 Å für alle NBD-Aminosäuren gegenüber einem Wert von 7,74 Å für die Aminosäuren der SBD deutlich wird. Anhand dieser Daten werden die zuvor beschriebenen Beobachtungen einer dynamischen SBD als treibende Kraft für übergeordnete, die Interdomänenregion betreffende Konformationsänderungen sowie einer vergleichsweise stabilen NBD gestützt und mit Daten belegt. Die Aminosäuren der unmittelbaren Interfacekavität umfassten gemittelte RMSD-Werte von 4,02-11,67 Å und zeigten dieselbe Tendenz einer Zweiteilung in einen vergleichsweise stabilen Bereich aus NBD-Aminosäuren mit einem gemittelten RMSD-Wert von 5,13 Å und ein flexibleres SBD-Segment mit einem RMSD-Mittelwert von 8,54 Å. Auf der Grundlage dieser Untersuchung lässt sich die Interdomänenkavität näherungsweise in eine vergleichsweise rigide untere Hälfte aus NBD-Aminosäuren und in eine vergleichsweise flexible Hälfte, bestehend aus Aminosäuren der α -Helix A sowie den NBD-Aminosäuren der Subtasche Leu210, Phe217 und Val219 unterteilen. Darüber hinaus zeigten die Aminosäuren der linken Kavitätsseite eine stärker ausgeprägte Variabilität als diejenigen der rechten Seite. Insgesamt entfielen auf die Aminosäuren der Interdomänenkavität überwiegend moderate RMSD-Mittelwerte. Eine Ausnahme hiervon stellten lediglich die beiden Aminosäuren Glu523 und Lys524 dar, die große strukturelle Abweichungen zeigten. Ein Vergleich der gemittelten RMSD-Werte, die für alle Aminosäurenatome und ausschließlich für die C_{α} -Atome bestimmt wurden, zeigten, dass die strukturellen Änderungen nicht auf die Seitenketten beschränkt, sondern Teil übergeordneter Proteinbewegungen waren (siehe Abb. 55).

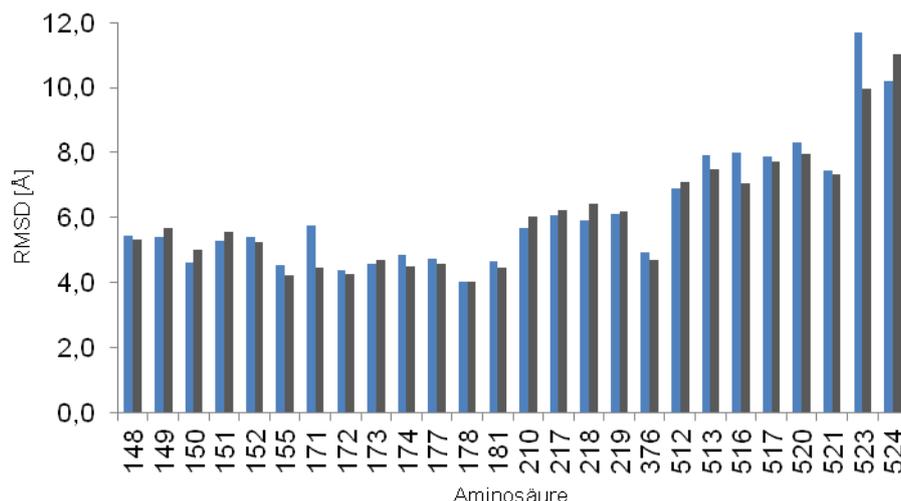


Abb. 55. Balkendiagramm der RMSD-Mittelwerte jeder Aminosäure der unmittelbaren Interdomänenkavität. Darstellung der RMSD-Mittelwerte berechnet für alle Aminosäurenatome (blau) sowie für die C_α-Atome (schwarz).

Für eine Untersuchung des Konformationsraumes des Hsc70-Zweidomänenkonstrukts, insbesondere für die Identifizierung verschiedener charakteristischer Proteinkonformere mit unterschiedlichen Morphologien der Interdomänenkavität wurde mit dem *PTRAJ*-Modul von *AMBER* ein 2D-RMSD Plot auf Basis der Aminosäuren der unmittelbaren Interfacekavität (siehe Abschnitt IV.1.2) generiert. Die Berechnung des 2D-RMSD Plots erfolgte anhand jedes zwanzigsten Frames der Trajektorie, entsprechend einem Zeitintervall von 20 ps. Nach vorheriger Projektion der extrahierten Proteinstrukturen auf die Startstruktur wurden die RMSD-Werte zwischen allen Bindestellenatomen der unmittelbaren Interdomänenkavität der 1000 Snapshotpaare berechnet. Die Erstellung des resultierenden Diagramms erfolgte mit Hilfe von *PlotMTV*.

Der 2D-RMSD Plot (siehe Abb. 56) beinhaltet RMS Abweichungen von bis zu 4,91 Å. Auf den ersten Blick sind zwei große Cluster zu erkennen, von denen das größere Cluster nahezu die gesamte zweite Simulationshälfte abdeckt. Zudem sind zwei weitere Cluster zu Beginn der Simulation und ein Cluster zwischen den beiden Hauptclustern zu erkennen. Die Proteinstrukturen des ersten Clusters zu Beginn der Trajektorie unterscheiden sich erwartungsgemäß lediglich geringfügig von der Konformation der Startstruktur, während sich die Proteinkonformere der beiden Hauptcluster jeweils deutlich von der Startstruktur unterscheiden, untereinander jedoch Gemeinsamkeiten teilen. Das Cluster zur Hälfte der Simulation (9600-10300 ps) ähnelt wiederum der Startstruktur und unterscheidet sich deutlich von den beiden Hauptclustern. Für weitere Untersuchungen wurden repräsentative Proteinkonformere der verschiedenen Cluster und Subcluster ausgewählt. Nach einer

eingehenden visuellen Inspektion der einzelnen Cluster und Subcluster des 2D-RMSD Plots wurden die folgenden 12 Proteinkonformere ausgewählt: Frame 400, 1200, 2200, 5000, 7400, 8000, 9300, 10000, 12900, 14600, 17000 und 19700 ps.

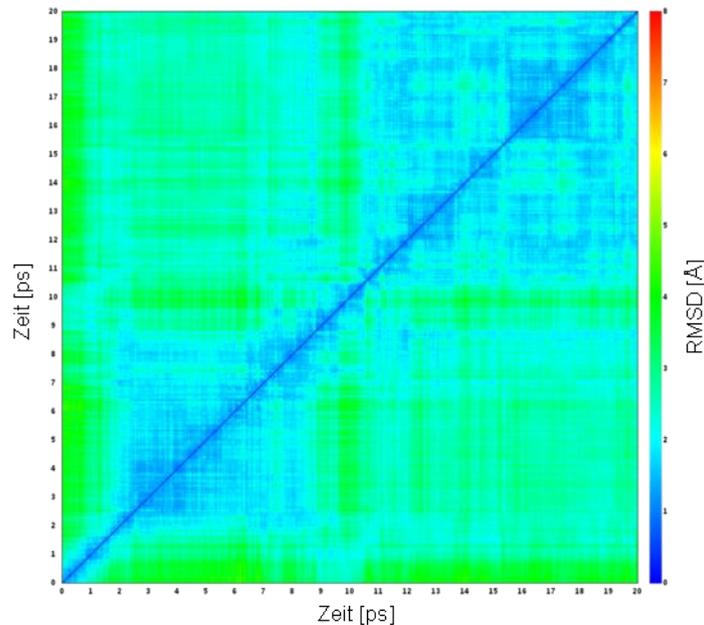


Abb. 56. 2D-RMSD Plot der 20 ns Simulation der Hsc70-Enzymstruktur, berechnet für alle Aminosäurenatome der unmittelbaren Interdomänenkavität mit einem Zeitintervall von 20 ps. Jedes Quadrat des Plots gibt Auskunft über den RMSD-Wert zwischen zwei Snapshotpaaren, der durch einen Farbcode am rechten Rand dargestellt wird. Die größte Abweichung betrug 4,91 Å.

Bei der visuellen Analyse der ausgewählten Frames fiel zunächst auf, dass die einzelnen Sekundärstrukturelemente während der Simulation auffallend stabil blieben und innerhalb der einzelnen Cluster sehr gut überlagerten. Die strukturellen Änderungen, die innerhalb der einzelnen Cluster und Subcluster in morphologischen Unterschieden resultierten, sind primär auf strukturelle Unterschiede hinsichtlich der Seitenkettenkonformationen zurückzuführen. Da sich die Enzymkonformationen des ersten Clusters zu Simulationsbeginn, wie bereits erwähnt, nur geringfügig und nicht charakteristisch von der Startkonformation unterscheiden soll die folgende Diskussion auf die Konformationen der drei weiteren Cluster gerichtet sein. Als representative Proteinkonformationen dieser Cluster können Frame 5000 ps, 9300 ps und 14600 ps dienen (siehe Abb. 57), die möglicherweise als Templatstrukturen für zukünftige Wirkstoffdesignprojekte genutzt werden können.

Bei der Proteinkonformation des Frame 5000 ps ist der Kavitätscharakter der potenziellen Bindetasche des Interdomäneninterfaces durch die Entfernung der SBD von der NBD nahezu vollständig aufgehoben, wodurch dieser Proteinbereich sehr solvensexponiert ist. Die Interdomänenregion liegt in Form einer vergrabenen Furche vor, die als Bindestelle für

andere, deutlich größere als die in Abschnitt IV.3.2 identifizierte Ligandenklassen dienen kann. Für eine mögliche Steigerung der Selektivität von zukünftigen Liganden hinsichtlich dieser Zielregion steht die hintere Subtasche, die durch Leu210, Phe217 und Val219 geformt wird, für eine Adressierung durch hydrophobe Ligandenreste zur Verfügung.

Durch ein Herunterklappen der SBD in Richtung der NBD und durch die damit einhergehende Annäherung der α -Helix A an die NBD wird die Interfacekavität der Startstruktur in der Proteinkonformation 9300 ps wieder weitestgehend ausgebildet, und im Gegensatz zu Frame 10000 ps wird der zentrale Kavitätsbereich und Kavitätseingang nicht durch die Seitenketten von Gln520 und Arg171 besetzt und versperrt, sondern steht für die Bindung von niedermolekularen Liganden zur Verfügung. Die Konformation der Seitenkette von Gln520 fördert in Frame 9300 ps im Vergleich zu der Startstruktur den Kavitätscharakter der Bindestasche ohne dabei den frontalen Eingang zu versperren. Die rechte Seite der Kavität wird durch Interaktionen zwischen Arg171 und Glu513 sowie Glu516 stabilisiert, während auf der linken Kavitätsseite keine Interdomäneninteraktionen ausgebildet werden.

Innerhalb der Interdomänenregion von Frame 14600 ps ist ebenso wie bei Frame 5000 ps, aufgrund der erneuten linksseitigen Entfernung der SBD von der NBD keine Kavität mehr vorhanden. Ebenfalls bildet die Interdomänenschnittstelle dieser Proteinkonformation eine Furche aus, die jedoch im Gegensatz zu der des Frames 5000 ps deutlich vergrabener ist. Ein weiterer Unterschied zu der 5000 ps-Konformation besteht darin, dass die Furche bei Frame 14600 ps durch den über die Konformationen des vierten Clusters stabilen Kontakts zwischen Arg171 und Glu513, der aufgrund eines Shifts der α -Helix A im Zentrum der ursprünglichen Interfacekavität lokalisiert ist, vom Solvens abgeschirmt wird.

Die generierten und mittels 2D-RMSD Analyse identifizierte Proteinkonformere erweitern das Spektrum der zum Zeitpunkt der Arbeit bekannten Hsp70-Proteinkonformationen erheblich und zeigen mögliche Enzymkonformationen mit alternativen Morphologien des Interdomäneninterfaces, die als Templatstrukturen für zukünftige strukturbasierte Wirkstoffdesignstudien dienen könnten.

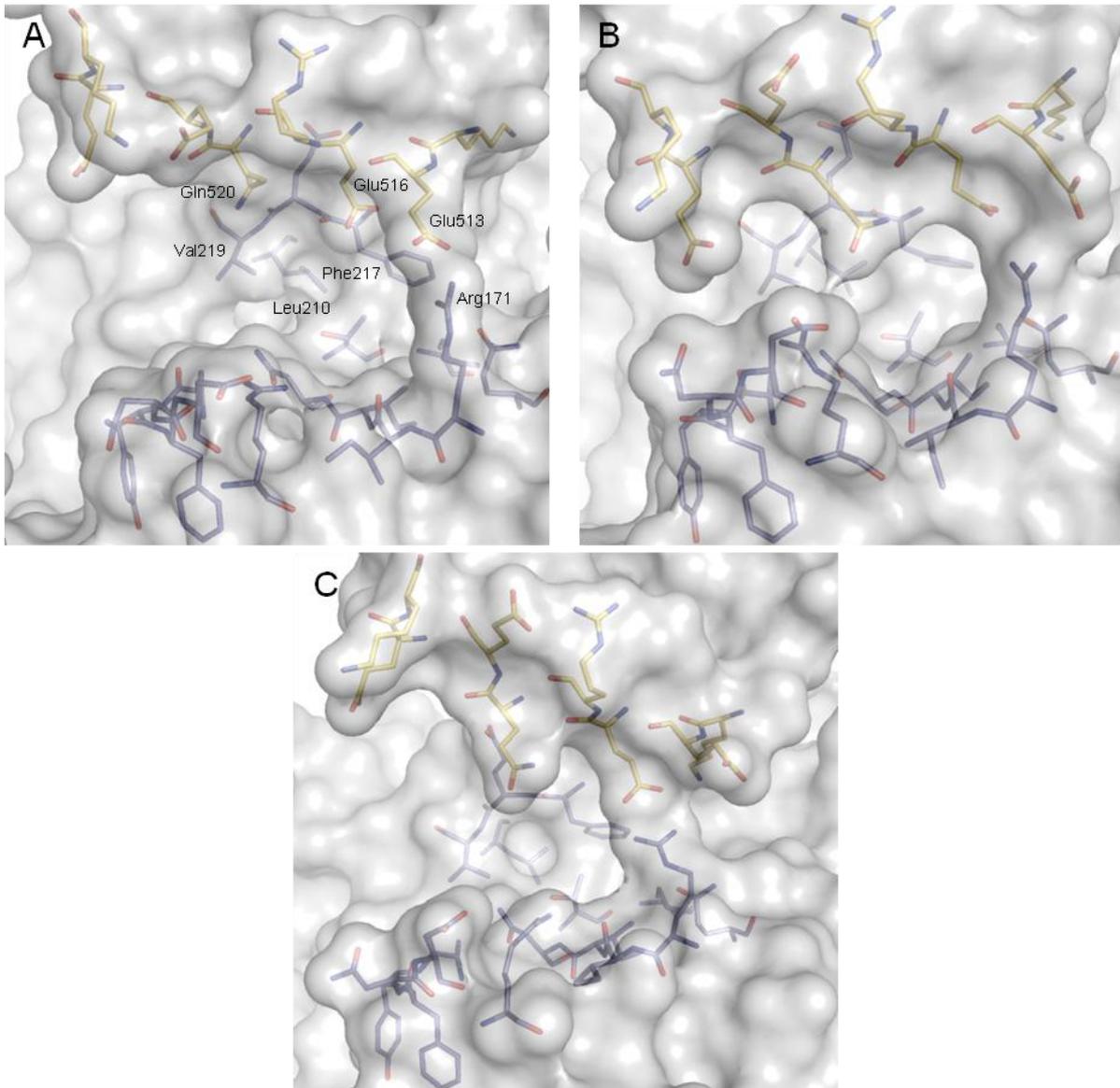


Abb. 57. Darstellung des Proteinbereichs der ursprünglichen Interdomänenkavität drei verschiedener Enzymkonformere zu den Zeitpunkten 5000 ps (**A**), 9300 ps (**B**) und 14600 ps (**C**).

IV.3.4.3.2 Molekulardynamik Simulation von HM-Hsc70

Die MD Simulation der um die C-terminalen α -Helices erweiterten Hsc70-Proteinstruktur HM-Hsc70 lieferte weitere interessante Informationen über die Stabilität einer Hsp70-Konformation mit aneinander aggregierten Domänen und des Interdomäneninterfaces. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Simulation wies diese Trajektorie trotz eines im Vergleich geringeren durchschnittlichen C_{α} -RMSD-Werts von $3,67 \pm 1,65 \text{ \AA}$ auf eine begrenzte Stabilität der Proteinkonformation mit aneinander aggregierten Domänen sowie des Interdomäneninterfaces hin (siehe Abb. 58). Der RMSD-Mittelwert aller Aminosäuren-

atome der unmittelbaren Interdomänenkavität ist mit $3,45 \pm 1,15 \text{ \AA}$ ebenfalls niedriger als bei der vorherigen MD.

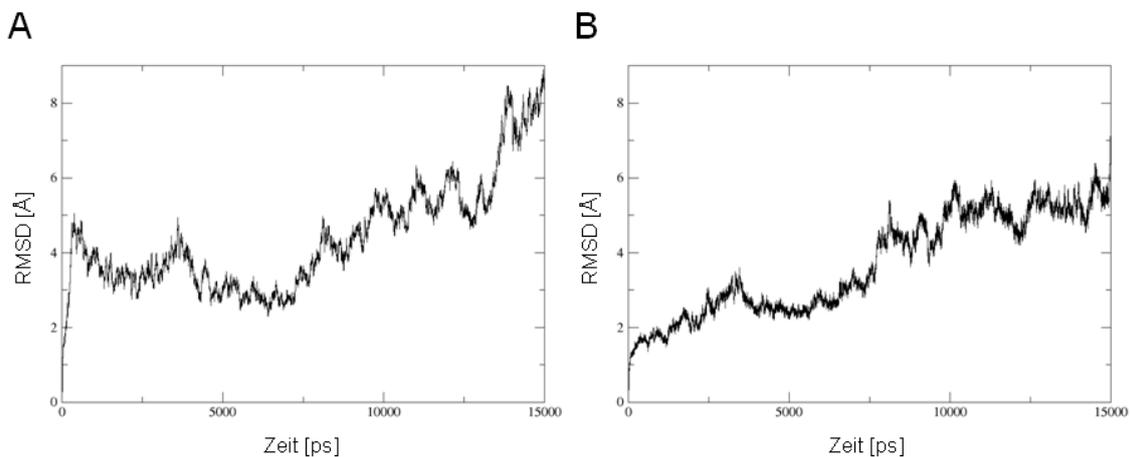


Abb. 58. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der RMSD-Werte aller C_{α} -Atome der HM-Hsc70-Enzymstruktur (**A**) sowie aller Atome der unmittelbaren Interdomänenkavität (**B**).

Der primäre übergeordnete Bewegungsablauf der Trajektorie bestand in einem deutlichen Shift der SBD in entgegengesetzter Richtung zur NBD. Die resultierende Entfernung der beiden Domänen voneinander konnte durch die aufeinander folgenden Verluste der Interdomänenkontakte zwischen Ala214 und Lys512, Glu218 und Arg416 sowie Glu218 und Lys415 nicht verhindert werden, so dass es im Zeitraum von 7800-14000 ps zu einer Trennung der beiden Domänen voneinander kam und zu einem Verlust der Interfacekavität führte. Dieser Bewegungsablauf könnte möglicherweise den Übergang von der Proteinkonformation der Kristallstruktur 1YUW mit aneinander aggregierten Domänen zu der Enzymkonformation der Kristallstruktur 2KHO mit getrennten Domänen darstellen.

Die in der zuvor beschriebenen Simulation im Vergleich zur rechten Kavitätsseite deutlich flexiblere und instabilere linke Seite der Interfacekavität verhielt sich bei dieser Trajektorie interessanterweise aufgrund der wechselnden Interdomäneninteraktionen zwischen Asp152 und Lys524 und Arg155 und Glu523 bis zu der Trennung der beiden Domänen stabiler als die rechte Seite der Interfacekavität (siehe Abb. 59). Diese im Vergleich zur vorherigen Trajektorie konträre Beobachtung relativierte die Beobachtungen einer vergleichsweise flexiblen linken und rigiden rechten Kavitätsseite und zeigte die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um verbindlichere Aussagen hinsichtlich der Stabilität und Flexibilität bestimmter Hsp70-Proteinregionen formulieren zu können.

Die beobachtete Trennung der beiden Domänen unter Auflösung des Interdomäneninterfaces erfolgte absolut unabhängig von den Bewegungen des Linkersegments, das sich

zu keiner Zeit in Richtung der Interdomänenschnittstelle bewegte und an diesem Prozess nicht beteiligt war.

Die Beobachtung der Bewegungen der NBD ergab, dass auch innerhalb dieser Trajektorie ein Übergang von der „offenen“ zu der „geschlossenen“ NBD-Konformation stattfand. Eine Stabilisierung der „geschlossenen“ Konformation erfolgte ebenfalls, wie in der vorherigen Hsc70-MD Simulation, durch die Wechselwirkung zwischen Lys56 und Glu268.

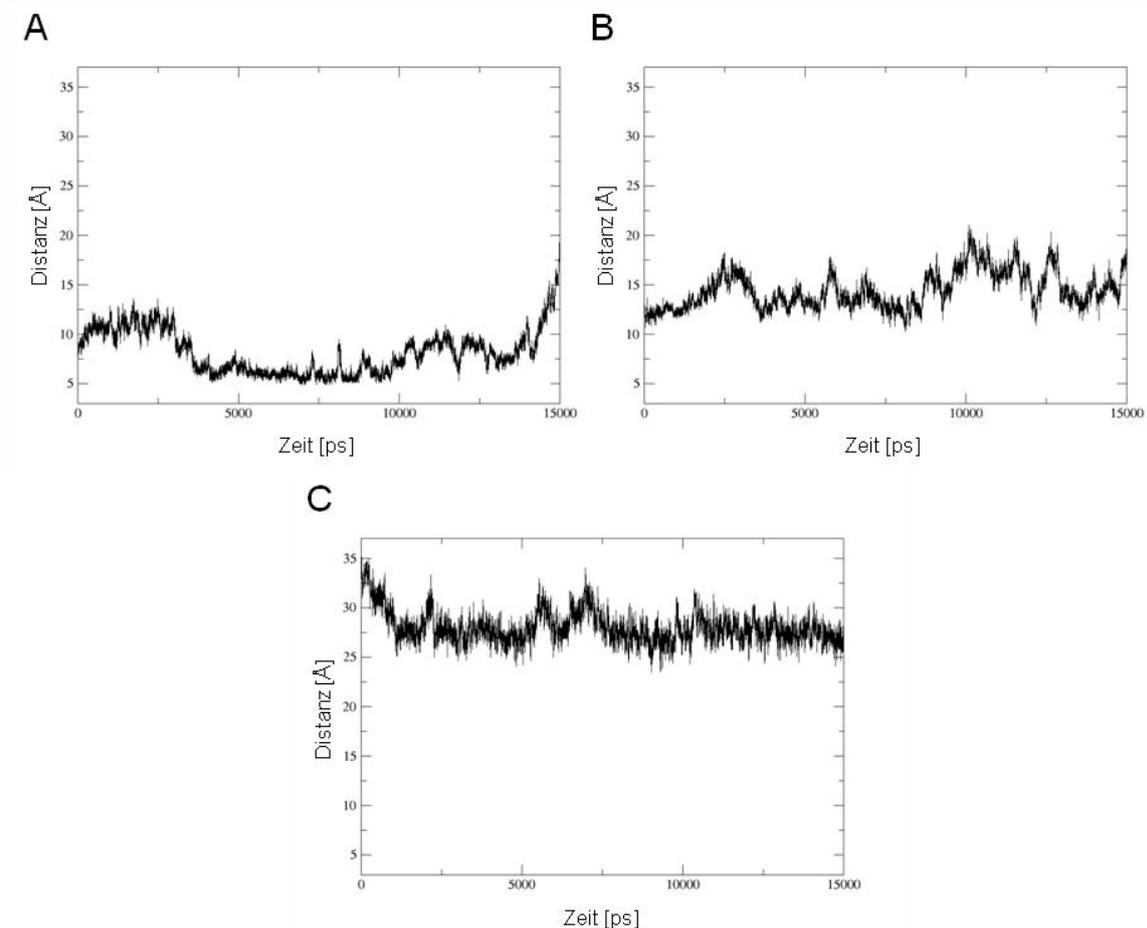


Abb. 59. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Abstände zwischen Asp152 und Lys524 der linken Seite der Interdomänenkavität (**A**), zwischen Arg171 und Glu513 der rechten Kavitätsseite (**B**) sowie zwischen Asp46 und Glu289 der beiden NBD-Subdomänen Ib und IIb.

Die relativ geringen Zeitspannen der MD Simulationen machen eine Beobachtung größerer, übergeordneter struktureller Änderungen, die für gewöhnlich über einige Mikrosekunden dauern, nahezu unmöglich. Nichtsdestotrotz lieferte diese Trajektorie erste Hinweise über einen potenziellen zeitlichen Ablauf einer Trennung der beiden aneinander aggregierten Domänen und zeigte möglicherweise den Übergang zu einer Hsp70-Konformation mit getrennten Domänen, die zum Zeitpunkt der Arbeit durch die Kristallstruktur 2KOH

repräsentiert wurde. Beide Proteinkonformationen sind Teil des in Abschnitt IV.1.3 postulierten katalytischen Mechanismus und konnten bereits durch Kristallstrukturen experimentell nachgewiesen werden, wodurch die Aussagekraft dieser Beobachtungen der zugrundeliegenden MD Simulation nochmals erhöht wird.

Aufgrund der Domäentrennung, einhergehend mit der Auflösung des Interdomäneninterfaces zu Beginn der zweiten Hälfte der Trajektorie und der daraus resultierenden deutlichen strukturellen Unterschiede zwischen den ab diesem Zeitpunkt resultierenden Konformationen und den Enzymkonformationen der vorherigen MD Simulation, lassen sich die für die Aminosäuren ermittelten strukturellen Abweichungen nur begrenzt miteinander vergleichen. Die Bestimmung der RMSD-Werte jeder Aminosäure, gemittelt über die Trajektorie erfolgte mit Hilfe des Tools *Carnal* des Softwarepakets *AMBER*. Die RMSD-Werte aller 613 Aminosäuren umfassten einen Bereich von 1,24-12,10 Å (siehe Anhang VI.6.2) und waren damit überraschenderweise, trotz der durch die Domäentrennung bedingten zunehmenden Freiheitsgrade der Aminosäuren der ursprünglichen Interdomänenregion, geringer als die der vorherigen MD Simulation. Darüber hinaus waren jedoch auch hier die beschriebenen Tendenzen hinsichtlich einer größeren strukturellen Variabilität der SBD-Aminosäuren mit einem RMSD-Mittelwert von 4,82 Å gegenüber 3,48 Å bezogen auf die Aminosäuren der NBD deutlich erkennbar. Für die Aminosäuren, die in der Kristallstruktur 1YUW sowie in der Startstruktur die unmittelbare Interdomänenkavität formen, liegen die RMSD-Mittelwerte bei 4,71 Å und 2,90 Å bezogen auf die Aminosäuren der SBD und der NBD (siehe Abb. 60).

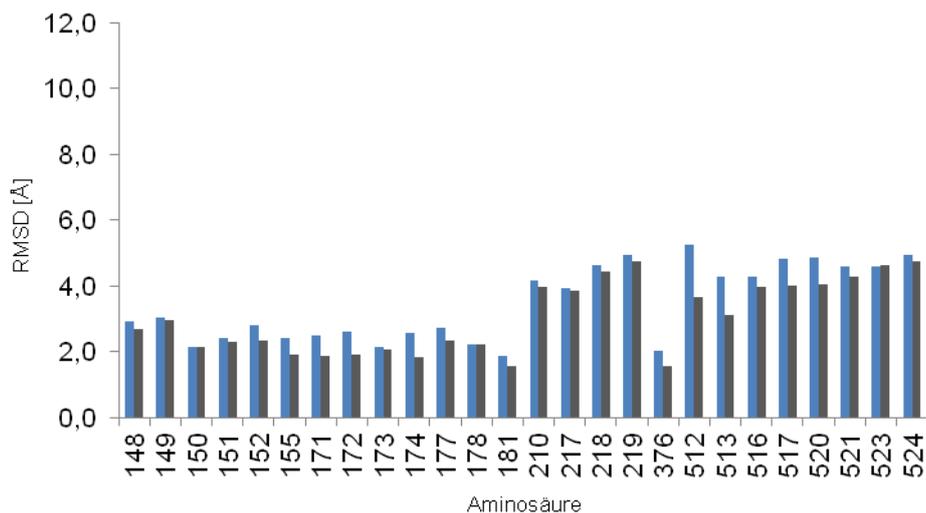


Abb. 60. Balkendiagramm der RMSD-Mittelwerte jeder Aminosäure der unmittelbaren Interdomänenkavität. Darstellung der RMSD-Mittelwerte berechnet für alle Aminosäureatome (blau) sowie für die C_α-Atome (schwarz).

Ein entsprechend zu dem zuvor beschriebenen Verfahren mittels *PTRAJ* und *PlotMTV* generierter 2D-RMSD Plot mit einer maximalen strukturellen Abweichung von 7,41 Å zwischen den einzelnen Snapshotpaaren, bezogen auf die Atome der unmittelbaren Interdomänenkavität, spiegelte die Zweiteilung der Trajektorie sehr gut wieder (siehe Abb. 61). Die Abbildung unterteilt sich in einen Zeitraum, in dem das Enzym Proteinkonformationen mit aneinander aggregierten Domänen einnimmt, die lediglich moderate strukturelle Abweichungen im Vergleich zur Startstruktur aufweisen sowie in ein Zeitintervall mit im Vergleich zur Startstruktur zunehmend deutlicher abweichenden Konformeren ab dem Beginn der Domärentrennung. Der letztgenannte Zeitraum beinhaltet viele Cluster mit nur wenigen Konformeren.

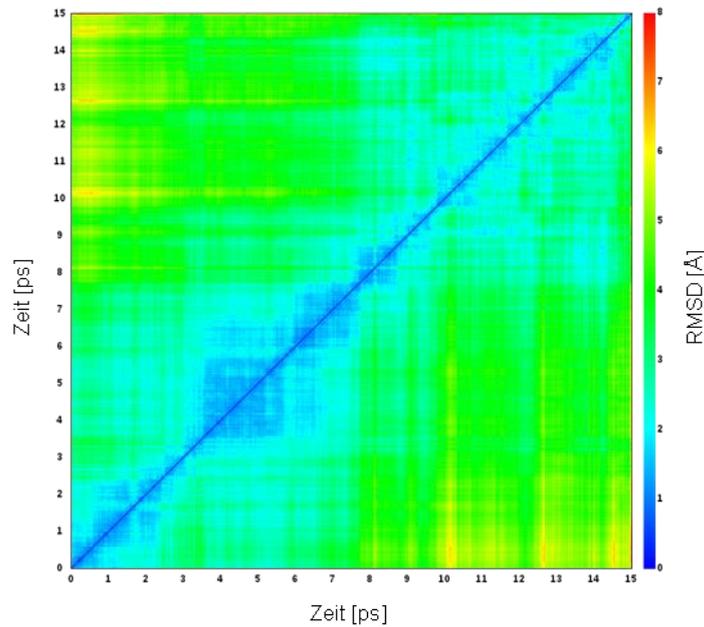


Abb. 61. 2D-RMSD Plot der 15 ns Simulation der HM-Hsc70-Enzymstruktur, berechnet für alle Aminosäurenatome der unmittelbaren Interdomänenkavität mit einem Zeitintervall von 20 ps. Jedes Quadrat des Plots gibt Auskunft über den RMSD-Wert zwischen zwei Snapshotpaaren, der durch einen Farbcode am rechten Rand dargestellt wird. Die größte Abweichung betrug 7,41 Å.

Innerhalb der ersten Simulationshälfte lassen sich zwei Hauptcluster an Enzymkonformationen, zwischen denen ein drittes Cluster mit wenigen Konformeren liegt, identifizieren. Während die Proteinstrukturen dieser Cluster nicht nur untereinander, sondern auch hinsichtlich der Startkonformation große Übereinstimmungen zeigten, waren erst mit dem Beginn der Domärentrennung ab ~8 ns erste signifikante strukturelle Differenzen zur Konformation der Startstruktur zu erkennen.

Aufgrund der mit der Domärentrennung einhergehenden Auflösung der Interfacekavität und des Verlustes der Zielregion der bearbeiteten Aufgabenstellung, standen bei der Analyse der verschiedenen Konformationscluster der Trajektorie insbesondere Proteinkonformationen der ersten Simulationshälfte im Fokus. Nach einer detaillierten visuellen Inspektion der einzelnen Cluster und Subcluster des 2D-RMSD Plots wurden die folgenden 8 Proteinstrukturen für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt: Frame 300, 1200, 2100, 2600, 5000, 5900, 6600 und 7500 ps.

Der Kavitätscharakter der postulierten Zielregion blieb in den untersuchten Enzymkonformationen bis zu der einsetzenden Trennung der Domänen weitestgehend erhalten. Das temporär auftretende gleichzeitige Verluste der Interdomänenwechselwirkungen auf beiden Seiten der Kavität zwischen Asp152 und Lys524 und zwischen Arg171 und Glu513 oder Glu516 nicht zwangsläufig zu einer Entfernung und Trennung der Domänen voneinander

führen müssen, zeigten die Frames 2100 ps und 2600 ps zusammen mit Konformeren der nachfolgenden Cluster, die wieder eine startstrukturähnliche Morphologie der Interfacekavität ausbildeten. Im Gegensatz zur Startstruktur bestand jedoch der Interdomänenkontakt auf der linken Kavitätsseite nicht zwischen Asp152 und Lys524, sondern zwischen Arg155 und Glu523.

Als mögliche Templatstrukturen mit einer alternativen Kavitätsmorphologie eignen sich aus dieser Trajektorie für zukünftige strukturbasierte Ligandendesignstudien in erster Linie die beiden Konformere 2100 ps und 2600 ps, bei denen keine seitlichen Interdomänenkontakte ausgebildet wurden, und die deshalb für andere, deutlich voluminösere Liganden adressierbar wären (siehe Abb. 62). Darüber hinaus lieferte die Analyse der anderen ausgewählten MD-Konformationen aufgrund der Abwesenheit spezifischer struktureller Unterschiede gegenüber der Startstruktur, als auch untereinander, keine weiteren Bindestellenkonformationen, die als charakteristisch und eigenständig angesehen hätten werden können und als potenzielle Templatstrukturen für eine Adressierung des Interfaces sinnvoll hätten genutzt werden können.

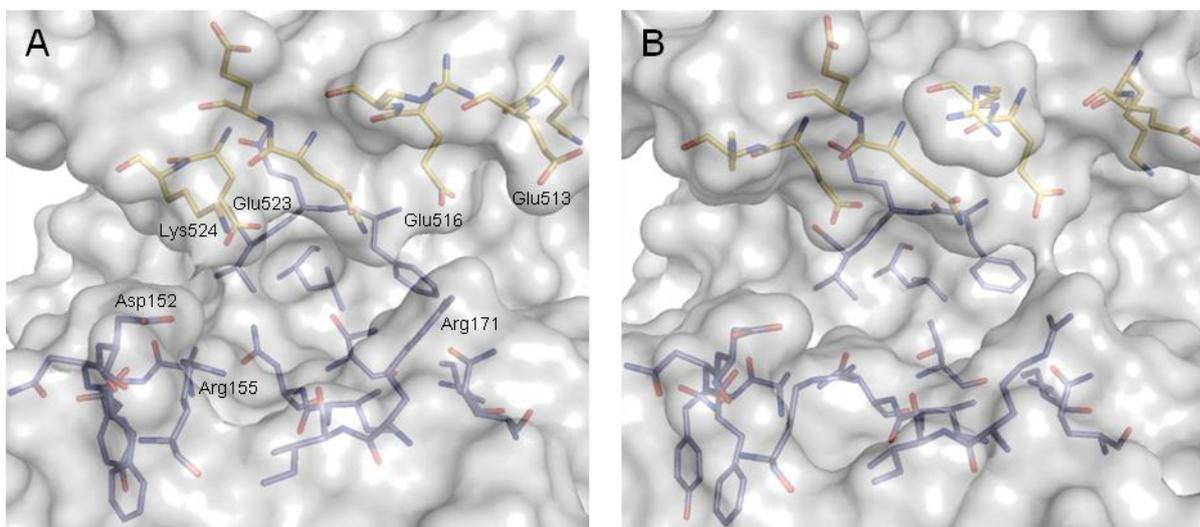


Abb. 62. Darstellung des Enzyimbereichs der unmittelbaren Interdomänenkavität der jeweiligen Proteinkonformere der Frames 2100 ps (A) und 2600 ps (B).

Die Enzymkonformationen mit zunehmend voneinander getrennten Domänen sowie die Proteinstruktur am Ende der Simulationszeit (siehe Abb. 63) können jedoch als Templatstrukturen für computerbasierte Wirkstoffdesignprojekte für die Identifizierung von Liganden dienen, die Bindestellen an einer der beiden Domänen in dem jeweiligen Proteinbereich adressieren, der an der Ausbildung des Interdomäneninterfaces beteiligt ist. Derartige Liganden könnten, wie Dimerisierungsinhibitoren anderer Proteine, die Aggregation der

beiden Domänen unterbinden und dadurch das Auftreten derartiger Enzymkonformationen, die möglicherweise wichtig für den katalytischen Mechanismus sind, verhindern.

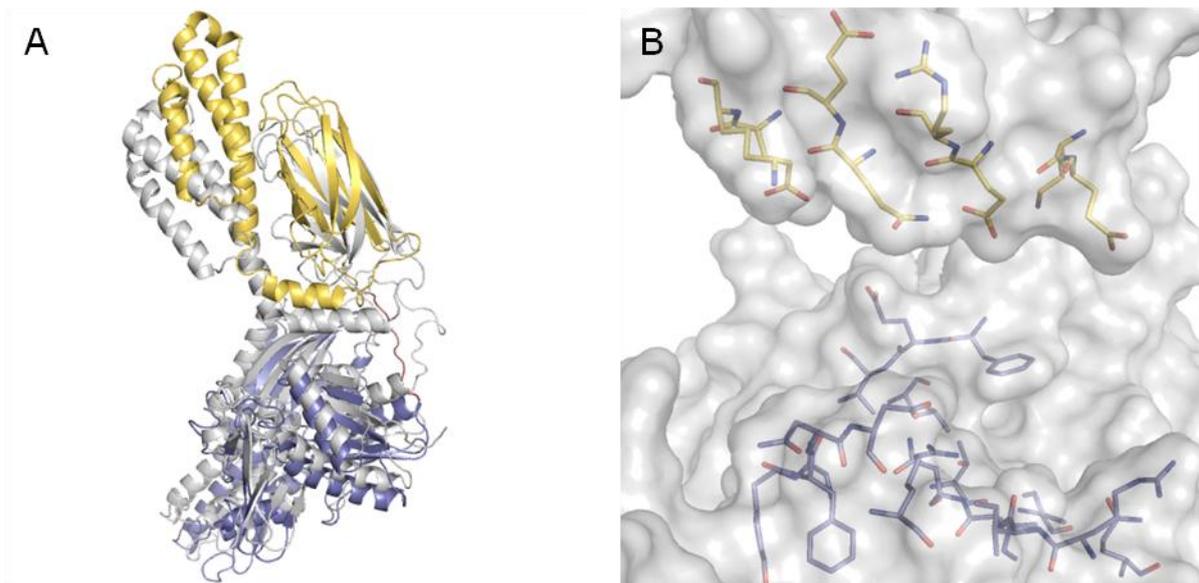


Abb. 63. Darstellung der Proteinkonformation zum Zeitpunkt 15000 ps. **A)** Überlagerung der Enzymstruktur des Frames 15000 ps (koloriert) mit der Startstruktur als Referenz (grau). **B)** Darstellung des Proteinbereichs des Interdomäneninterfaces mit den Aminosäuren der ursprünglich vorhandenen Interdomänenkavität.

IV.3.4.3.3 Molekulardynamik Simulation einer Hsc70-Az-Komplexstruktur

Im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Trajektorien unterlag die Enzymkonformation der Startstruktur während der MD Simulation des Hsc70-Az-Komplexes aufgrund des gebundenen Liganden Az nur geringfügigen strukturellen Änderungen und blieb nahezu unverändert, was durch RMSD-Mittelwerte von $2,53 \pm 1,36 \text{ \AA}$ für alle C_{α} -Atome des Proteins sowie $2,46 \pm 0,64 \text{ \AA}$ für die Atome der unmittelbaren Interdomänenkavität belegt wurde (siehe Abb. 64). Der Ligand Az befand sich während der gesamten Simulation im Zentrum der Bindetasche und unterlag mit einem RMSD-Mittelwert von $1,78 \pm 0,26 \text{ \AA}$ lediglich moderaten Änderungen.

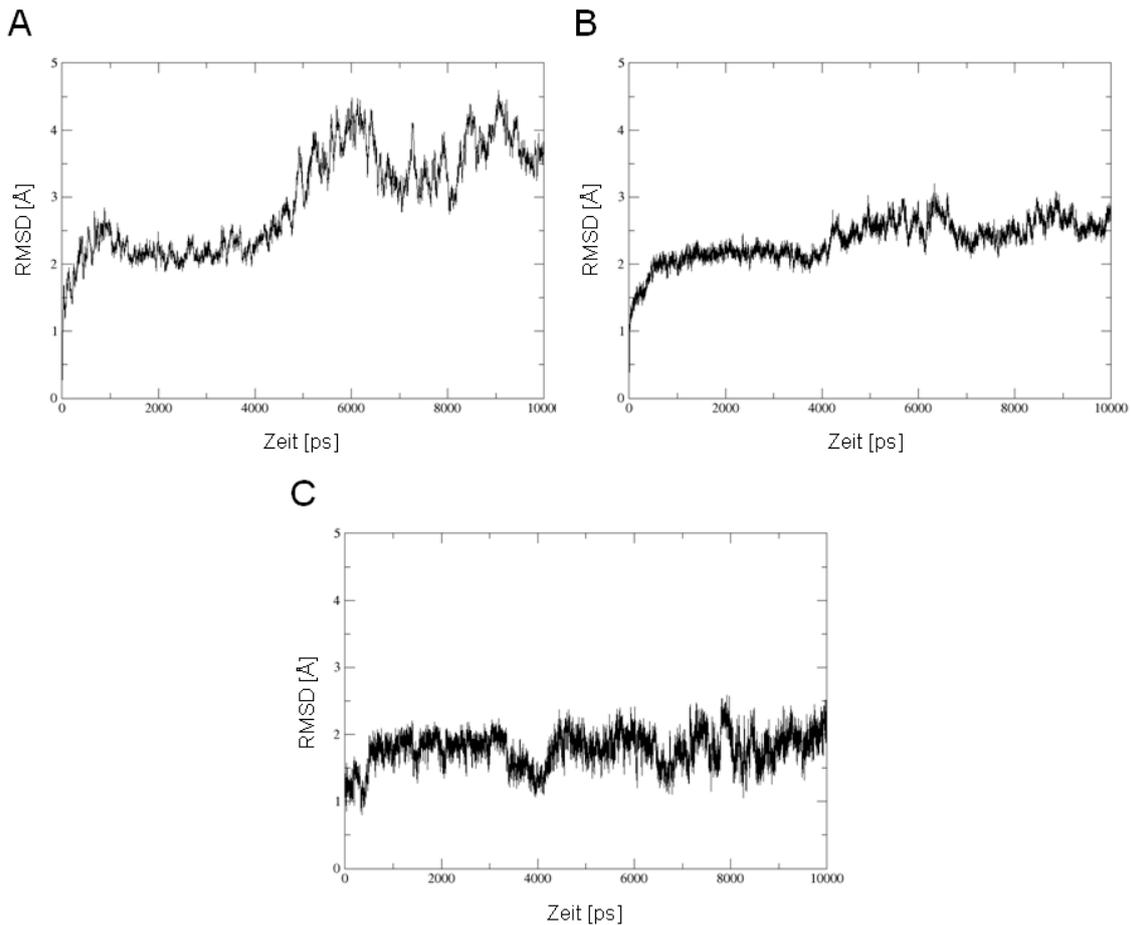


Abb. 64. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der RMSD-Werte aller C_{α} -Atome der Hsc70-Az-Komplexstruktur (A), aller Atome der unmittelbaren Interdomänenkavität (B) sowie aller Atome des Liganden Az (C).

Im Verlauf dieser Simulation traten keine größeren übergeordneten strukturellen Änderungen auf. Die Proteinkonformation mit aneinander aggregierten Domänen zeigte sich durchgehend sehr stabil und es konnte weder eine Entfernung der beiden Domänen voneinander noch eine Öffnung der Kavität auf einer der beiden Seiten beobachtet werden (siehe Abb. 65). Insgesamt blieb die Morphologie der Interfacekavität nahezu unverändert, unterlag nur marginalen lokalen strukturellen Änderungen und wurde im Vergleich zu der Hsc70-Trajektorie erheblich durch den gebundenen Liganden stabilisiert. Diese Beobachtung kann sowohl durch die gemessenen RMSD-Mittelwerte aller C_{α} -Atome sowie der Kavitätsatome als auch durch den 2D-RMSD Plot (siehe Abb. 68) belegt werden.

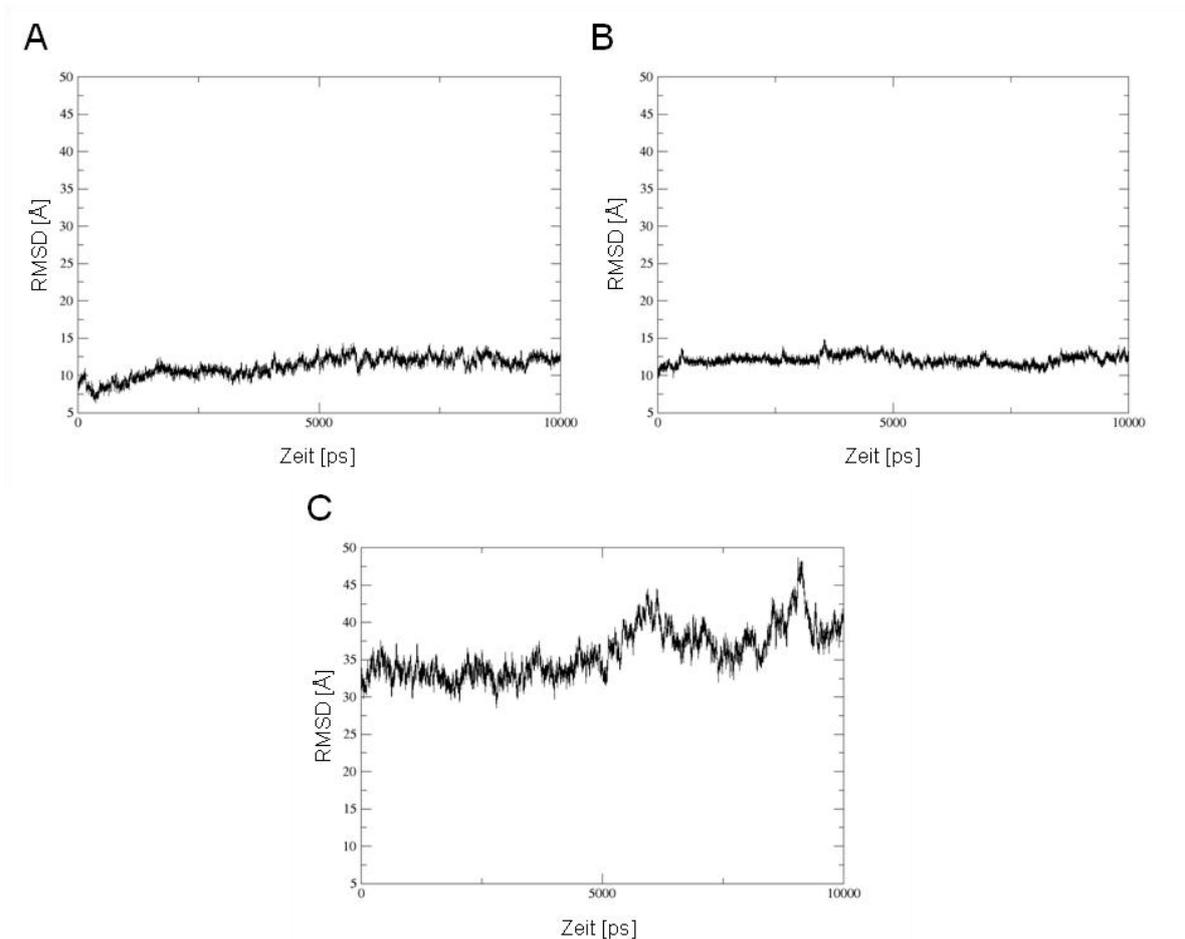


Abb. 65. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Abstände zwischen Asp152 und Lys524 auf der linken Seite der Interdomänenkavität (**A**), zwischen Arg171 und Glu513 auf der rechten Kavitätsseite (**B**) sowie zwischen Asp46 und Glu289 der beiden NBD-Subdomänen Ib und IIb.

Während die rechte Seite der Interfacekavität, wie bereits in der Hsc70-MD Simulation beobachtet, auch in diesem Fall aufgrund der wechselnden Interaktionen des Arg171 mit den beiden Interaktionspartnern Glu513 und Glu516 stabil blieb, wurde eine Öffnung der linken Kavitätsseite durch wechselnde Interaktionen des Liganden mit Glu516, Gln520, Glu523 sowie Lys524 verhindert (siehe Abb. 66). Im Verlauf der Simulation konnte darüberhinaus eine Reihe weiterer Interaktionen des Az' mit verschiedenen Aminosäuren beider Domänen der unmittelbaren Interfacekavität beobachtet werden. Die beobachteten direkten Wechselwirkungen zwischen Ligand und Bindestelle können hilfreiche Informationen für zukünftige Ligandendesignprojekte liefern, da durch die durchgeführte Analyse der Trajektorie insgesamt neun Aminosäuren der Interdomänenkavität identifiziert werden konnten, die bevorzugt mit einem gebundenen Liganden interagierten. Als Wechselwirkungspartner fungierten die Aminosäuren Ala148, Arg171, Asn174, Thr177, Phe217 der NBD sowie Glu516, Gln520, Glu523 und Lys524 der SBD. Diese Aminosäuren können zukünftig als

potenzielle Interaktionspartner gezielt berücksichtigt und adressiert werden, wie dies bereits in Abschnitt IV.3.2.1.1 bei der Erstellung des Pharmakophormodells geschehen ist. Durch die ausgebildeten Kontakte blieb der Ligand Az über die gesamte Simulationszeit im zentralen Bereich der Bindetasche lokalisiert. Auch die Ausrichtung des Y-förmigen Grundgerüsts änderte sich nur geringfügig. Die prägnanteste Änderung der Bindungskonformation des Az' stellte ein Umklappen des Benzcarbamids in Richtung des benachbarten Methoxyrests dar, der diesen verdrängt und dessen Position sowie Orientierung einnahm (siehe Abb. 66).

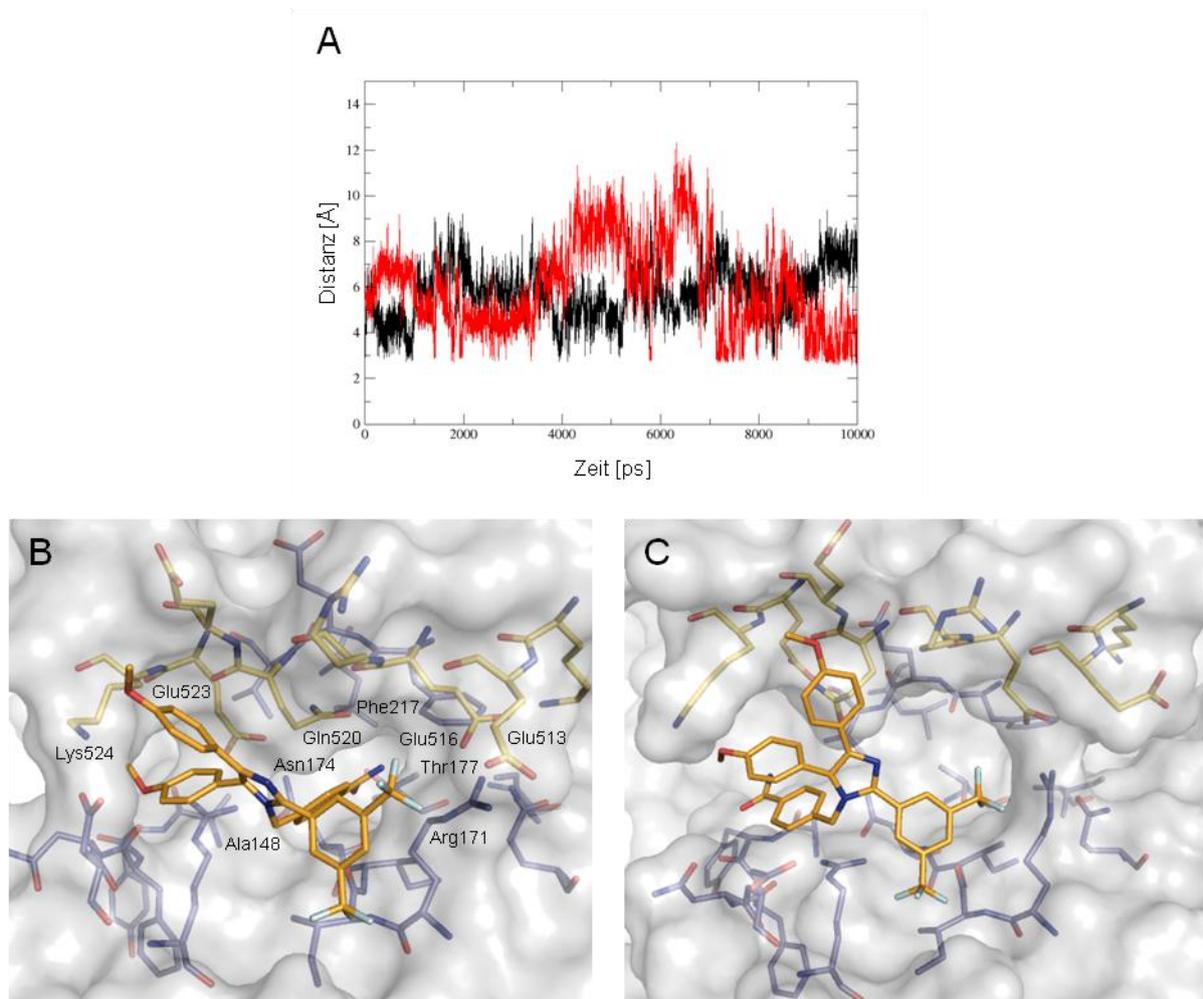


Abb. 66. Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Abstände zwischen den Sauerstoffatomen der beiden Methoxygruppen des Liganden Az und Lys524 (A). Darstellung des Enzymbereichs der unmittelbaren Interdomänenkavität zu Beginn (B) sowie gegen Ende der MD Simulation anhand des Proteinkonformers des Frame 9600 ps (C).

Hinsichtlich des exponierten Linkersegments des Enzyms war bei dieser Trajektorie interessanterweise zu beobachten, dass dieses im Gegensatz zu der Hsc70-MD Simulation über

die gesamte Simulationszeit einen deutlichen Abstand zum NBD-SBD-Komplex hielt und sich der Interdomänenschnittstelle nicht näherte. Diese Beobachtung deutet auf einen gewissen Zusammenhang zwischen einer Stabilisierung der Interdomänenschnittstelle und den Bewegungen des Linkersegments hin, der möglicherweise eines Tages experimentell nachgewiesen und konkretisiert werden könnte. Der beobachtete Zusammenhang stimmt zudem mit den zum Zeitpunkt der Arbeit vorhandenen Informationen der Fachliteratur überein, in der auf einen Zusammenhang zwischen den Bewegungen des Linkersegments und der Stabilität des Interdomäneninterfaces hingewiesen wird.^{194,201,224,231,232}

Innerhalb der NBD war, wie bereits in den beiden Trajektorien zuvor, zunächst ebenfalls ein Übergang der „geöffneten“ in die „geschlossene“ Konformation zu beobachten. In diesem Fall erfolgte die Konformationsänderung jedoch unter Beteiligung des „Gatekeepers“ Tyr15, das den Zugang zu der Nukleotidbindetasche durch eine Konformationsänderung der Seitenkette öffnete. Interessanterweise konnte darüber hinaus in dieser Trajektorie, im Gegensatz zu den vorherigen MD Simulationen, auch die entgegengesetzte Richtung, d.h. der Übergang der „geschlossenen“ zurück in die „geöffnete“ Konformation der Startstruktur beobachtet werden. Die Beobachtung zeigt, dass diese Konformationsänderung prinzipiell nicht einseitig ablaufen muss, sondern in beide Richtungen stattfinden kann und hierfür weder Co-Chaperone noch ein externer Stimulus in Form eines Liganden, wie z.B. eines Nukleotids, notwendig zu sein scheinen.

Die beobachtete Stabilisierung der gesamten Proteinkonformation sowie der Interdomänenkavität durch den gebundenen Liganden Az lässt sich auch anhand der mit Hilfe des Tools *Carnal* bestimmten und über die Trajektorie gemittelten RMSD-Werte belegen. Die RMSD-Werte aller 554 Aminosäuren umfassten einen Bereich von 0,98-11,98 Å (siehe Anhang VI.6.3). Diese Werte waren im Vergleich mit den für die MD Simulation des unkomplexierten Hsc70-Enzyms ermittelten Werte mit 2,50 Å gegenüber 4,81 Å für die Aminosäuren der NBD und mit 3,62 Å gegenüber 7,74 Å bezogen auf die SBD-Aminosäuren deutlich geringer und ungefähr um die Hälfte reduziert (siehe Abb. 67). Auch die für die NBD- und SBD-Aminosäuren der unmittelbaren Interfacekavität ermittelten Werte belegten mit 2,14 Å zu 5,13 Å und 3,18 Å zu 8,54 Å die insgesamt deutlich geringeren strukturellen Abweichungen über den Zeitraum der Trajektorie der Hsc70-Az-Komplexstruktur.

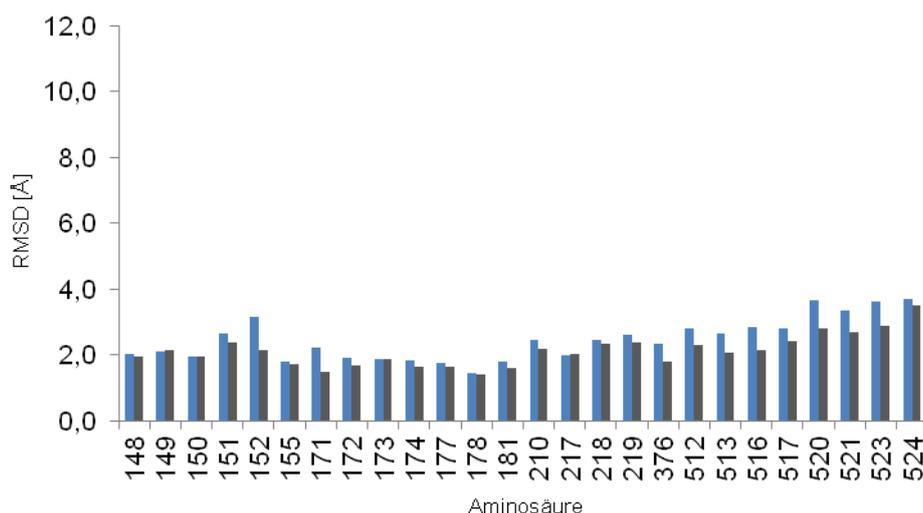


Abb. 67. Balkendiagramm der RMSD-Mittelwerte jeder Aminosäure der unmittelbaren Interdomänenkavität. Darstellung der RMSD-Mittelwerte berechnet für alle Aminosäurenatome (blau) sowie für die C_α-Atome (schwarz).

Ein Analog zu dem bereits beschriebenen Verfahren mittels *PTRAJ* und *PlotMTV* generierter 2D-RMSD Plot mit einer maximalen strukturellen Abweichung von 3,09 Å zwischen den einzelnen Strukturpaaren bezogen auf die Atome der unmittelbaren Interdomänenkavität zeigte sich deutlich homogener als die Plots der anderen beiden Trajektorien (siehe Abb. 68). Auf den ersten Blick sind zwei große Cluster zu erkennen, deren Proteinkonformationen überwiegend große strukturelle Gemeinsamkeiten teilen, wobei sich jedoch auch einige Konformersubcluster deutlicher strukturell voneinander unterscheiden. Während sich die Konformere des ersten Clusters durchgängig nur geringfügig von der Startstruktur unterscheiden, wiesen einige Konformere des zweiten Clusters in dieser Hinsicht vergleichsweise größere, jedoch auch nur moderate strukturelle Unterschiede auf. Im Anschluss an eine eingehende visuelle Inspektion der einzelnen anhand des 2D-RMSD Plots identifizierten Cluster und Subcluster wurden die folgenden 9 Frames für nachfolgende Analysen ausgewählt: Frame 2300, 4000, 4500, 5000, 6100, 7000, 7800, 9100 und 9600 ps.

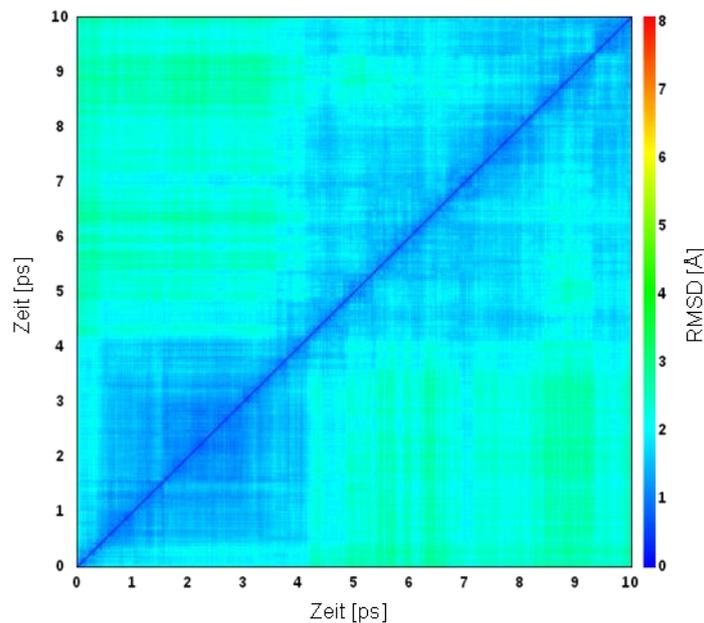


Abb. 68. 2D-RMSD Plot der 10 ns Simulation der Hsc70-Az-Komplexstruktur, berechnet für alle Aminosäurenatome der unmittelbaren Interdomänenkavität mit einem Zeitintervall von 20 ps. Jedes Quadrat des Plots gibt Auskunft über den RMSD-Wert zwischen zwei Snapshotpaaren, der durch einen Farbcode am rechten Rand dargestellt wird. Die größte Abweichung betrug 3,09 Å.

Die bereits beschriebene Stabilisierung der Interdomänenkavität durch den gebundenen Liganden führte dazu, dass die bekannte Morphologie der Kavität trotz des Verlustes des linken Interdomänenkontakts zwischen Asp152 und Lys524, bedingt durch die ausgebildeten Wechselwirkungen des Az' mit der α -Helix A über die gesamte Simulation erhalten blieb. Auf der rechten Kavitätsseite waren überwiegend Interaktionen zwischen Arg171 und Glu516 für eine Stabilisierung verantwortlich. Im Anschluss an die Analyse der übergeordneten, die Gesamtstruktur betreffenden Strukturänderungen wurden strukturelle Änderungen innerhalb der unmittelbaren Kavität untersucht. Dabei war der Fokus auf die Seitenkettenkonformationen gerichtet. Auch hierbei konnten keine charakteristischen Unterschiede, die signifikante Auswirkungen auf die Bindung eines Liganden hätten, zwischen den verschiedenen Konformeren beobachtet werden, noch nicht einmal bei Konformerpaaren mit einer vergleichsweise großen, aber insgesamt gesehen moderaten, strukturellen Abweichung in Bezug zur Startstruktur, wie z.B. die Konformere 5000 ps und 9100 ps. Ebenfalls konnten generell keine spezifischen Strukturunterschiede zwischen den Konformeren des ersten Clusters und bestimmten Konformeren des zweiten Clusters mit vergleichsweise hohen RMSD-Werten ausgemacht werden. Die identifizierten Strukturunterschiede umfassten hingegen eine Vielzahl geringfügiger Abweichungen.

Auf der Grundlage der Informationen der drei beschriebenen MD Simulationen kann möglicherweise eine erste Antwort auf die bis zum Zeitpunkt der Arbeit ungeklärte Frage, auf welche Weise Liganden des Interdomäneninterfaces die Enzymfunktion inhibieren bzw. modulieren, gegeben werden. Eine Hypothese hinsichtlich eines potenziellen Wirkmechanismus' könnte lauten, dass die Bindung von niedermolekularen Liganden an das Interdomäneninterface zu einer Stabilisierung einer Proteinkonformation mit aneinander aggregierten Domänen, wie z.B. die Enzymkonformation der Kristallstruktur 1YUW, führt und auf diese Weise Domänentrennungen unterbunden werden, die, wie in der Fachliteratur^{194,201,210,224,231,232} diskutiert wird, im Verlauf des katalytischen Mechanismus auftreten (siehe Abschnitt IV.1.3). Auf diese Weise könnten derartige Liganden in den Katalysenmechanismus von Hsp70 eingreifen und möglicherweise inhibieren.

IV.3.4.4 Zusammenfassung

Die MD Simulationen dreier verschiedener Systeme eines Hsp70-Enzyms zeigen deutlich, dass es sich bei diesem Protein um eine biologische Zielstruktur mit einer ausgeprägten intrinsischen Flexibilität handelt. Die untersuchten Konformationsräume umfassten zum Teil sehr unterschiedliche und charakteristische Proteinkonformere, die sich nicht nur durch lokal begrenzte strukturelle Änderungen, sondern auch in der Morphologie der Gesamtstruktur voneinander unterschieden. Weiterhin wiesen die MD Simulationen darauf hin, dass Proteinkonformere mit aneinander aggregierten Domänen unter Ausbildung eines Interdomäneninterfaces nicht nur unter unphysiologischen Kristallisationsbedingungen, sondern auch in wässriger Lösung zu einem gewissen Grad stabil sein können und Mitglieder des Konformationsensembles repräsentieren. Wie sich durch die Trajektorien zeigte, scheinen die Bewegungen der SBD die treibende Kraft bei der Domänentrennung zu sein. Die Ergebnisse der Untersuchungen deuten darüber hinaus darauf hin, dass die Interdomänenregion eine potenzielle Bindestelle für Liganden darstellen kann und aufgrund der morphologischen Flexibilität dieser Proteinregion prinzipiell die Bindung verschiedenster Molekülklassen unterschiedlichsten Molekulargewichts ermöglichen könnte. Durch eine Adressierung dieses Enzymbereichs mit niedermolekularen Liganden könnte die Interdomänenregion deutlich stabilisiert werden und nach den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Informationen eine Trennung der beiden Domänen erschwert oder möglicherweise vollständig unterbunden werden. Dadurch wird insgesamt die eingangs formulierte Hypothese der potenziellen Eignung des Interdomäneninterfaces von Hsp70 als

Bindestelle für neuartige Liganden und somit als möglicher Angriffspunkt für Inhibitoren gestützt.

V Zusammenfassung und Ausblick / Summary and Outlook

V.1 Zusammenfassung und Ausblick

Proteine sind dynamische makromolekulare Systeme, die nativ in verschiedenen Konformationen vorliegen. Besonders Proteine mit einer ausgeprägten intrinsischen Flexibilität stellen als biologische Zielstrukturen für das computergestützte strukturbasierte Wirkstoffdesign auch heute noch eine große Herausforderung dar. Die vorliegende Arbeit thematisiert die computergestützte Identifizierung neuer Liganden mit inhibitorischer Aktivität für zwei strukturell sehr flexible Enzyme, die bei verschiedenen Krankheiten eine pathophysiologische Rolle spielen. Ein Schwerpunkt lag in diesem Zusammenhang auf der Entwicklung virtueller Screeningverfahren, die es ermöglichen, die Flexibilität der Proteine adäquat zu berücksichtigen.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt ein virtuelles Screeningverfahren für die Identifizierung von Liganden einer neuen, durch Molekulardynamik (MD) Simulationen generierten Proteinkonformation der Aldose Reduktase (AR), einem Enzym, das im Zusammenhang mit der Entstehung von Folgeerkrankungen bei Diabetes mellitus steht. Die angewandte Vorgehensweise zeigt Möglichkeiten auf, wie eine ausgeprägte Proteinflexibilität mit Hilfe computerbasierter Methoden im Rahmen eines virtuellen Screenings explizit berücksichtigt werden kann. Die Studie war auf der einen Seite hinsichtlich methodischer Aspekte von Interesse, da dadurch sowohl eine Beurteilung der Aussagekraft computergenerierter Proteinkonformationen, als auch eine Überprüfung der prinzipiellen Eignung MD-generierter Enzymkonformationen als Template für strukturbasierten Ligandendesignstudien, erfolgen konnte. Auf der anderen Seite war diese Studie aufgrund einer möglichen Erweiterung des bekannten Konformationsraumes der AR auch aus strukturbiochemischer Sicht von Interesse. Bei der Suche nach geeigneten Liganden in Moleküldatenbanken kommerziell erhältlicher Verbindungen wurde eine protein- und eine ligandbasierte Strategie verfolgt. Im Rahmen des proteinbasierten Ansatzes erfolgte zunächst eine vergleichende Strukturanalyse verschiedener AR-Ligand-Komplexstrukturen, um Informationen hinsichtlich experimentell aufgeklärter Bindemotive, Protein-Ligand-Interaktionen sowie bestehender struktureller Differenzen zwischen der MD-Konformation und anderen Bindetaschenkonformationen der AR zu sammeln. Anschließend wurde die Bindetasche der MD-generierten Proteinstruktur hinsichtlich günstiger Interaktionspunkte analysiert, um aus den Erkenntnissen Pharmakophormodelle als Filter für die nachfolgenden virtuellen Datenbanksuchen zu entwickeln.

Als Ergänzung zum proteinbasierten Ansatz wurde eine ligandbasierte Strategie für die Identifizierung potenzieller Kandidatenmoleküle verfolgt. Dabei diente ein bekannter AR-Inhibitor als Templatstruktur, bei dem aufgrund zuvor durchgeführter Dockingexperimente die begründete Annahme bestand, dass dieser die Bindetaschenform der MD-Proteinkonformation stabilisieren könnte. Hierbei wurde zunächst eine Moleküldatenbank aus kommerziell erhältlichen Verbindungen, die alle über eine bestimmte Substruktur als Ankergruppe verfügten, aufgebaut und anschließend durch Berechnung molekularer Ähnlichkeiten zu der Templatstruktur auf mögliche Kandidatenmoleküle durchsucht.

Die virtuell identifizierten Moleküle der beiden Ansätze wurden im Anschluss mit Hilfe von Dockingsimulationen in die Bindetasche der MD-generierten Proteinkonformation gedockt und die berechneten Bindeposen mit einem Re- und Consensus-Scoringverfahren bewertet. Im nächsten Schritt erfolgte eine Untersuchung der Selektivität der Kandidatenmoleküle anhand eines Cross-Dockingexperiments an verschiedenen Bindetaschenkonformationen der AR. Auf der Grundlage aller durch das virtuelle Screeningverfahren gesammelten Informationen wurde eine finale Molekülauswahl getroffen und sechs kommerziell verfügbare Moleküle für experimentelle Untersuchungen bezogen. Die experimentelle Bestimmung der Enzyminhibition wurde dabei von Kooperationspartnern mit Hilfe eines *in vitro* Assays untersucht. Aufgrund einer unzureichenden Löslichkeit von vier Substanzen unter den Assaybedingungen konnte lediglich das Inhibitions Potenzial von zwei Verbindungen untersucht werden. Eine der Verbindungen zeigte bemerkenswerterweise eine inhibitorische Aktivität im einstelligen mikromolaren Bereich. Eine finale Beurteilung, ob die Zielsetzung dieser Studie, eine neue computergenerierte Bindetaschenkonformation der AR experimentell zugänglich zu machen, durch die vorgeschlagenen Verbindungen erfüllt werden konnte, konnte zum Zeitpunkt der Anfertigung der Dissertation aufgrund ausstehender Kristallstrukturen der jeweiligen AR-Ligand-Komplexe nicht erfolgen und bleibt das Ziel zukünftiger Arbeiten.

Die Studie zeigte jedoch deutlich, dass nicht nur experimentell aufgeklärte Proteinstrukturen sondern auch die Nutzung von mit Hilfe computerbasierter Verfahren, wie z.B. mittels MD Simulationen, berechneter Proteinkonformationen als Templatstrukturen für die Identifizierung neuer Liganden hilfreich sein kann und daher deren Verwendung für diese Zielsetzung ihre Berechtigung hat.

Der zweite Teil der Arbeit handelt von der computergestützten Identifizierung niedermolekularer Liganden einer neuen potenziellen Bindestelle der biologischen Zielstruktur Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), als eine neuartige Klasse von Hsp70-Inhibitoren. Hsp70 spielt eine pathophysiologische Rolle bei verschiedenen Krebserkrankungen sowie diversen

weiteren Erkrankungen, wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen und Infektionskrankheiten. Bei der neuen potenziellen Bindestelle, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, handelte es sich um das Interdomäneninterface, der Schnittstelle zwischen der Nukleotid- und Substratbindedomäne von Hsp70.

Zum Zeitpunkt der Arbeit waren keine Liganden dieser Proteinregion in der Literatur beschrieben, weshalb es zunächst galt, die Hypothese der Adressierbarkeit dieser Zielregion durch niedermolekulare Liganden zu verifizieren. Hierfür wurde ein virtuelles Screening durchgeführt, bei dem protein- sowie ligandbasierte Suchstrategien zum Einsatz kamen. Im Rahmen des proteinbasierten Ansatzes erfolgte zunächst eine Analyse der Hsp70 Tertiärstruktur auf potenziell vorhandene Ligandenbindestellen. Im Anschluss wurde das Interdomäneninterface auf günstige Interaktionspunkte für bestimmte Atomtypen und funktionelle Gruppen zukünftiger Liganden untersucht. Basierend auf diesen Informationen wurde ein Pharmakophormodell als Filter für nachfolgende virtuelle Datenbanksuchen entwickelt.

Bei dem ligandbasierten Ansatz fungierte der bekannte Hsp70-Ligand Apoptozol als Templatstruktur für die virtuelle Datenbanksuche, da die Ergebnisse eines vorab durchgeführten Cross-Dockingexperiments deutlich auf eine Bindung des Moleküls an das Interdomäneninterface hinwiesen. Diese Dockingstudie lieferte erste wertvolle Hinweise hinsichtlich der Bindestelle und potenzieller Bindemodi des Moleküls an Hsp70.

Im Anschluss an die virtuellen Datenbanksuchen wurden die identifizierten Kandidatenmoleküle hinsichtlich möglicher Bindemodi und Bindungsaffinitäten mittels Dockingsimulationen in Verbindung mit einem Re- und Consensus-Scoringverfahren untersucht. Abschließend wurden neun ausgewählte Kandidatenmoleküle von kommerziellen Anbietern bezogen und mit Hilfe von *in vitro* Assays von Kooperationspartnern innerhalb der Klinischen Forschergruppe 216 auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber Multiplen Myelomzellen untersucht. Dabei konnte für fünf der neun getesteten Verbindungen bereits bei Konzentrationen im ein- bzw. zweistelligen mikromolaren Bereich eine Aktivität gemessen werden, was einer formalen Trefferquote von 56% entspricht. Weiterhin wurde und wird in Folgearbeiten von Kooperationspartnern versucht, eine Bindung der ausgewählten Kandidatenmoleküle an Hsp70 näher zu charakterisieren und sowohl am separierten Protein, als auch in der Targetzelle nachzuweisen.

Darüber hinaus wurde zusätzlich ein fragmentbasierter Ansatz, basierend auf einer bestimmten Substruktur, die als eine Art Ankergruppe fungieren sollte, verfolgt. Dabei diente bei der virtuellen Suche in Moleküldatenbanken kommerzieller Anbieter ein Molekülfragment als Suchanfrage. Aus dem identifizierten Molekülsatz wurden Verbindungen unterschiedlichster struktureller Klassen für nachfolgende Dockingexperimente ausgewählt. Die

berechneten Bindeposen wurden einem Re-Scoringverfahren für eine zusätzliche Abschätzung der Bindungsaffinität unterzogen. Schließlich wurden die fünf vielversprechendsten Verbindungen für nachfolgende experimentelle Untersuchungen kommerziell bezogen. Die Ergebnisse der nachfolgenden röntgenkristallographischen Aufklärung der Protein-Ligand-Komplexe lagen bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation noch nicht abschließend vor und sind Bestandteil aktueller Forschungsarbeiten.

Mit den durchgeführten virtuellen Screeningverfahren konnten erstmals potenzielle Liganden des Hsp70-Interdomäneninterfaces als eine neuartige Klasse von Hsp70-Inhibitoren identifiziert werden. Weiterhin können die identifizierten, zytotoxisch aktiven Verbindungen als Leitstrukturen zukünftiger Inhibitor-designstudien dienen, mit dem Ziel sowohl die Zytotoxizität dieser Moleküle zu optimieren, als auch Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Entwicklung von Inhibitoren mit verbesserten biologischen Aktivitätsprofilen abzuleiten.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der computerbasierten Charakterisierung der Proteinflexibilität von Hsp70 mit Hilfe von MD Simulationen. In diesem Zusammenhang erfolgte eine Untersuchung intrinsischer Proteinbewegungen sowie des Konformationsraumes anhand von verschiedenen Hsp70-Enzymstrukturen. Die durchgeführten MD Simulationen waren zum Zeitpunkt der Arbeit die ersten Untersuchungen dieser Art, die nicht nur an einer einzelnen Domäne, sondern an ganzen Zweidomänenstrukturen von Hsp70 erfolgten. Die generierten Trajektorien bestätigten die überdurchschnittlich hohe Flexibilität der Zielstruktur Hsp70. Die im Rahmen der Studie identifizierten, zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht beschriebenen Proteinkonformere erweiterten das Spektrum der bekannten Hsp70-Proteinkonformationen erheblich und lieferten mögliche Enzymkonformationen, die als Templatstrukturen für zukünftige strukturbasierte Wirkstoffdesignstudien dienen können. Darüber hinaus stützten die Beobachtungen die Hypothese der prinzipiellen Eignung des Interdomäneninterfaces von Hsp70 als eine Bindestelle für neue Inhibitoren. Auf der Grundlage der gewonnenen Informationen war es weiterhin möglich, eine erste Hypothese hinsichtlich eines potenziellen inhibitorischen Wirkmechanismus der Liganden des Interdomäneninterfaces zu formulieren.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die vorliegende Arbeit viele neue strukturbio-logische Erkenntnisse über Hsp70 gewonnen wurden. Dennoch besteht weiterer Forschungsbedarf, um die Strukturbiologie von Hsp70 umfassend aufzuklären. Möglicherweise können in zukünftigen Studien Enzymstrukturen aufgeklärt werden, die die Existenz der *in silico* erzeugten und in der Arbeit beschriebenen Proteinkonformere bestätigen.

V.2 Summary and Outlook

Proteins are dynamic macromolecular systems, natively existing in different conformations. Particularly proteins with a marked intrinsic flexibility serving as biological targets issue a challenge to computational structure-based drug design even today. This thesis addresses the computer-aided identification of new inhibitors of two structurally highly flexible enzymes which are playing a pathophysiological role in different diseases. Thus, the focus was on the development of virtual screenings that enable considering the protein flexibility adequately.

The first part of this thesis describes a virtual screening aiming to identify ligands of a new protein conformation of aldose reductase (AR) that was generated by molecular dynamics (MD) simulations. AR is an enzyme that is related to secondary diseases of diabetes mellitus. The conducted strategy reveals possibilities how pronounced protein flexibility can explicitly be considered by computer-based methods within the scope of a virtual screening. On the one hand, the study was of special interest because of methodical aspects as both an assessment of the significance of computer-generated protein conformations and an examination of the suitability of MD-generated enzyme conformations as templates for structure-based ligand design studies could be made. On the other hand, the study was of interest with regard to structural biology due to a possible expansion of the known conformational space of the enzyme.

The identification of suitable ligands out of a database of commercially available compounds was performed with the help of a protein-based as well as a ligand-based approach. During the protein-based approach a comparative structural analysis of different AR-ligand complexes was first done to collect information about experimentally elucidated binding motives, protein-ligand interactions and existing structural differences between the MD-conformation and other existing AR-binding pocket conformations. Afterwards, the binding pocket of the MD-generated protein structure was analysed with regard to favoured interaction sites. These findings served as basis for the development of pharmacophore models serving as a filter in subsequent *in silico* database screenings.

In addition to the protein-based approach a ligand-based strategy was followed to identify potential candidate molecules. A well-known inhibitor of AR served as template structure. Based on previously conducted docking experiments one may assume that this compound might be able to stabilise the binding pocket of the MD-conformation. Consequently, a database of commercially available compounds all containing a certain substructure as anchor group was generated and feasible candidate molecules were searched via calculation of molecular similarities between database molecules and the template structure.

All identified compounds were subsequently docked into the binding pocket of the MD-generated protein conformation and predicted binding poses were assessed by a re- and consensus scoring procedure. In the next step selectivity investigations at different AR binding pocket conformations were performed on the basis of a cross-docking experiment. In accordance with all information received during the virtual screening process a final compound selection was made and six commercially available molecules were ordered for further experimental analyses. These experiments were performed by cooperation partners using a well established *in vitro* assay. As a result of an insufficient solubility of four compounds under the assay conditions, the inhibitory potency of only two molecules could be determined. Remarkably, one compound showed an inhibitory activity at a one-digit micromolar concentration. However, as crystal structures of the particular AR-ligand complexes were pending at the time of preparing the thesis, it was not possible to finally conclude whether the purpose of this study to make a new computationally generated binding pocket conformation of AR experimentally accessible could be achieved. This task remains the aim of future projects.

The study clearly demonstrated that not only the use of experimentally elucidated protein structures as template structures can be useful for the identification of new ligands but also the use of structures generated by computer-based procedures like MD simulations.

The second part of this thesis is about the computer-aided identification of small ligands of a new potential binding site of the biological target heat shock protein 70 (Hsp70), as a novel Hsp70 inhibitor class. Hsp70 plays a pathophysiological role in different cancer diseases and other diseases such as neuro-degenerative disorders and infectious diseases. The interdomain interface between the nucleotide and the substrate binding domain of Hsp70 represents the new potential binding site and was comprehensively investigated as part of the present thesis. At the time of the study no ligand of this protein region was described in the literature. Thus, the hypothesis whether the target site represents an addressable binding site was needed to be proven by small ligands. For this purpose a virtual screening was conducted by using both protein- and ligand-based search strategies. During the protein-based approach, the tertiary structure of Hsp70 was analysed with regard to potentially existing ligand binding sites. Subsequently, the interdomain interface was scanned to identify favourable interaction sites of specific atom types and functional groups of future ligands. Based on the gathered information a pharmacophore model was developed, serving as a query in following *in silico* database screenings. The known Hsp70 ligand Apoptozol was of use as template structure for virtual database screenings as results of a previously performed cross-docking experiment indicated that the molecule binds to the interdomain

interface. The study provided initial valuable hints about the binding site and potential binding modes of the molecule at Hsp70.

After database screenings the identified candidate molecules were tested with regard to their possible binding modes and binding affinities by docking simulations combined with a re- and a consensus scoring procedure. Finally, nine selected compounds were purchased from commercial suppliers and their cytotoxic activity towards multiple myeloma cells was tested in an *in vitro* assay by cooperation partners of the clinical research group 216. Thereby, five out of nine tested compounds showed a cytotoxic activity at one- to two-digit micromolar concentrations, resulting in a formal hit rate of 56%. Ongoing research projects are being made to further characterise the binding of the chosen molecules to Hsp70 and to verify the binding to both the isolated protein and the protein inside the target cells.

Furthermore, a fragment-based approach was followed based on a specific substructure that might be serving as an anchor group for a targeted binding to the interdomain interface. A molecular fragment served as query during the virtual search in several compound databases of commercial suppliers. Out of the resulting molecule collection, only members of different, most diverse structural classes were chosen for subsequent docking experiments. As a next step, the calculated binding poses were submitted to a re-scoring procedure to verify the particular binding affinities. Finally, the five most promising compounds were purchased for further experimental analyses. The results of the X-ray crystallography to determine the respective protein-ligand complexes were not finally available at the time of preparing the present thesis and related experiments are still the subject of current research work.

With the performed virtual screenings it was possible for the first time to identify potential ligands of the Hsp70 interdomain interfaces as a novel class of Hsp70 inhibitors. Further on, the identified, cytotoxic active compounds might serve as lead structures in future inhibitor design studies that aim to optimise the cytotoxicity of these molecules as well as to deduce structure-activity relationships from ligand series for the development of inhibitors that have more favourable biological activity profiles.

Another emphasis of the thesis was on the computer-based characterisation of the protein flexibility of Hsp70 with the help of MD simulations. In this context an analysis of intrinsic protein dynamics together with the conformational space was done on the basis of different Hsp70 enzyme structures. At the time of the work, the conducted MD simulations were the first of this type which addressed Hsp70 two-domain-structures instead of structures of separated protein domains. Thus, this thesis provided initial insights into potential intrinsic protein movements. The evaluation of the generated trajectories confirmed the high flexibility of Hsp70. Thereby, at the time of the study so far unknown protein conformations could be

identified that considerably expanded the spectrum of known Hsp70 protein conformations and proposed possible enzyme conformations that might be used as template structures for future structure-based drug design studies. Furthermore, the observations supported the hypothesis that the Hsp70 interdomain interface may principally be suitable as a binding site for new inhibitors. In the light of all this information, it was possible to postulate a first hypothesis about a potential mechanism of action of an enzyme inhibition by ligands of the interdomain interface.

In summary, the present thesis revealed various aspects with regard to the structural biological elucidation of Hsp70. Nevertheless, structural analyses of Hsp70 will be ongoing in the future. It might be possible that in future studies enzyme structures will be identified that confirm the existence of the *in silico* generated protein conformers, described in the present thesis.

VI Anhang

VI.1 Selektivitätsrangliste

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse des in Abschnitt III.4.4 beschriebenen Cross-Dockingexperiments der für die bis zu diesem Filterschritt verbliebenen 70 Kandidatenmoleküle des virtuellen Screenings. Dargestellt sind jeweils die berechneten Bindungsenthalpien (ΔG) hinsichtlich der MD-Konformation (MD-Konf.) sowie für einen Vergleich die berechneten Bindungsenthalpien hinsichtlich der drei Haupt-Bindetaschenkonformationen der AR (1AH0, 1AH3, 1US0). Von den Kandidatenmolekülen zeigten 21 Moleküle Affinitätsvorteile zugunsten der MD-Konformation gegenüber allen drei anderen bekannten Bindetaschenformen, 24 Verbindungen gegenüber zwei der drei Bindetaschenkonformationen, 14 Moleküle nur gegenüber einer anderen Bindetaschenform und 11 Verbindungen keinen Affinitätsvorteil zugunsten der MD-Konformation. Diese Reihenfolge entspricht auch der Sortierung der Liganden unter Berücksichtigung der jeweiligen Bindungsenthalpie des Liganden hinsichtlich der MD-Konformation. Die Bezeichnung ARL-1 bis 12 kennzeichnet die 12 Kandidatenmoleküle, die schließlich für die experimentellen Untersuchungen ausgewählt wurden.

Ligand	ΔG MD-Konf. [kca/mol]	ΔG 1AH0 [kca/mol]	ΔG 1AH3 [kca/mol]	ΔG 1US0 [kca/mol]
1	-11,26	-9,33	-8,94	-8,99
2 (ARL-1)	-11,11	-8,95	-9,20	-9,22
3 (ARL-4)	-10,88	-9,38	-9,74	-9,31
4	-10,88	-10,18	-9,74	-7,57
5 (ARL-10)	-10,68	-10,44	-9,39	-9,56
6	-10,58	-10,13	-10,18	-10,25
7	-10,58	-9,29	-9,47	-8,33
8	-10,44	-9,30	-9,58	-8,57
9	-10,37	-9,79	-7,58	-9,04
10	-10,19	-8,90	-9,35	-9,06
11	-9,70	-9,26	-9,29	-8,63
12 (ARL-2)	-9,67	-8,78	-8,71	-8,52
13	-9,64	-9,60	-8,97	-9,57
14	-9,28	-8,92	-8,03	-8,07
15	-9,16	-8,65	-8,23	-8,89
16	-9,11	-8,85	-8,57	-7,97
17	-9,09	-8,99	-7,93	-8,86
18 (ARL-8)	-9,00	-8,29	-8,40	-8,23
19	-8,96	-8,74	-7,98	-7,87
20	-8,71	-8,48	-8,21	-7,56

21 (ARL-11)	-8,63	-8,57	-8,09	-8,01
22	-11,56	-9,21	-9,16	-12,19
23 (ARL-6)	-11,10	-10,11	-9,94	-11,67
24	-11,08	-8,89	-9,39	-11,35
25 (ARL-5)	-10,90	-8,98	-8,90	-11,72
26	-10,70	-10,66	-9,87	-11,46
27	-10,53	-10,48	-10,44	-11,20
28	-9,57	-9,57	-8,35	-9,36
29	-9,50	-9,36	-9,44	-10,35
30	-9,49	-9,37	-9,40	-10,22
31	-9,43	-8,64	-7,84	-10,27
32	-9,43	-8,63	-9,47	-7,36
33 (ARL-9)	-9,42	-7,99	-7,82	-9,62
34	-9,14	-9,44	-8,32	-8,65
35	-9,06	-8,42	-8,49	-10,06
36	-9,03	-7,95	-8,36	-9,94
37	-9,00	-9,27	-8,90	-8,52
38 (ARL-3)	-8,95	-8,24	-9,21	-8,00
39	-8,94	-9,66	-8,48	-8,63
40 (ARL-12)	-8,92	-8,99	-8,10	-7,82
41	-8,86	-8,44	-8,28	-10,02
42	-8,73	-8,02	-7,26	-9,69
43 (ARL-7)	-8,51	-8,01	-7,75	-9,75
44	-8,40	-7,63	-7,92	-8,64
45	-8,26	-8,20	-7,77	-9,37
46	-9,77	-10,26	-9,47	-10,36
47	-9,71	-10,13	-8,54	-10,00
48	-9,67	-9,68	-10,29	-7,50
49	-9,38	-9,38	-8,55	-9,73
50	-9,31	-9,40	-9,39	-8,81
51	-9,14	-9,64	-9,53	-7,86
52	-8,67	-8,77	-8,49	-9,71
53	-8,16	-8,90	-7,38	-9,35
54	-8,10	-8,57	-7,70	-8,97
55	-8,10	-8,17	-7,57	-9,15

56	-7,99	-7,90	-8,67	-10,21
57	-7,53	-7,38	-7,97	-9,32
58	-7,48	-7,63	-7,24	-8,94
59	-6,69	-6,67	-7,21	-8,38
60	-8,29	-9,16	-8,64	-9,18
61	-8,27	-9,21	-9,83	-10,31
62	-7,69	-8,80	-8,03	-9,42
63	-7,57	-9,16	-8,59	-8,11
64	-7,55	-8,74	-7,90	-9,65
65	-7,36	-7,44	-7,46	-7,55
66	-7,19	-7,56	-7,80	-9,15
67	-7,00	-7,42	-7,84	-8,89
68	-6,69	-6,93	-7,35	-8,43
69	-6,46	-7,40	-7,05	-7,52
70	-6,35	-7,37	-7,36	-7,85

VI.2 Multisequenzanalyse

Darstellung des Sequenzvergleichs der zum Zeitpunkt der Arbeit bekannten acht humanen Hsp70-Isoformen erweitert um die Enzyme bHsc70 und DnaK. Sequenzabschnitte mit einer vollständigen Homologie werden durch schwarze Felder repräsentiert, während graue Felder Unterschiede in funktionell konservierten Aminosäuren darstellen und weiße Felder Unterschiede zwischen funktionell nicht konservierten Aminosäuren repräsentieren.

hHsp70-1a 1 -----MAKAAATGIDL
hHsp70-1b 1 -----MAKAAATGIDL
hHsp70-1t 1 -----MATAKGIATGIDL
hHsc70 1 -----MSKGPVAVGIDL
bHsc70 1 -----MSKGPVAVGIDL
hHsp70-2 1 -----MSARGPATGIDL
hHsp70-6 1 -----MQAPRELAVGIDL
hHsp70-5 1 -----MKLSLVAAML LLLSAAARAEEDKKEDVGTVVGIDL
hHsp70-9 1 MISASRAAAARLVGAAASRGPTAARHQDSWNGLSHEAFRLVSRDYEASEAIKGAVVGIDL
DnaK 1 -----MKRIIGIDL

hHsp70-1a 12 GTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNOVALNPONTVFDA
hHsp70-1b 12 GTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNOVALNPONTVFDA
hHsp70-1t 14 GTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNOVALNPONTVFDA
hHsc70 12 GTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNOVALNPONTVFDA
bHsc70 12 GTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNOVALNPONTVFDA
hHsp70-2 13 GTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLIGDAAKNOVALNPONTVFDA
hHsp70-6 14 GTTYSCVGVFQGRVEI IANDQGNRTTPSYVAFT-DTERLVGDAAKSOAALNPONTVFDA
hHsp70-5 36 GTTYSCVGVFKNGRVEI IANDQGNRTTPSYVAFTPEGERLIGDAAKNOLTSNPENTVFDA
hHsp70-9 61 GTTNSCVAVMEGKQAKVLENAEGARTTPSVVAFTADGERLVGMPAKRQAVTNPNTFYAT
DnaK 10 GTTNSCVAVMDGTTFRVLENAEGDRTPSIIAYTQDGETLVGQPAKRQAVTNPONTLFAI

hHsp70-1a 71 KRLIGRKF G D P V V Q S D M K H W P F Q V I N D G D K P K V Q V S Y K G - D T K A F Y P E E I S S M V L T K M K E
hHsp70-1b 71 KRLIGRKF G D P V V Q S D M K H W P F Q V I N D G D K P K V Q V S Y K G - E T K A F Y P E E I S S M V L T K M K E
hHsp70-1t 73 KRLIGRKF N D P V V Q A D M K L W P F Q V I N E G G K P K V L V S Y K G - E N K A F Y P E E I S S M V L T K M K E
hHsc70 71 KRLIGR R F D D A V V Q S D M K H W P F M V V N D A G R P K V Q V E Y K G - E T K S F Y P E E V S S M V L T K M K E
bHsc70 71 KRLIGR R F D D A V V Q S D M K H W P F M V V N D A G R P K V Q V E Y K G - E T K S F Y P E E V S S M V L T K M K E
hHsp70-2 72 KRLIGRKF E D A T V Q S D M K H W P F R V V S E G G K P K V Q V E Y K G - E T K T F F P E E I S S M V L T K M K E
hHsp70-6 73 KRLIGRKF A D T T V Q S D M K H W P F R V V S E G G K P K V R V C Y R G - E D K T F Y P E E I S S M V L S K M K E
hHsp70-5 96 KRLIGR T W N D P S V Q Q D I K F L P F K V V E K K T K P Y I Q V D I G G G Q T K T F A P E E I S A M V L T K M K E
hHsp70-9 121 KRLIGR R Y D D P E V Q K D I K N V P F K I V R A S N G D A W V E A H G K - - - - L Y S P S Q I G A F V L M K M K E
DnaK 70 KRLIGR R F Q D E E V Q R D V S I M P F K I I A A D N G D A W V E V K G Q - - - - K M A P P Q I S A E V L K M M K E

hHsp70-1a 130 IAEAYLGY P V T N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D R T G
hHsp70-1b 130 IAEAYLGY P V T N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D R T G
hHsp70-1t 132 TAAEFLGH P V T N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G V I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D R K G
hHsc70 130 IAEAYL G K T V T N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D K K -
bHsc70 130 IAEAYL G K T V T N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D K K -
hHsp70-2 131 IAEAYL G G K V H S A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G I T I G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D R K G
hHsp70-6 132 TAEAYL G Q P V K H A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D R R G
hHsp70-5 156 TAEAYL G K K V T H A V I T V P A Y F N D A Q R Q A T K D A G I A G L N V M R I I N E P T A A A I A Y G L D R R E
hHsp70-9 177 TAENYLGH T A K N A V I T V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G Q I S G L N V L R V I N E P T A A A I A Y G L D K - -
DnaK 126 TAEDYLGE P V T E A V I T V P A Y F N D A Q R Q A T K D A G R I A G L E V K R I I N E P T A A A I A Y G L D K G -

hHsp70-1a 190 --KGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIIDG---IFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFVE
hHsp70-1b 190 --KGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIIDG---IFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFVE
hHsp70-1t 192 --QGERHVLIFDLGGGTFDVSILTIIDG---IFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSHFVE
hHsc70 189 -VGAERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG---IFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFI A
bHsc70 189 -VGAERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG---IFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFI A
hHsp70-2 191 CAGGEXNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDG---IFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVSHLAE
hHsp70-6 192 --AGERNVLIFDLGGGTFDVSVLSIDAG---VFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFME
hHsp70-5 216 ---GEKNLIFDLGGGTFDVSILTIIDG---VFEVVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHFIK
hHsp70-9 235 --SEKVIAYVDLGGGTFDVSILEIQKG---VFEVKSTNGDTFLGGEDFDQALLRHIVK
DnaK 185 --TCNRRTIAVVDLGGGTFDVSIIIEIDEVDGEKTFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLINYLVE

hHsp70-1a 244 EFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGI---DFYTSITR
hHsp70-1b 244 EFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGI---DFYTSITR
hHsp70-1t 246 EFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQANLEIDSLYEGI---DFYTSITR
hHsc70 244 EFKRKHKKDISENKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGI---DFYTSITR
bHsc70 244 EFKRKHKKDISENKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGI---DFYTSITR
hHsp70-2 247 EFKRKHKKDIGPNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGV---DFYTSITR
hHsp70-6 246 EFRRKHGKDLSEGNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQATLEIDSLFEGV---DFYTSITR
hHsp70-5 269 LYKKTGKDV RKDNRAVQKLRREVEKAKRALSSQHQA RIEIESFYEGE---DFSETLTR
hHsp70-9 289 EFKRETGVDLTKDNMALQRVREAAEKAKCELSSSVQTDINLPYL TMDSSGPKHLNMLKTR
DnaK 243 EFKKQDQIGDLRNDPLAMQRLKEAAEKAKIELSSAQQTDVNLPLYITADATGPKHMNIKVTR

hHsp70-1a 300 ARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRI PKVQKLLQDFNGRDL
hHsp70-1b 300 ARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRI PKVQKLLQDFNGRDL
hHsp70-1t 302 ARFEELCADLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAKIHDIVLVGGSTRI PKVQKLLQDFNGRDL
hHsc70 300 ARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIVLVGGSTRI PKIQKLLQDFNFKEL
bHsc70 300 ARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHDIVLVGGSTRI PKIQKLLQDFNFKEL
hHsp70-2 303 ARFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSIHQEIVLVGGSTRI PKIQKLLQDFNFKEL
hHsp70-6 302 ARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDVVLVGGSTRI PKVQKLLQDFNFKEL
hHsp70-5 325 AKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLKEDSDLKKSIDEIVLVGGSTRI PKIQKLLQDFNFKEL
hHsp70-9 349 AQFEGIVTDLFRRTIAPCQKAMQDAEVSKSDIGEIVLVGGMTRMPKVQQTVDLFG-RAP
DnaK 303 AKLESIVLVEDLVNRSIEPLKVALQDAGLSVSDIDDVILVGGQTRMPMVQKVAEFGG-KEP

hHsp70-1a 360 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNST
hHsp70-1b 360 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNST
hHsp70-1t 362 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSEKVVQDLLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNST
bHsc70 360 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTALIKRNTT
hHsc70 360 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTALIKRNTT
hHsp70-2 363 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTALIKRNTT
hHsp70-6 362 NKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKCEKVVQDLLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNTT
hHsp70-5 385 SRGINPDEAVAYGAAVQAGVLSGD--QDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTALIKRNTT
hHsp70-9 408 SKAVNPDEAVATGAAVQGGVLAGD---VTDVLLLDVTPLSLGIETLGGVMTALIKRNTT
DnaK 362 RKDVNPDEAVATGAAVQGGVLTGD---VKDVLVLLDVTPLSLGIETMGGVMTALIKRNTT

hHsp70-1a 420 IPTKQQTFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPOIEVTFD
hHsp70-1b 420 IPTKQQTFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPOIEVTFD
hHsp70-1t 422 IPTKQQTFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFDLTGIPPAPRGVPOIEVTFD
hHsc70 420 IPTKQQTFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFELTGIPPAPRGVPOIEVTFD
bHsc70 420 IPTKQQTFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFELTGIPPAPRGVPOIEVTFD
hHsp70-2 423 IPTKQQTFTTYSNQS SVLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFDLTGIPPAPRGVPOIEVTFD
hHsp70-6 422 IPTKQQTFTTYSNQPGLVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPOIEVTFD
hHsp70-5 443 VPTKKSQIFSTASDNQPTVTIKVYEGGERPLTKDNNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPOIEVTFE
hHsp70-9 464 IPTKKSQVFTAADGQTQVEIKVCQGEREMAGDNKLLGQFTLIGIPPAPRGVPOIEVTFD
DnaK 418 IPTKHSQVFTAEDNQS AVTIHVLCGERKRAADNKSLGQFNLDGINPAPRGMPQIEVTFD

hHsp70-1a 480 IDANGILNVTAADKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDVQRRERSAK
hHsp70-1b 480 IDANGILNVTAADKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKAEDVQRRERSAK
hHsp70-1t 482 IDANGILNVTAADKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVLDAKEYKAEDVQREKIAAK
hHsc70 480 IDANGILNVSAVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDKQRDKVSSK
bHsc70 480 IDANGILNVSAVDKSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDKQRDKVSSK
hHsp70-2 483 IDANGILNVTAADKSTGKENKITITNDKGRLSKDDIDRMVQEAERYKSEDEANRDRVAAK
hHsp70-6 482 IDANGILSVTADRSTGKANKITITNDKGRLSKEEVERMVHEAEQYKAEDAQRDRVAAK
hHsp70-5 503 IDVNGILRVTAEDKGTGKNNKITITNDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEDKKLKERIDTR
hHsp70-9 524 IDANGIVHVSADKDKGTGREQQIIVIQSSGG--LSKDDIENMVKNAEKYAEEDRRKKEVEAV
DnaK 478 IDADGILHVSADKDKNSGKEQKITIKASSG--LNEDEIQKMVRDAEANAEDRKFEBELVQTR

hHsp70-1a 540 NALESYAFNMKSAVED--EGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKE
hHsp70-1b 540 NALESYAFNMKSAVED--EGLKGGKISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKE
hHsp70-1t 542 NALESYAFNMKSVVSD--EGLKGGKISESDKNKILDKCNELLSWLEVNQLAEKDEFDHRKRKE
hHsc70 540 NSLESYAFNMKATVED--EKLQGGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAKEEFEHQOKE
bHsc70 540 NSLESYAFNMKATVED--EKLQGGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAKEEFEHQOKE
hHsp70-2 543 NALESYTYNFKQTVED--EKLKGGKISEQDKNKILDKCQEVINWLDNRQMAEKDEVEHKOKE
hHsp70-6 542 NSLEAHVHFHVKGSLOE--ESLRDKIPEEDRRKMQDKCREVLAWLEHNQLAEKEEVEHOKRE
hHsp70-5 563 NELESYAVSLKNQIGDKKELGGKLSSEDKETMEKAVEEKTIEWLESHQDADIEDFKAKKKE
hHsp70-9 583 NMAEGIIHDTETKME--FKDQLPADECNKLKEEISKMRELLARKDSETGENIRQAASS
DnaK 537 NQGDHLLHSTRKQVEE--AGDKLPADDKTAIESALTALETA LKGEDK---AAIEAKMQE

hHsp70-1a 599 LEQVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQ-----GPKGGSGSGPTIEEVD
hHsp70-1b 599 LEQVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQ-----GPKGGSGSGPTIEEVD
hHsp70-1t 601 LEQMCNPIITKLYQGCGCTG--PACGTG-----YVPGRPATGPTIEEVD
hHsc70 599 LEKVCNPIITKLYQSAGGMPGMPG---GFPGGGAPPSSGGASSGPTIEEVD
bHsc70 599 LEKVCNPIITKLYQSAGGMPGMPGMPGMPGPGGFPGGGAPPSSGGASSGPTIEEVD
hHsp70-2 602 LERVNPIISKLYQGGP-----GGSGGGSGSGASSGPTIEEVD
hHsp70-6 601 LEQICRPIFSRLYGGPGVPGGSSCGTQAR-----QGDPTGPIIEEVD
hHsp70-5 623 LEIIVQPIISKLYGSAGPPPTGEEDTAEKDEL-----
hHsp70-9 640 LQQASLKLFEAMVKKMASERESESGSSSGTGEQKEDQKEEKQ-----
DnaK 591 LAQVSQKLMETIAQQQHAQQQTAGADASANNAKDDDDVVDAEFEEVKDKK----

VI.3 Übersicht über in der PDB publizierte Hsp70-Tertiärstrukturen

Übersicht über experimentell aufgeklärte Tertiärstrukturen verschiedener Hsp70-Isoformen der Organismen *Homo sapiens*, *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans* und *Rattus norvegicus* (Stand November 2008).

PDB-Code	Domänen	Isoform	Aminosäuren	Organismus
1HJO	NBD	Hsp70-1	380	<i>Homo sapiens</i>
1S3X	NBD	Hsp70-1	382	<i>Homo sapiens</i>
1XQS	NBD	HspBP1	190	<i>Homo sapiens</i>
2E88	NBD	Hsp70-1	391	<i>Homo sapiens</i>
2E8A	NBD	Hsp70-1	391	<i>Homo sapiens</i>
3D2E	NBD	Hsp70-1	382	<i>Homo sapiens</i>
3D2F	NBD	Hsp70-1	382	<i>Homo sapiens</i>
1ATR	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1ATS	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1BA0	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1BA1	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1BUP	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1HPM	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1HX1	NBD	Hsc70	378	<i>Bos taurus</i>
1KAX	NBD	Hsc70	380	<i>Bos taurus</i>
1KAY	NBD	Hsc70	380	<i>Bos taurus</i>
1KAZ	NBD	Hsc70	380	<i>Bos taurus</i>
1NGA	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGB	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGC	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGD	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGE	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGF	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGG	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGH	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1NGI	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1QQM	NBD	Hsc70	375	<i>Bos taurus</i>
1QQN	NBD	Hsc70	375	<i>Bos taurus</i>
1QQO	NBD	Hsc70	375	<i>Bos taurus</i>

1YUW	NBD, SBD	Hsc70	554	<i>Bos taurus</i>
2BUP	NBD	Hsc70	380	<i>Bos taurus</i>
3HSC	NBD	Hsc70	386	<i>Bos taurus</i>
1BPR	SBD	DnaK	172	<i>E. coli</i>
1DG4	SBD	DnaK	114	<i>E. coli</i>
1DKG	NBD	DnaK	383	<i>E. coli</i>
1DKX	SBD	DnaK	218	<i>E. coli</i>
1DKY	SBD	DnaK	218	<i>E. coli</i>
1DKZ	SBD	DnaK	218	<i>E. coli</i>
1Q5L	SBD	DnaK	116	<i>E. coli</i>
1U00	SBD	HscA	155	<i>E. coli</i>
2BPR	SBD	DnaK	172	<i>E. coli</i>
2P32	SBD	Hsp70A	120	<i>C. elegans</i>
1CKR	SBD	Hsc70	159	<i>Rattus norvegicus</i>
1UD0	SBD	Hsc70	105	<i>Rattus norvegicus</i>
7HSC	SBD	Hsc70	159	<i>Rattus norvegicus</i>

VI.4 Ergebnisse der computergestützten Suche nach der Hsp70-Bindestelle von Apoptozol mittels Cross-Dockingverfahren

VI.4.1 Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an der Nukleotid-bindetasche von Hsc70

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die jeweils für die Dockinglösungen der einzelnen Cluster berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG), der intermolekularen Energie hinsichtlich des resultierenden Protein-Ligand-Komplexes, der inneren Energie der Ligandenkonformation und über die Anzahl der Dockinglösungen je Clusterrang. Bei mehreren Dockinglösungen in einem Cluster sind stellvertretend die Werte der insgesamt bestbewerteten Bindepose angegeben.

Clusterrang	ΔG [kcal/mol]	Intermolekulare Energie [kcal/mol]	Innere Energie [kcal/mol]	Anzahl der Dockinglösungen
1	-13,19	-16,30	11,37	2
2	-10,59	-13,70	11,14	2
3	-9,89	-13,01	10,67	5
4	-11,69	-14,80	12,92	2
5	-9,98	-13,09	11,46	2
6	-8,74	-11,85	10,91	3
7	-9,65	-12,76	11,95	1
8	-9,27	-12,39	11,65	5
9	-8,35	-11,47	10,94	3
10	-8,75	-11,86	11,45	4
11	-8,67	-11,78	11,47	1
12	-8,60	-11,71	11,50	1
13	-7,41	-10,52	10,73	4
14	-8,17	-11,28	11,79	2
15	-7,44	-10,55	11,30	2
16	-7,10	-10,22	11,09	1
17	-6,65	-9,76	10,81	1
18	-6,36	-9,47	10,75	2
19	-7,49	-10,60	12,05	1
20	-5,63	-8,74	10,33	1
21	-7,49	-10,60	12,39	2
22	-5,72	-8,83	10,71	1

23	-7,17	-10,28	12,25	1
24	-6,98	-10,10	12,37	1

VI.4.2 Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an der Substratbindetasche von Hsc70

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die jeweils für die Dockinglösungen der einzelnen Cluster berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG), der intermolekularen Energie hinsichtlich des resultierenden Protein-Ligand-Komplexes, der inneren Energie der Ligandenkonformation und über die Anzahl der Dockinglösungen je Clusterrang. Bei mehreren Dockinglösungen in einem Cluster sind stellvertretend die Werte der insgesamt bestbewerteten Bindepose angegeben.

Clusterrang	ΔG [kcal/mol]	Intermolekulare Energie [kcal/mol]	Innere Energie [kcal/mol]	Anzahl der Dockinglösungen
1	-10,49	-13,61	10,79	5
2	-10,36	-13,47	11,14	2
3	-9,35	-12,46	10,70	2
4	-9,07	-12,18	10,45	1
5	-9,03	-12,14	10,47	7
6	-8,76	-11,87	10,31	2
7	-8,84	-11,96	10,51	1
8	-8,84	-11,95	10,63	1
9	-8,98	-12,09	10,78	3
10	-8,81	-11,93	10,64	1
11	-8,44	-11,55	10,44	7
12	-8,53	-11,65	10,61	1
13	-8,55	-11,66	10,80	3
14	-8,30	-11,41	10,66	2
15	-7,93	-11,04	10,31	1
16	-8,44	-11,55	10,85	2
17	-7,98	-11,10	10,41	2
18	-8,33	-11,45	10,84	1
19	-7,96	-11,08	10,49	1
20	-8,47	-11,58	11,03	1
21	-7,82	-10,93	10,48	1
22	-6,90	-10,02	10,73	1
23	-6,70	-9,81	10,67	1
24	-6,80	-9,92	10,92	1

VI.4.3 Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an dem Interdomäneninterface von Hsc70

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die jeweils für die Dockinglösungen der einzelnen Cluster berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG), der intermolekularen Energie hinsichtlich des resultierenden Protein-Ligand-Komplexes, der inneren Energie der Ligandenkonformation und über die Anzahl der Dockinglösungen je Clusterrang. Bei mehreren Dockinglösungen in einem Cluster sind stellvertretend die Werte der insgesamt bestbewerteten Bindepose angegeben.

Clusterrang	ΔG [kcal/mol]	Intermolekulare Energie [kcal/mol]	Innere Energie [kcal/mol]	Anzahl der Dockinglösungen
1	-12,23	-15,34	10,50	7
2	-11,25	-14,36	10,76	2
3	-10,76	-13,87	11,23	5
4	-10,71	-13,82	11,25	3
5	-10,90	-14,02	11,75	1
6	-9,91	-13,02	10,82	3
7	-9,63	-12,75	10,60	3
8	-9,64	-12,75	10,65	4
9	-10,13	-13,24	11,15	2
10	-10,39	-13,50	11,45	2
11	-9,43	-12,55	10,52	5
12	-9,73	-12,84	10,81	1
13	-10,37	-13,48	11,81	1
14	-9,24	-12,35	10,70	1
15	-10,00	-13,11	11,47	1
16	-10,15	-13,26	11,90	1
17	-8,79	-11,90	10,63	1
18	-8,99	-12,11	11,11	2
19	-8,64	-11,76	11,04	1
20	-8,15	-11,27	10,64	1
21	-9,21	-12,32	11,96	2
22	-8,64	-11,76	11,46	1

VI.4.4 Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an der Zweidomänenstruktur von Hsc70

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die jeweils für die Dockinglösungen der einzelnen Cluster berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG), der intermolekularen Energie hinsichtlich des resultierenden Protein-Ligand-Komplexes, der inneren Energie der Ligandenkonformation und über die Anzahl der Dockinglösungen je Clusterrang. Bei mehreren Dockinglösungen in einem Cluster sind stellvertretend die Werte der insgesamt bestbewerteten Bindepose angegeben.

Clusterrang	ΔG [kcal/mol]	Intermolekulare Energie [kcal/mol]	Innere Energie [kcal/mol]	Anzahl der Dockinglösungen
1	-9,30	-12,41	10,80	1
2	-8,35	-11,47	10,47	1
3	-8,23	-11,35	10,58	1
4	-8,04	-11,15	10,43	1
5	-7,89	-11,00	10,48	1
6	-7,86	-10,97	10,52	1
7	-8,05	-11,17	10,72	1
8	-7,64	-10,75	10,65	1
9	-7,30	-10,41	10,44	1
10	-7,41	-10,52	10,63	1
11	-7,30	-10,41	10,56	1
12	-7,16	-10,27	10,48	1
13	-6,93	-10,04	10,36	1
14	-7,56	-10,67	11,05	1
15	-6,72	-9,84	10,33	1
16	-6,81	-9,92	10,45	1
17	-6,85	-9,96	10,53	1
18	-6,95	-10,06	10,65	1
19	-6,68	-9,80	10,48	2
20	-6,59	-9,71	10,42	1
21	-6,86	-9,98	10,85	1
22	-6,32	-9,43	10,33	1
23	-6,77	-9,89	10,79	1
24	-6,38	-9,49	10,46	1
25	-6,19	-9,31	10,36	1

26	-6,15	-9,26	10,35	1
27	-6,04	-9,15	10,39	1
28	-6,18	-9,29	10,54	1
29	-6,08	-9,19	10,47	1
30	-6,22	-9,33	10,72	1
31	-5,90	-9,02	10,47	1
32	-5,68	-8,80	10,26	1
33	-5,77	-8,88	10,35	1
34	-5,79	-8,90	10,40	1
35	-5,88	-8,99	10,50	2
36	-5,69	-8,80	10,41	1
37	-5,76	-8,87	10,60	1
38	-5,54	-8,65	10,41	1
39	-6,04	-9,15	10,96	2
40	-5,63	-8,74	10,59	1
41	-5,60	-8,72	10,64	1
42	-6,47	-9,58	11,51	1
43	-5,35	-8,47	10,40	1
44	-5,39	-8,50	10,47	1
45	-5,43	-8,55	10,53	1
46	-5,19	-8,30	10,28	1
47	-5,59	-8,70	10,69	1
48	-5,95	-9,07	11,07	1
49	-5,16	-8,28	10,35	1
50	-5,19	-8,31	10,52	1
51	-4,92	-8,03	10,28	1
52	-5,07	-8,19	10,44	1
53	-5,08	-8,19	10,50	1
54	-4,91	-8,02	10,36	1

55	-4,95	-8,06	10,44	1
56	-5,10	-8,22	10,63	1
57	-4,81	-7,93	10,38	1
58	-4,80	-7,91	10,38	1
59	-4,96	-8,08	10,56	1
60	-5,13	-8,24	10,77	1
61	-4,65	-7,76	10,31	1
62	-4,84	-7,96	10,52	1
63	-5,29	-8,40	10,97	1
64	-4,92	-8,03	10,61	1
65	-5,07	-8,18	10,81	1
66	-4,83	-7,94	10,58	1
67	-4,67	-7,79	10,44	1
68	-4,80	-7,91	10,57	1
69	-5,36	-8,47	11,14	1
70	-4,58	-7,69	10,37	1
71	-4,54	-7,66	10,40	1
72	-5,71	-8,82	11,60	1
73	-4,58	-7,70	10,53	1
74	-4,35	-7,47	10,35	1
75	-4,34	-7,45	10,35	1
76	-4,43	-7,54	10,44	1
77	-4,20	-7,32	10,24	1
78	-4,76	-7,88	10,82	1
79	-4,17	-7,28	10,26	1
80	-4,31	-7,42	10,44	1
81	-4,31	-7,42	10,45	1
82	-4,29	-7,40	10,46	1
83	-4,21	-7,33	10,39	1

84	-4,32	-7,43	10,55	1
85	-4,12	-7,23	10,36	1
86	-4,13	-7,25	10,43	1
87	-4,09	-7,20	10,43	1
88	-4,22	-7,33	10,57	1
89	-3,87	-6,98	10,33	1
90	-3,86	-6,97	10,44	1
91	-4,06	-7,17	10,65	1
92	-4,24	-7,35	10,99	1
93	-4,03	-7,14	10,81	1
94	-3,91	-7,03	10,78	1
95	-3,74	-6,85	10,62	1
96	-3,42	-6,53	10,45	1
97	-3,29	-6,40	10,65	1

VI.4.5 Ergebnisse des Dockingverfahrens von Apoptozol an einer erweiterten Zweidomänenstruktur von Hsc70

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die jeweils für die Dockinglösungen der einzelnen Cluster berechneten freien Bindungsenthalpie (ΔG), der intermolekularen Energie hinsichtlich des resultierenden Protein-Ligand-Komplexes, der inneren Energie der Ligandenkonformation und über die Anzahl der Dockinglösungen je Clusterrang. Bei mehreren Dockinglösungen in einem Cluster sind stellvertretend die Werte der insgesamt bestbewerteten Bindepose angegeben.

Clusterrang	ΔG [kcal/mol]	Intermolekulare Energie [kcal/mol]	Innere Energie [kcal/mol]	Anzahl der Dockinglösungen
1	-10,49	-13,61	11,21	1
2	-8,63	-11,74	10,50	1
3	-8,06	-11,17	10,32	1
4	-8,66	-11,77	10,92	1
5	-8,12	-11,24	10,65	1
6	-7,91	-11,02	10,53	1
7	-7,88	-10,99	10,71	1
8	-7,89	-11,01	10,89	1
9	-7,64	-10,75	10,69	1
10	-7,17	-10,28	10,49	1
11	-7,34	-10,45	10,68	1
12	-7,13	-10,24	10,50	1
13	-6,97	-10,08	10,36	1
14	-7,00	-10,11	10,41	1
15	-7,01	-10,12	10,53	1
16	-6,80	-9,92	10,33	2
17	-6,69	-9,81	10,27	1
18	-7,10	-10,21	10,71	1
19	-6,91	-10,02	10,56	2
20	-7,38	-10,50	11,15	1
21	-6,79	-9,90	10,58	1
22	-6,96	-10,07	10,82	1
23	-7,02	-10,13	10,90	1
24	-6,48	-9,59	10,41	1
25	-7,09	-10,20	11,08	1

26	-7,31	-10,43	11,33	1
27	-6,25	-9,36	10,29	1
28	-6,12	-9,23	10,19	1
29	-6,60	-9,71	10,68	1
30	-6,38	-9,49	10,49	3
31	-6,32	-9,44	10,46	2
32	-6,50	-9,61	10,70	1
33	-6,34	-9,45	10,58	1
34	-6,48	-9,59	10,80	2
35	-6,34	-9,45	10,67	1
36	-5,98	-9,09	10,36	1
37	-6,16	-9,27	10,55	1
38	-6,71	-9,82	11,11	2
39	-6,05	-9,17	10,48	1
40	-5,99	-9,10	10,45	1
41	-5,83	-8,95	10,39	1
42	-6,66	-9,77	11,23	1
43	-5,94	-9,05	10,53	1
44	-5,99	-9,10	10,59	1
45	-6,02	-9,13	10,66	1
46	-5,86	-8,97	10,50	1
47	-5,88	-8,99	10,58	1
48	-5,68	-8,79	10,40	1
49	-5,81	-8,92	10,53	1
50	-5,57	-8,68	10,33	1
51	-5,57	-8,68	10,49	1
52	-5,72	-8,84	10,70	1
53	-5,84	-8,95	10,82	1
54	-5,40	-8,52	10,42	1

55	-5,58	-8,70	10,61	1
56	-5,61	-8,72	10,66	1
57	-5,55	-8,66	10,62	1
58	-5,68	-8,79	10,77	1
59	-5,15	-8,26	10,34	1
60	-6,44	-9,55	11,65	1
61	-5,26	-8,37	10,50	1
62	-5,13	-8,25	10,45	1
63	-5,08	-8,19	10,44	1
64	-5,21	-8,32	10,58	1
65	-5,14	-8,25	10,54	1
66	-4,95	-8,06	10,38	1
67	-4,84	-7,95	10,28	1
68	-5,32	-8,43	10,76	1
69	-4,86	-7,97	10,33	1
70	-5,12	-8,23	10,59	1
71	-4,80	-7,91	10,35	1
72	-5,14	-8,25	10,69	1
73	-5,02	-8,13	10,56	1
74	-4,95	-8,06	10,65	1
75	-4,95	-8,06	10,65	2
76	-4,76	-7,87	10,46	1
77	-5,21	-8,32	10,92	1
78	-4,68	-7,79	10,41	1
79	-4,68	-7,79	10,44	1
80	-5,16	-8,28	10,93	1
81	-5,08	-8,19	10,88	1
82	-4,66	-7,78	10,47	1
83	-4,44	-7,56	10,37	1

84	-4,35	-7,46	10,34	1
85	-4,38	-7,49	10,45	2
86	-4,71	-7,82	10,79	1
87	-4,36	-7,47	10,68	1
88	-3,87	-6,98	10,23	1
89	-3,90	-7,01	10,44	1
90	-3,79	-6,90	10,38	1
91	-3,95	-7,07	10,73	1

VI.5 Affinitätsrangliste auf der Grundlage eines Consensus-Scorings

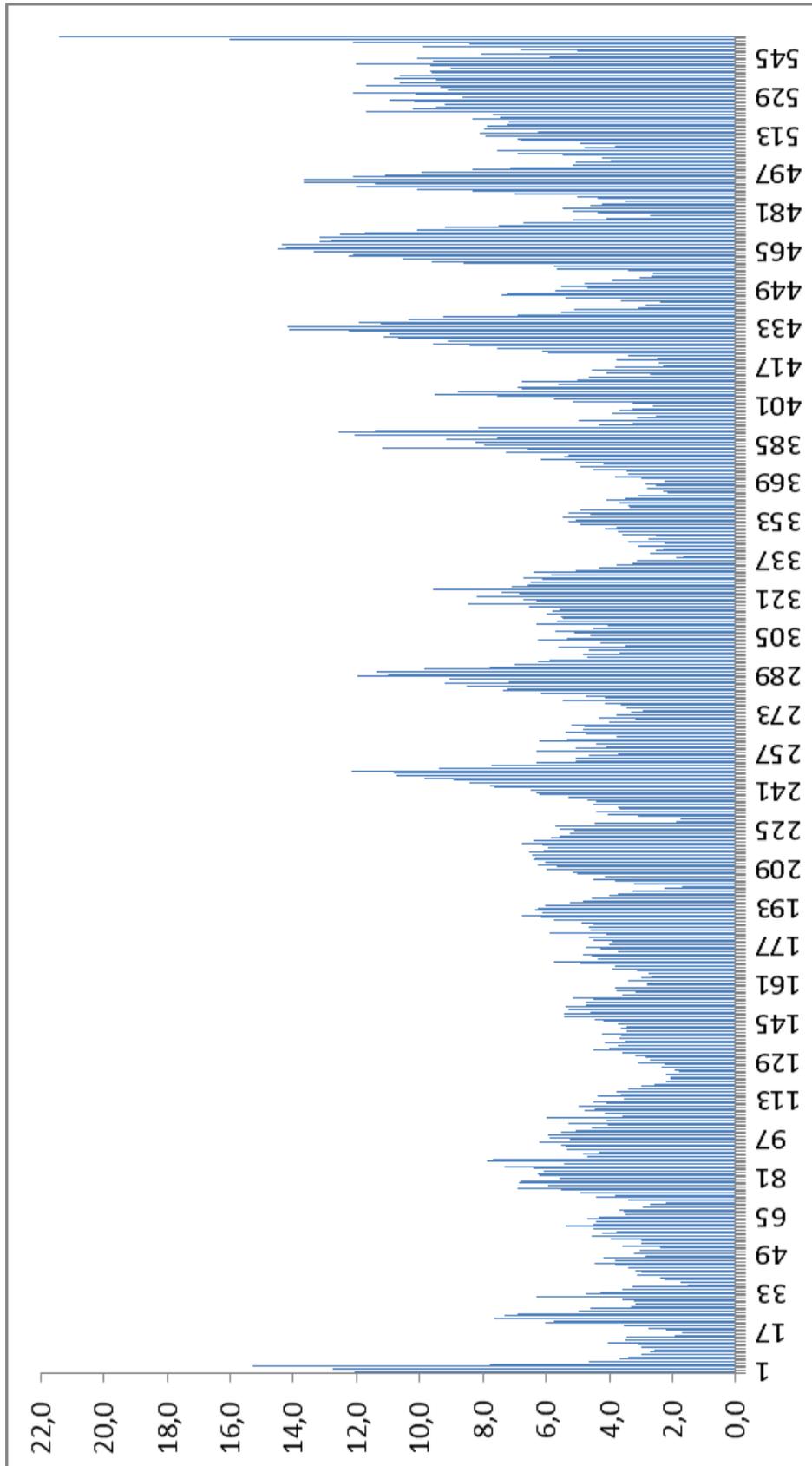
Die dargestellte Tabelle umfasst die jeweiligen Ränge, die anhand der vom Dockingprogramm *AutoDock3.0* (AD) berechneten freien Bindungsenthalpien und der vom Scoringprogramm *SFCscore* (SFC) berechneten pK_i -Werte abgeleitet wurden. Außerdem sind der jeweils aus beiden Rängen resultierende Rangmittelwert sowie der jeweils zugewiesene Affinitätsrang der verbliebenen 55 Moleküle mit einem Rangmittelwert von mindestens 15 der Affinitätsränge 1 bis 20 von 77 angegeben. Als Vergleichsgröße diente der bekannte Hsp70-Ligand Apoptozol (Az), dem der Affinitätsrang 8 zugewiesen werden würde (*).

Ligand	AD Rang	SFC Rang	Rangmittelwert	Affinitätsrang
Az	8	10	9,0	8*
1	6	3	4,5	1
2	5	5	5,0	2
3	4	6	5,0	2
4	9	2	5,5	3
5	2	10	6,0	4
6	8	7	7,5	5
7	10	5	7,5	5
8	13	2	7,5	5
9	3	13	8,0	6
10	11	5	8,0	6
11	7	9	8,0	6
12	13	4	8,5	7
13	12	5	8,5	7
14	11	6	8,5	7
15	8	9	8,5	7
16	11	7	9,0	8
17	16	2	9,0	8
18	9	10	9,5	9
19	12	7	9,5	9
20	11	9	10,0	10
21	19	1	10,0	10
22	1	20	10,5	11
23	9	12	10,5	11
24	10	11	10,5	11
25	16	5	10,5	11
26	13	9	11,0	12

27	17	5	11,0	12
28	14	8	11,0	12
29	10	12	11,0	12
30	7	15	11,0	12
31	12	11	11,5	13
32	19	4	11,5	13
33	15	8	11,5	13
34	18	5	11,5	13
35	9	15	12,0	14
36	13	11	12,0	14
37	9	15	12,0	14
38	17	7	12,0	14
39	15	10	12,5	15
40	14	11	12,5	15
41	12	14	13,0	16
42	15	12	13,5	17
43	20	7	13,5	17
44	16	11	13,5	17
45	17	11	14,0	18
46	21	7	14,0	18
47	18	11	14,5	19
48	23	6	14,5	19
49	20	9	14,5	19
50	13	17	15,0	20
51	18	12	15,0	20
52	17	13	15,0	20
53	13	17	15,0	20
54	21	9	15,0	20
55	17	13	15,0	20

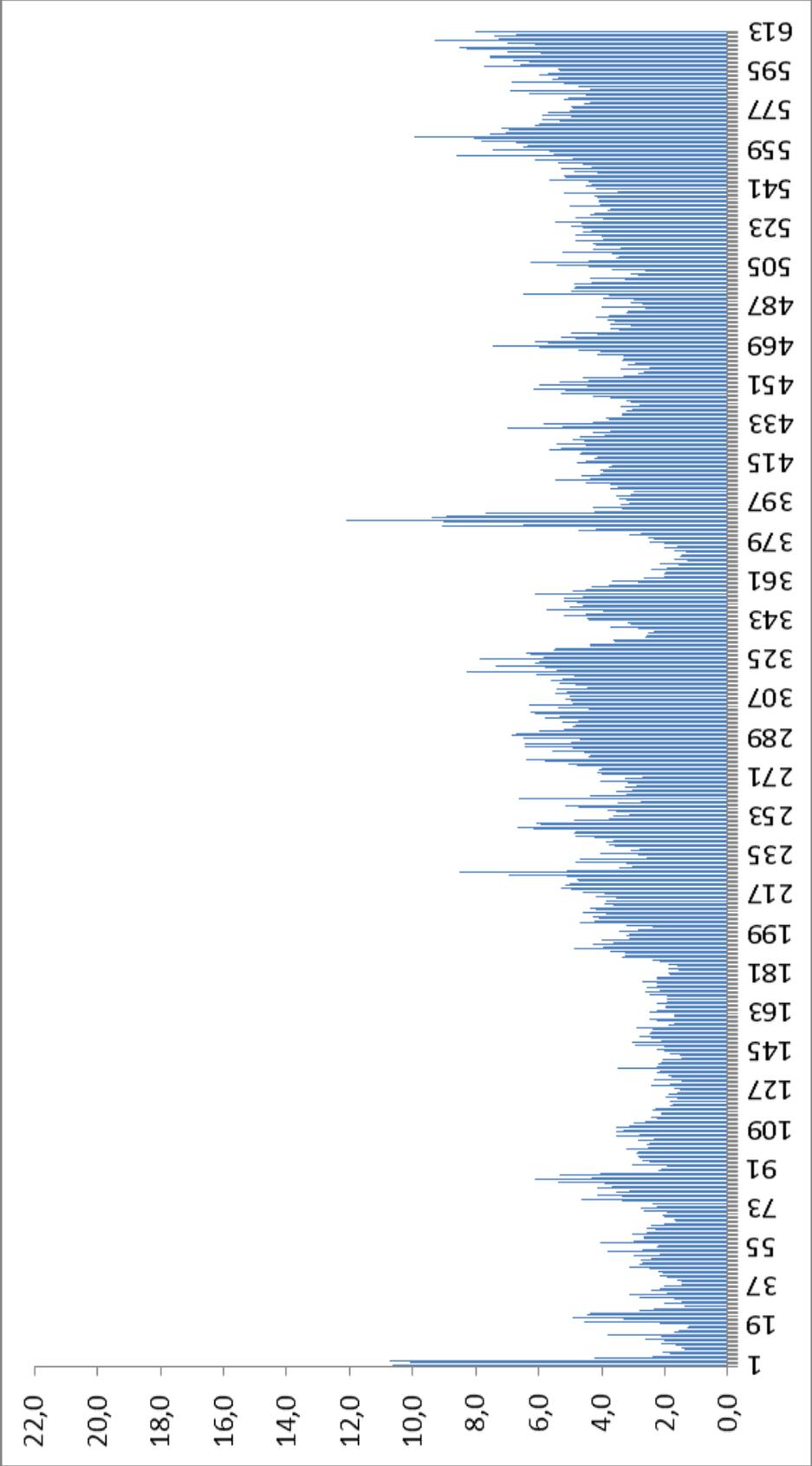
VI.6 Ergebnisse der RMSD-Wert Analysen der MD Simulationen

VI.6.1 Molekulardynamik Simulation von Hsc70



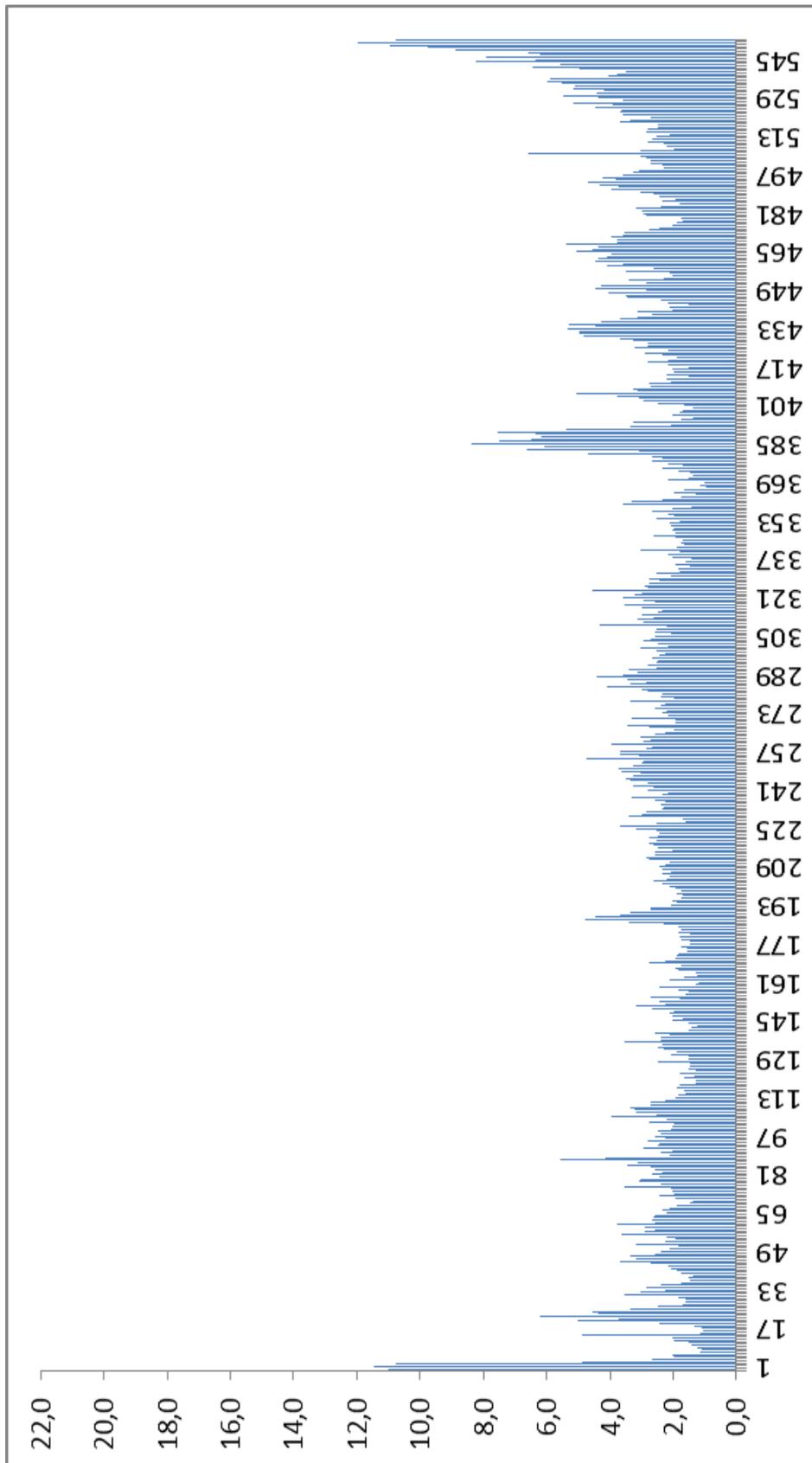
Darstellung der berechneten RMSD-Mittelwerte aller 554 Aminosäuren der bHsc70-Enzymstruktur 1YUW auf Grundlage der entsprechenden MD Simulation. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung aller Aminosäurenatome.

VI.6.2 Molekulardynamik Simulation von HM-Hsc70



Darstellung der berechneten RMSD-Mittelwerte aller 613 Aminosäuren der HM-Hsc70-Enzymstruktur auf Grundlage der entsprechenden MD Simulation. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung aller Aminosäurenatome.

VI.6.3 Molekulardynamik Simulation einer Hsc70-Az-Komplexstruktur



Darstellung der berechneten RMSD-Mittelwerte aller 554 Aminosäuren der Hsc70-Enzymstruktur 1YUW auf Grundlage der entsprechenden MD Simulation. Die Berechnung erfolgte unter Berücksichtigung aller Aminosäurenatome.

VI.7 Abkürzungsverzeichnis

ΔG	freie Bindungsenthalpie
15-DSG	15-Deoxyspergualin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	glycosylierte Endprodukte
AIF	Apoptosis inducing factor
Ala	Alanin
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
APlasen	Amidischen Peptidbindungs-cis/trans-Isomerasen
AR	Aldose Reduktase
Arg	Arginin
ARI	Aldose Reduktase Inhibitor
ARL	Aldose Reduktase Ligand
As	Aminosäuren
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
Az	Apoptozol
bHsc70	bovines Heat shock cognate 70
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bzw.	beziehungsweise
CCG	Chemical Computing Group
CHIP	Channel forming integral protein
clogP	berechneter Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
CSD	Cambridge Structural Databank
Cys	Cystein
Da	Dalton, 1 Da = 1g/mol
DAG	Diacylglycerol
DB	Datenbank
d.h.	das heißt
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
E. coli	Escherichia coli
engl.	englisch

et al.	et alii
GA	Genetischer Algorithmus
Gl.	Gleichung
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOLD	Genetic Optimization of Ligand Docking
GUI	Graphical User Interface
H-Brücken	Wasserstoffbrückenbindungen
H-Brückenakzeptor	Wasserstoffbrückenakzeptor
H-Brückendonor	Wasserstoffbrückendonor
hHsc70	humanes Heat shock cognate 70
HIL	Hsp70-Interfaceligand
His	Histidin
HM	Homologiemodell
Hsc	Heat shock cognate
Hsf1	Hitzeschocktranskriptionsfaktor 1
Hsp	Hitzeschockprotein/e
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
HTS	High Throughput Screening
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ile	Isoleucin
ISCD	<i>in situ</i> Cross-Docking
JDP	J-Domänen Protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KFO 216	Klinische Forschergruppe 216
K _i	Inhibitionskonstante
K.I.	Konturlevel
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
Leu	Leucin
LGA	Lamarckian Genetic Algorithm
Lys	Lysin
MD	Molekulardynamik
Met	Methionin

MM	Molekularmechanik, Multiples Myelom
MMFF	Merck Molecular Force Field
MOE	Molecular Operating Environment
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBD	Nukleotidbindedomäne
NEF	Nucleotide exchange factor (Nukleotidaustauschfaktor)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
PES	Phenylethinsulfonamid
Phe	Phenylalanin
PKC	Proteinkinase C
PPI	Phenyl-Pyridazinon-Inhibitor
Pro	Prolin
QM	Quantenmechanik
RESP	Restrained Electrostatic Potential
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMS	Root Mean Square
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SBD	Substratbindedomäne
SDH	Sorbitol Dehydrogenase
Sek	Sekunden
Ser	Serin
SFC	Scoring Function Consortium
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SMARTS	SMILES Arbitrary Target Specification
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
SVL	Scientific Vector Language
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin

TMAO	Trimethylaminoxid
TMAOD	Trimethylaminoxidderivat
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
Val	Valin
vgl.	vergleiche
VMD	Visual Molecular Dynamics
VS	Virtuelles Screening
z. B.	zum Beispiel
ZINC	ZINC Is Not Commercial

VII Literaturverzeichnis

1. Inglese J. Expanding the HTS paradigm. *Drug discovery today* **2002**;7:S105-6.
2. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug discovery today* **2006**;11:580-94.
3. Sottriffer CA. Virtual Screening. Principles, Challenges, and Practical Guidelines. 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
4. Böhm HJ, Klebe G, Kubinyi H. Wirkstoffdesign. 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2002**.
5. Kubinyi H. Success Stories of Computer-Aided Design. In: Ekins S (Hrsg.). Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development. John Wiley & Sons, Inc., **2006**;377-424.
6. Teague SJ, Davis AM, Leeson PD, Oprea T. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. *Angewandte Chemie* **1999**;38:3743-8.
7. Oprea TI, Davis AM, Teague SJ, Leeson PD. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. *Journal of chemical information and computer sciences* **2001**;41:1308-15.
8. Proudfoot JR. Drugs, leads, and drug-likeness: an analysis of some recently launched drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2002**;12:1647-50.
9. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews* **1997**;23:3-25.
10. Schnecke V, Bostrom J. Computational chemistry-driven decision making in lead generation. *Drug discovery today* **2006**;11:43-50.
11. Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature reviews Drug discovery* **2006**;5:821-34.
12. Zhao S, Goodsell DS, Olson AJ. Analysis of a data set of paired uncomplexed protein structures: new metrics for side-chain flexibility and model evaluation. *Proteins* **2001**;43:271-9.
13. Najmanovich R, Kuttner J, Sobolev V, Edelman M. Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins* **2000**;39:261-8.
14. Eisenmesser EZ, Millet O, Labeikovsky W, Korzhnev DM, Wolf-Watz M, Bosco DA, Skalicky JJ, Kay LE, Kern D. Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis. *Nature* **2005**;438:117-21.
15. Fischer E. Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber Dtsch Chem Ges* **1894**;27:2985-93.
16. Pauling L. Molecular architecture and biological reactions. *Chemical & Engineering News* **1946**;24:1375-7.
17. Koshland DE. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1958**;44:98-104.
18. Freire E. Statistical thermodynamic linkage between conformational and binding equilibria. *Advances in protein chemistry* **1998**;51:255-79.

19. Ma B, Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Folding funnels and binding mechanisms. *Protein engineering* **1999**;12:713-20.
20. Durrant JD, McCammon JA. Computer-aided drug-discovery techniques that account for receptor flexibility. *Current opinion in pharmacology* **2010**;10:770-4.
21. Jiang F, Kim SH. "Soft docking": matching of molecular surface cubes. *J Mol Biol* **1991**;219:79-102.
22. Leach AR. Ligand docking to proteins with discrete side-chain flexibility. *J Mol Biol* **1994**;235:345-56.
23. Anderson AC, O'Neil RH, Surti TS, Stroud RM. Approaches to solving the rigid receptor problem by identifying a minimal set of flexible residues during ligand docking. *Chemistry & biology* **2001**;8:445-57.
24. Yang AY, Kallblad P, Mancera RL. Molecular modelling prediction of ligand binding site flexibility. *Journal of computer-aided molecular design* **2004**;18:235-50.
25. Cavasotto CN, Abagyan RA. Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. *J Mol Biol* **2004**;337:209-25.
26. Totrov M, Abagyan R. Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates. *Proteins* **1997**;Suppl 1:215-20.
27. Krol M, Tournier AL, Bates PA. Flexible relaxation of rigid-body docking solutions. *Proteins* **2007**;68:159-69.
28. Damm KL, Carlson HA. Exploring experimental sources of multiple protein conformations in structure-based drug design. *Journal of the American Chemical Society* **2007**;129:8225-35.
29. Mangoni M, Roccatano D, Di Nola A. Docking of flexible ligands to flexible receptors in solution by molecular dynamics simulation. *Proteins* **1999**;35:153-62.
30. Claussen H, Buning C, Rarey M, Lengauer T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. *J Mol Biol* **2001**;308:377-95.
31. Totrov M, Abagyan R. Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Current opinion in structural biology* **2008**;18:178-84.
32. Lin JH, Perryman AL, Schames JR, McCammon JA. Computational drug design accommodating receptor flexibility: the relaxed complex scheme. *Journal of the American Chemical Society* **2002**;124:5632-3.
33. Lin JH, Perryman AL, Schames JR, McCammon JA. The relaxed complex method: Accommodating receptor flexibility for drug design with an improved scoring scheme. *Biopolymers* **2003**;68:47-62.
34. Osterberg F, Morris GM, Sanner MF, Olson AJ, Goodsell DS. Automated docking to multiple target structures: incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AutoDock. *Proteins* **2002**;46:34-40.
35. Carlson HA, Masukawa KM, Rubins K, Bushman FD, Jorgensen WL, Lins RD, Briggs JM, McCammon JA. Developing a dynamic pharmacophore model for HIV-1 integrase. *J Med Chem* **2000**;43:2100-14.
36. Davis AM, Teague SJ, Kleywegt GJ. Anwendung und Grenzen kristallographischer Daten im strukturbezogenen Liganden- und Wirkstoff-Design. *Angew Chem* **2003**;115:2822-41.

37. Gutberlet T, Heinemann U, Steiner M. Protein crystallography with neutrons - status and perspectives. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **2001**;57:349-54.
38. Drenth J. Principles of Protein X-ray Crystallography. *Springer*, New York, **1994**.
39. Jones TA, Kjeldgaard M. Electron-density map interpretation. *Methods in enzymology* **1997**;277:173-208.
40. Howard EI, Sanishvili R, Cachau RE, Mitschler A, Chevrier B, Barth P, Lamour V, Van Zandt M, Sibley E, Bon C, Moras D, Schneider TR, Joachimiak A, Podjarny A. Ultrahigh resolution drug design I: details of interactions in human aldose reductase-inhibitor complex at 0.66 Å. *Proteins* **2004**;55:792-804.
41. Leszczynski JF, Rose GD. Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure. *Science* **1986**;234:849-55.
42. Simon B, Madl T, Mackereth CD, Nilges M, Sattler M. An efficient protocol for NMR-spectroscopy-based structure determination of protein complexes in solution. *Angewandte Chemie* **2010**;49:1967-70.
43. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* **2000**;28:235-42.
44. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 0.99, Schrödinger, LLC.
45. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* **1985**;28:849-57.
46. Wade RC, Clark KJ, Goodford PJ. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. *J Med Chem* **1993**;36:140-7.
47. Wade RC, Goodford PJ. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. *J Med Chem* **1993**;36:148-56.
48. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson DJ, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of computational chemistry* **1983**;4:187-217.
49. Gohlke H, Hendlich M, Klebe G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J Mol Biol* **2000**;295:337-56.
50. Velec HF, Gohlke H, Klebe G. DrugScore(CSD)-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. *J Med Chem* **2005**;48:6296-303.
51. Allen FH. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta crystallographica Section B, Structural science* **2002**;58:380-8.
52. Wermuth CG, Ganellin CR, Lindberg P, Mitscher LA. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1997). *Ann Rep Med Chem* **1998**;33:385-95.
53. www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#p7.
54. Chemical Computing Group. Molecular Operating Environment (MOE), Version 2007.09. Quebec, Canada, 2007.

55. Chemical Computing Group. Molecular Operating Environment (MOE), Version 2009.10. Quebec, Canada, 2009.
56. Weininger D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of chemical information and computer sciences* **1988**;28:31-6.
57. James CA, Weininger D. Daylight Theory Manual. Daylight Chemical Information Systems, Inc., Los Altos, CA, USA, **2006**.
58. Rarey M, Dixon JS. Feature trees: a new molecular similarity measure based on tree matching. *Journal of computer-aided molecular design* **1998**;12:471-90.
59. Rarey M, Stahl M. Similarity searching in large combinatorial chemistry spaces. *Journal of computer-aided molecular design* **2001**;15:497-520.
60. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* **2004**;47:1739-49.
61. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry* **1998**;19:1639-62.
62. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **2003**;52:609-23.
63. Rarey M, Kramer B, Lengauer T, Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol* **1996**;261:470-89.
64. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol* **1982**;161:269-88.
65. Ewing TJ, Makino S, Skillman AG, Kuntz ID. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of computer-aided molecular design* **2001**;15:411-28.
66. Willett P. Genetic algorithms in molecular recognition and design. *Trends in biotechnology* **1995**;13:516-21.
67. Böhm HJ. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *Journal of computer-aided molecular design* **1994**;8:243-56.
68. Gasteiger J, Marsili M. New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules. *Tetrahedron Letters* **1978**:3181-4.
69. Solis FJ, Wets RJB. Minimization by Random Search Techniques. *Mathematics of Operations Research* **1981**;6:19-30.
70. Sotriffer CA, Dramburg I. "In situ cross-docking" to simultaneously address multiple targets. *J Med Chem* **2005**;48:3122-5.
71. Zentgraf M, Fokkens J, Sotriffer CA. Addressing protein flexibility and ligand selectivity by "in situ cross-docking". *ChemMedChem* **2006**;1:1355-9.
72. Jones G, Willett P, Glen RC. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* **1995**;245:43-53.

73. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **1997**;267:727-48.
74. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of computer-aided molecular design* **1997**;11:425-45.
75. Clark M, Cramer RD, van Opdenbosch N. Validation of the general-purpose TRIPOS 5.2 force field. *Journal of computational chemistry* **1989**;10:982-1012.
76. Sotriffer CA, Sanschagrín P, Matter H, Klebe G. SFCscore: scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes. *Proteins* **2008**;73:395-419.
77. Block P, Sotriffer CA, Dramburg I, Klebe G. AffinDB: a freely accessible database of affinities for protein-ligand complexes from the PDB. *Nucleic acids research* **2006**;34:D522-6.
78. Case DA, Cheatham III TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Jr., Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of computational chemistry* **2005**;26:1668-88.
79. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics* **1983**;79:926-35.
80. Amadei A, Linssen AB, Berendsen HJ. Essential dynamics of proteins. *Proteins* **1993**;17:412-25.
81. Cao D, Fan ST, Chung SS. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem* **1998**;273:11429-35.
82. Hers HG. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochimica et biophysica acta* **1956**;22:202-3.
83. Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *The Biochemical journal* **1997**;326(Pt 3):625-36.
84. Rondeau JM, Tete-Favier F, Podjarny A, Reymann JM, Barth P, Biellmann JF, Moras D. Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* **1992**;355:469-72.
85. Wilson DK, Bohren KM, Gabbay KH, Quijcho FA. An Unlikely Sugar Substrate Site in the 1.65 Angstrom Structure of the Human Aldose Reductase Holoenzyme Implicated in Diabetic Complications. *Science* **1992**;257:81-4.
86. Urzhumtsev A, Tete-Favier F, Mitschler A, Barbanton J, Barth P, Urzhumtseva L, Biellmann JF, Podjarny A, Moras D. A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complexes of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure* **1997**;5:601-12.
87. Sotriffer CA, Kramer O, Klebe G. Probing flexibility and "induced-fit" phenomena in aldose reductase by comparative crystal structure analysis and molecular dynamics simulations. *Proteins-Structure Function and Genetics* **2004**;56:52-66.
88. Iwata Y, Naito S, Itai A, Miyamoto S. Protein structure-based de novo design and synthesis of aldose reductase inhibitors. *Drug design and discovery* **2001**;17:349-59.

89. Bohren KM, Brownlee JM, Milne AC, Gabbay KH, Harrison DH. The structure of Apo R268A human aldose reductase: hinges and latches that control the kinetic mechanism. *Biochimica et biophysica acta* **2005**;1748:201-12.
90. Dewinter HL, Vonitzstein M. Aldose Reductase as a Target for Drug Design - Molecular Modeling Calculations on the Binding of Acyclic Sugar Substrates to the Enzyme. *Biochemistry* **1995**;34:8299-308.
91. Cachau R, Howard E, Barth P, Mitschler A, Chevrier B, Lamour V, Joachimiak A, Sanishvili R, Van Zandt M, Sibley E, Moras D, Podjarny A. Model of the catalytic mechanism of human aldose reductase based on quantum chemical calculations. *Journal De Physique Iv* **2000**;10:3-13.
92. Bohren KM, Grimshaw CE, Lai CJ, Harrison DH, Ringe D, Petsko GA, Gabbay KH. Tyrosine-48 Is the Proton Donor and Histidine-110 Directs Substrate Stereochemical Selectivity in the Reduction Reaction of Human Aldose Reductase - Enzyme-Kinetics and Crystal-Structure of the Y48h Mutant Enzyme. *Biochemistry* **1994**;33:2021-32.
93. Steuber H, Czodrowski P, Sotriffer CA, Klebe G. Tracing changes in protonation: a prerequisite to factorize thermodynamic data of inhibitor binding to aldose reductase. *J Mol Biol* **2007**;373:1305-20.
94. Kubiseski TJ, Hyndman DJ, Morjana NA, Flynn TG. Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. *J Biol Chem* **1992**;267:6510-7.
95. Grimshaw CE, Bohren KM, Lai CJ, Gabbay KH. Human aldose reductase: rate constants for a mechanism including interconversion of ternary complexes by recombinant wild-type enzyme. *Biochemistry* **1995**;34:14356-65.
96. Blakeley MP, Ruiz F, Cachau R, Hazemann I, Meilleur F, Mitschler A, Ginell S, Afonine P, Ventura ON, Cousido-Siah A, Haertlein M, Joachimiak A, Myles D, Podjarny A. Quantum model of catalysis based on a mobile proton revealed by subatomic x-ray and neutron diffraction studies of h-aldose reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**;105:1844-8.
97. Steuber H. Structural and thermodynamic characterization of inhibitor binding to Aldose Reductase: Insights into binding modes, driving forces, and selectivity determinants. Philipps-Universität Marburg, **2007**.
98. Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological reviews* **1998**;50:21-33.
99. Petrash JM, Harter TM, Murdock GL. A potential role for aldose reductase in steroid metabolism. *Advances in experimental medicine and biology* **1997**;414:465-73.
100. Oates PJ. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *International review of neurobiology* **2002**;50:325-92.
101. Bagnasco SM, Uchida S, Balaban RS, Kador PF, Burg MB. Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**;84:1718-20.
102. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *The American journal of physiology* **1995**;268:F983-96.
103. Kaneko M, Carper D, Nishimura C, Millen J, Bock M, Hohman TC. Induction of aldose reductase expression in rat kidney mesangial cells and Chinese hamster ovary cells under hypertonic conditions. *Experimental cell research* **1990**;188:135-40.

104. Henry DN, Del Monte M, Greene DA, Killen PD. Altered aldose reductase gene regulation in cultured human retinal pigment epithelial cells. *The Journal of clinical investigation* **1993**;92:617-23.
105. Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB, Garcia-Perez A. ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **1996**;271:18318-21.
106. Ko BC, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SS. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* **1997**;272:16431-7.
107. Davydov VV, Dobaeva NM, Bozhkov AI. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Experimental gerontology* **2004**;39:11-6.
108. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**;414:813-20.
109. Kolb NS, Hunsaker LA, Vander Jagt DL. Aldose reductase-catalyzed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide toxicity. *Molecular pharmacology* **1994**;45:797-801.
110. Vander Jagt DL, Robinson B, Taylor KK, Hunsaker LA. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* **1992**;267:4364-9.
111. Matsuura K, Deyashiki Y, Bunai Y, Ohya I, Hara A. Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1996**;328:265-71.
112. Tabakoff B, Anderson R, Alivisatos SG. Enzymatic reduction of "biogenic" aldehydes in brain. *Molecular pharmacology* **1973**;9:428-37.
113. Wermuth B, Burgisser H, Bohren K, von Wartburg JP. Purification and characterization of human-brain aldose reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* **1982**;127:279-84.
114. Wermuth B, Monder C. Aldose and aldehyde reductase exhibit isocorticosteroid reductase activity. *European journal of biochemistry / FEBS* **1983**;131:423-6.
115. Petrash JM, Tarle I, Wilson DK, Quiocho FA. Aldose reductase catalysis and crystallography. Insights from recent advances in enzyme structure and function. *Diabetes* **1994**;43:955-9.
116. Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Robinson B, Stangebye LA, Deck LM. Aldehyde and aldose reductases from human placenta. Heterogeneous expression of multiple enzyme forms. *J Biol Chem* **1990**;265:10912-8.
117. Gonzalez RG, Barnett P, Aguayo J, Cheng HM, Chylack LT, Jr. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* **1984**;33:196-9.
118. Yabe-Nishimura C. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological reviews* **1998**;50:21-33.
119. Altan VM. The pharmacology of diabetic complications. *Current medicinal chemistry* **2003**;10:1317-27.

120. Miyamoto S. Recent advances in aldose reductase inhibitors: potential agents for the treatment of diabetic complications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2002**;12:621-31.
121. Pfeifer MA, Schumer MP. Clinical-Trials of Diabetic Neuropathy - Past, Present, and Future. *Diabetes* **1995**;44:1355-61.
122. Suzen S, Buyukbingol E. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. *Current medicinal chemistry* **2003**;10:1329-52.
123. Kinoshita JH, Nishimura C. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes/metabolism reviews* **1988**;4:323-37.
124. Cheng HM, Gonzalez RG. The Effect of High Glucose and Oxidative Stress on Lens Metabolism, Aldose Reductase, and Senile Cataractogenesis. *Metabolism-Clinical and Experimental* **1986**;35:10-4.
125. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2003**;14:S233-6.
126. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine reviews* **2005**;26:380-92.
127. Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia* **1994**;37:264-9.
128. Morre DM, Lenaz G, Morre DJ. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *The Journal of experimental biology* **2000**;203:1513-21.
129. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2004**;24:816-23.
130. Oyama T, Miyasita Y, Watanabe H, Shirai K. The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2006**;73:227-34.
131. Kinoshita JH, Barber GW, Merola LO, Tung B. Changes in the levels of free amino acids and myo-inositol in the galactose-exposed lens. *Investigative ophthalmology* **1969**;8:625-32.
132. Lee AY, Chung SK, Chung SS. Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**;92:2780-4.
133. Nagata M, Hohman TC, Nishimura C, Drea CM, Oliver C, Robison WG, Jr. Polyol and vacuole formation in cultured canine lens epithelial cells. *Experimental eye research* **1989**;48:667-77.
134. Dan Q, Wong R, Chung SK, Chung SSM, Lam KSL. Interaction between the polyol pathway and non-enzymatic glycation on aortic smooth muscle cell migration and monocyte adhesion. *Life Sciences* **2004**;76:445-59.
135. Jerums G, Panagiotopoulos S, Forbes J, Osicka T, Cooper M. Evolving concepts in advanced glycation, diabetic nephropathy, and diabetic vascular disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**;419:55-62.

136. Stevens VJ, Vlassara H, Abati A, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* **1977**;252:2998-3002.
137. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* **2002**;23:599-622.
138. Williams B. Glucose-induced vascular smooth muscle dysfunction: the role of protein kinase C. *Journal of hypertension* **1995**;13:477-86.
139. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* **1996**;272:728-31.
140. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **1992**;258:607-14.
141. Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *The Journal of clinical investigation* **1991**;87:31-8.
142. Ha H, Yu MR, Choi YJ, Lee HB. Activation of protein kinase c-delta and c-epsilon by oxidative stress in early diabetic rat kidney. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **2001**;38:S204-7.
143. Ishii H, Tada H, Isogai S. An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor-beta and protein kinase C activity in cultured mesangial cells. *Diabetologia* **1998**;41:362-4.
144. Keogh RJ, Dunlop ME, Larkins RG. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism: clinical and experimental* **1997**;46:41-7.
145. Price SA, Agthong S, Middlemas AB, Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy: interactions with aldose reductase. *Diabetes* **2004**;53:1851-6.
146. Ramana KV. ALDOSE REDUCTASE: New Insights for an Old Enzyme. *Biomolecular concepts* **2011**;2:103-14.
147. de la Fuente JA, Manzanaro S. Aldose reductase inhibitors from natural sources. *Natural product reports* **2003**;20:243-51.
148. Mylari BL, Armento SJ, Beebe DA, Conn EL, Coutcher JB, Dina MS, O'Gorman MT, Linhares MC, Martin WH, Oates PJ, Tess DA, Withbroe GJ, Zembrowski WJ. A highly selective, non-hydantoin, non-carboxylic acid inhibitor of aldose reductase with potent oral activity in diabetic rat models: 6-(5-chloro-3-methylbenzofuran- 2-sulfonyl)-2-H-pyridazin-3-one. *J Med Chem* **2003**;46:2283-6.
149. Ehrig T, Bohren KM, Prendergast FG, Gabbay KH. Mechanism of Aldose Reductase Inhibition - Binding of NADP+/NADPH and Alrestatin-Like Inhibitors. *Biochemistry* **1994**;33:7157-65.
150. El-Kabbani O, Darmanin C, Schneider TR, Hazemann I, Ruiz F, Oka M, Joachimiak A, Schulze-Briese C, Tomizaki T, Mitschler A, Podjarny A. Ultrahigh resolution drug design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with Fidarestat and Minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *Proteins-Structure Function and Genetics* **2004**;55:805-13.

151. Greene DA, Arezzo JC, Brown MB. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. *Neurology* **1999**;53:580-91.
152. Costantino L, Rastelli G, Vianello P, Cignarella G, Barlocco D. Diabetes complications and their potential prevention: aldose reductase inhibition and other approaches. *Medicinal research reviews* **1999**;19:3-23.
153. Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada Ri R, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C, Kokai Y. Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain : a journal of neurology* **2001**;124:2448-58.
154. Baba M, Kimura K, Suda T, Yagihashi S. Three-year inhibition of aldose reductase on development of symptomatic neuropathy in diabetic patients. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **2006**;11:176-8.
155. Goto Y, Hotta N, Shigeta Y, Sakamoto N, Kikkawa R. Effects of an aldose reductase inhibitor, epalrestat, on diabetic neuropathy. Clinical benefit and indication for the drug assessed from the results of a placebo-controlled double-blind study. *Biomedicine & pharmacotherapy* **1995**;49:269-77.
156. Hotta N, Sakamoto N, Shigeta Y, Kikkawa R, Goto Y. Clinical investigation of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic neuropathy in Japan: multicenter study. Diabetic Neuropathy Study Group in Japan. *Journal of diabetes and its complications* **1996**;10:168-72.
157. Ramirez MA, Borja NL. Epalrestat: an aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy. *Pharmacotherapy* **2008**;28:646-55.
158. Brill V. Status of current clinical trials in diabetic polyneuropathy. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques* **2001**;28:191-8.
159. Ziegler D. Polyneuropathy in the diabetic patient--update on pathogenesis and management. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2004**;19:2170-5.
160. Zentgraf M. Characterization of binding pocket flexibility of Aldose Reductase. Philipps-Universität Marburg, **2006**.
161. Steuber H, Zentgraf M, Podjarny A, Heine A, Klebe G. High-resolution crystal structure of aldose reductase complexed with the novel sulfonyl-pyridazinone inhibitor exhibiting an alternative active site anchoring group. *J Mol Biol* **2006**;356:45-56.
162. Mylari BL, Armento SJ, Beebe DA, Conn EL, Coutcher JB, Dina MS, O'Gorman MT, Linhares MC, Martin WH, Oates PJ, Tess DA, Withbroe GJ, Zembrowski WJ. A novel series of non-carboxylic acid, non-hydantoin inhibitors of aldose reductase with potent oral activity in diabetic rat models: 6-(5-chloro-3-methylbenzofuran-2-sulfonyl)-2H-pyridazin-3-one and congeners. *J Med Chem* **2005**;48:6326-39.
163. Case DA, Pearlman DA, Caldwell JW, Cheatham III TE, Ross WS, Simmerling CL, Darden TA, Merz KA, Stanton RV, Cheng AL, Vincent JJ, Crowley M, Ferguson DM, Radmer RJ, Seibel GL, Singh UC, Weiner PK, Kollman PA. AMBER 5. University of California, San Francisco, **1997**.

164. Case DA, Darden TA, Cheatham III TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Crowley M, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Kolosvary I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Yang L, Tan C, Mongan J, Hornak V, Cui G, Beroza P, Mathews DH, Seetin MG, Sagui C, Babin V, Kollman PA. AMBER 10. University of California, San Francisco, **2008**.
165. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Kollman PA. Application of Resp Charges to Calculate Conformational Energies, Hydrogen-Bond Energies, and Free-Energies of Solvation. *Journal of the American Chemical Society* **1993**;115:9620-31.
166. Bayly CI, Cieplak P, Cornell WD, Kollman PA. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges - the Resp Model. *Journal of Physical Chemistry* **1993**;97:10269-80.
167. Stouten PFW, Frommel C, Nakamura H, Sander C. An Effective Solvation Term Based on Atomic Occupancies for Use in Protein Simulations. *Molecular Simulation* **1993**;10:97-120.
168. SYBYL 8.0. Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
169. BioSolveIT GmbH. FTreesXL, Version 1.1.4, Sankt Augustin, Germany.
170. Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**;45:177-82.
171. OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, <http://www.eyesopen.com>.
172. OMEGA, Version 2.3.1. OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, <http://www.eyesopen.com>, **2008**.
173. Schaefer B. Computergestützte Untersuchungen zur Inhibition und Dynamik der β -Ketoacyl-ACP-Synthase I (KasA) aus Mycobacterium tuberculosis. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2012**.
174. Siebert CD. Das Bioisosterie-Konzept: Arzneistoffentwicklung. *Chem Unserer Zeit* **2004**;38:320-4.
175. Burger A. Medicinal Chemistry, 3rd Ed., NY, EUA, Wiley **1970**: 127.
176. ACD/pKa, Version 8.03. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com.
177. Liu T, Lin Y, Wen X, Jorissen RN, Gilson MK. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic acids research* **2007**;35:D198-201.
178. www.bindingdb.org.
179. Vargas-Roig LM, Fanelli MA, Lopez LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer detection and prevention* **1997**;21:441-51.
180. Steuber H, Heine A, Klebe G. Structural and thermodynamic study on aldose reductase: Nitro-substituted inhibitors with strong enthalpic binding contribution. *J Mol Biol* **2007**;368:618-38.

181. Da Settimo F, Primofiore G, La Motta C, Sartini S, Taliani S, Simorini F, Marini AM, Lavecchia A, Novellino E, Boldrini E. Naphtho[1,2-d]isothiazole acetic acid derivatives as a novel class of selective aldose reductase inhibitors. *J Med Chem* **2005**;48:6897-907.
182. Steuber H, Zentgraf M, La Motta C, Sartini S, Heine A, Klebe G. Evidence for a novel binding site conformer of aldose reductase in ligand-bound state. *J Mol Biol* **2007**;369:186-97.
183. Zentgraf M, Steuber H, Koch C, La Motta C, Sartini S, Sottriffer CA, Klebe G. How reliable are current docking approaches for structure-based drug design? Lessons from aldose reductase. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**;46:3575-8.
184. www.emolecules.com.
185. Ritossa FM. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **1962**;18:571-3.
186. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **1974**;84:389-98.
187. Csermely P. A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the cytoarchitecture. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **2001**;16:123-6.
188. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle* **2006**;5:2592-601.
189. Meimaridou E, Gooljar SB, Chapple JP. From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *Journal of molecular endocrinology* **2009**;42:1-9.
190. Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* **2007**;581:3702-10.
191. Feige U, Polla BS. Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* **1994**;50:979-86.
192. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine* **1999**;31:261-71.
193. Tavarina M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* **1996**;1:23-8.
194. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **2006**;125:443-51.
195. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **1996**;381:571-9.
196. Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **1996**;272:1606-14.
197. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **1987**;48:899-907.
198. Universal Protein Resource, www.uniprot.org.

199. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**;23:2947-8.
200. Boxshade, Version 3.21, www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html.
201. Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R. Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* **2005**;20:513-24.
202. Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **1990**;346:623-8.
203. Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88:5041-5.
204. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem* **2010**;53:4585-602.
205. Bork P, Sander C, Valencia A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**;89:7290-4.
206. Erbse A, Mayer MP, Bukau B. Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochemical Society transactions* **2004**;32:617-21.
207. Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry* **2001**;70:603-47.
208. Schiene-Fischer C, Habazettl J, Schmid FX, Fischer G. The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase. *Nature structural biology* **2002**;9:419-24.
209. Schiene-Fischer C, Habazettl J, Tradler T, Fischer G. Evaluation of similarities in the cis/trans isomerase function of trigger factor and DnaK. *Biological chemistry* **2002**;383:1865-73.
210. Mayer MP. Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell* **2010**;39:321-31.
211. Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P. Kinetics of molecular chaperone action. *Science* **1994**;263:971-3.
212. Mayer MP, Schroder H, Rudiger S, Paal K, Laufen T, Bukau B. Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nature structural biology* **2000**;7:586-93.
213. McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J, Bukau B. The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol* **1995**;249:126-37.
214. Theyssen H, Schuster HP, Packschies L, Bukau B, Reinstein J. The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J Mol Biol* **1996**;263:657-70.
215. Russell R, Jordan R, McMacken R. Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone. *Biochemistry* **1998**;37:596-607.
216. Ha JH, McKay DB. ATPase kinetics of recombinant bovine 70 kDa heat shock cognate protein and its amino-terminal ATPase domain. *Biochemistry* **1994**;33:14625-35.

217. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88:2874-8.
218. Karzai AW, McMacken R. A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J Biol Chem* **1996**;271:11236-46.
219. Barouch W, Prasad K, Greene L, Eisenberg E. Auxilin-induced interaction of the molecular chaperone Hsc70 with clathrin baskets. *Biochemistry* **1997**;36:4303-8.
220. Misselwitz B, Staeck O, Rapoport TA. J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell* **1998**;2:593-603.
221. Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Mogk A, Reinstein J, Bukau B. Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96:5452-7.
222. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **1998**;92:351-66.
223. Mayer MP, Rudiger S, Bukau B. Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biological chemistry* **2000**;381:877-85.
224. Vogel M, Mayer MP, Bukau B. Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *J Biol Chem* **2006**;281:38705-11.
225. Han W, Christen P. Mutations in the interdomain linker region of DnaK abolish the chaperone action of the DnaK/DnaJ/GrpE system. *FEBS Lett* **2001**;497:55-8.
226. Rist W, Graf C, Bukau B, Mayer MP. Amide hydrogen exchange reveals conformational changes in hsp70 chaperones important for allosteric regulation. *J Biol Chem* **2006**;281:16493-501.
227. Voisine C, Craig EA, Zufall N, von Ahsen O, Pfanner N, Voos W. The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* **1999**;97:565-74.
228. Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE, Zuiderweg ER. Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106:8471-6.
229. Wilbanks SM, Chen L, Tsuruta H, Hodgson KO, McKay DB. Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments. *Biochemistry* **1995**;34:12095-106.
230. Shi L, Kataoka M, Fink AL. Conformational characterization of DnaK and its complexes by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* **1996**;35:3297-308.
231. Swain JF, Dinler G, Sivendran R, Montgomery DL, Stotz M, Gierasch LM. Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol Cell* **2007**;26:27-39.
232. Smock RG, Rivoire O, Russ WP, Swain JF, Leibler S, Ranganathan R, Gierasch LM. An interdomain sector mediating allostery in Hsp70 molecular chaperones. *Molecular systems biology* **2010**;6:414.
233. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **2002**;295:1852-8.
234. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2005**;62:670-84.

235. Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **1998**;94:73-82.
236. Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96:13732-7.
237. Motohashi K, Watanabe Y, Yohda M, Yoshida M. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96:7184-9.
238. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **1989**;246:382-5.
239. Bercovich B, Stancovski I, Mayer A, Blumenfeld N, Laszlo A, Schwartz AL, Ciechanover A. Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol Chem* **1997**;272:9002-10.
240. Esser C, Alberti S, Hohfeld J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochimica et biophysica acta* **2004**;1695:171-88.
241. Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E. Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* **2000**;275:27447-56.
242. Terlecky SR. Hsp70s and lysosomal proteolysis. *Experientia* **1994**;50:1021-5.
243. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine* **2003**;228:111-33.
244. Stuart RA, Cyr DM, Neupert W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia* **1994**;50:1002-11.
245. Haas IG. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* **1994**;50:1012-20.
246. Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **1986**;46:291-300.
247. Hendershot LM, Valentine VA, Lee AS, Morris SW, Shapiro DN. Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34. *Genomics* **1994**;20:281-4.
248. Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in cell & developmental biology* **1999**;10:465-72.
249. Bukau B, Deuerling E, Pfund C, Craig EA. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **2000**;101:119-22.
250. Matsui H, Asou H, Inaba T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol Cell* **2007**;25:99-112.
251. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell proliferation* **2000**;33:341-65.

252. Lee SJ, Choi SA, Lee KH, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Lee YS. Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress Chaperones* **2001**;6:273-81.
253. Henderson B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell biochemistry and function* **2010**;28:1-14.
254. Nylandsted J, Brand K, Jaattela M. Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**;926:122-5.
255. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* **2004**;23:2907-18.
256. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & development* **2005**;19:570-82.
257. Daugaard M, Kirkegaard-Sorensen T, Ostefeld MS, Aaboe M, Hoyer-Hansen M, Orntoft TF, Rohde M, Jaattela M. Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. *Cancer research* **2007**;67:2559-67.
258. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* **2005**;10:86-103.
259. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**;97:7871-6.
260. Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, Weller M, Jaattela M. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer research* **2002**;62:7139-42.
261. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *Journal of the National Cancer Institute* **1993**;85:570-4.
262. Lazaris A, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis B. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast cancer research and treatment* **1997**;43:43-51.
263. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International journal of cancer Journal international du cancer* **1998**;79:468-75.
264. Seo JS, Park YM, Kim JI, Shim EH, Kim CW, Jang JJ, Kim SH, Lee WH. T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochemical and biophysical research communications* **1996**;218:582-7.
265. Sliutz G, Karlseder J, Tempfer C, Orel L, Holzer G, Simon MM. Drug resistance against gemcitabine and topotecan mediated by constitutive hsp70 overexpression in vitro: implication of quercetin as sensitiser in chemotherapy. *British journal of cancer* **1996**;74:172-7.

266. Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert opinion on therapeutic targets* **2009**;13:469-78.
267. Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Lett* **2007**;581:3758-69.
268. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* **2007**;130:1005-18.
269. Chatterjee M, Heimberger T, Andrulis M, Stühmer T, Steinbrunn T, Einsele H, Bargou RC. Heat shock proteins Hsp72 and Hsp73 as novel therapeutic targets in multiple myeloma. *Onkologie* **2008**;31(suppl 4):181a.
270. Chatterjee M, Andrulis M, Stuhmer T, Muller E, Hofmann C, Steinbrunn T, Heimberger T, Schraud H, Kressmann S, Einsele H, Bargou RC. The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica* **2013**;98:1132-41.
271. Heimberger T, Andrulis M, Riedel S, Stuhmer T, Schraud H, Beilhack A, Bumm T, Bogen B, Einsele H, Bargou RC, Chatterjee M. The heat shock transcription factor 1 as a potential new therapeutic target in multiple myeloma. *British journal of haematology* **2013**;160:465-76.
272. Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* **1998**;273:17147-53.
273. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and biophysical research communications* **2001**;286:433-42.
274. Yang J, Hong Y, Wang W, Wu W, Chi Y, Zong H, Kong X, Wei Y, Yun X, Cheng C, Chen K, Gu J. HSP70 protects BCL2L12 and BCL2L12A from N-terminal ubiquitination-mediated proteasomal degradation. *FEBS Lett* **2009**;583:1409-14.
275. Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* **2002**;22:3415-24.
276. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell death and differentiation* **2004**;11:390-402.
277. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **2005**;280:38729-39.
278. Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**;97:3850-5.
279. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology* **2000**;2:469-75.

280. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Hoyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jaattela M. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *The Journal of experimental medicine* **2004**;200:425-35.
281. Volloch V, Gabai VL, Rits S, Sherman MY. ATPase activity of the heat shock protein hsp72 is dispensable for its effects on dephosphorylation of stress kinase JNK and on heat-induced apoptosis. *FEBS Lett* **1999**;461:73-6.
282. Meriin AB, Yaglom JA, Gabai VL, Zon L, Ganiatsas S, Mosser DD, Zon L, Sherman MY. Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. *Molecular and cellular biology* **1999**;19:2547-55.
283. Yaglom JA, Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Sherman MY. The function of HSP72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase activation can be dissociated from its role in prevention of protein damage. *J Biol Chem* **1999**;274:20223-8.
284. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature cell biology* **2001**;3:839-43.
285. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell cycle* **2009**;8:518-26.
286. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental cell research* **1999**;248:30-43.
287. Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO journal* **1998**;17:6124-34.
288. Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, Hunt CR, Dix DJ, Kroemer RT, Giordanetto F, Jaattela M, Penninger JM, Pance A, Kroemer G, Garrido C. Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer research* **2003**;63:8233-40.
289. Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer letters* **2013**;332:275-85.
290. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer cell* **2008**;14:250-62.
291. Zollinger A, Stuhmer T, Chatterjee M, Gattenlohner S, Haralambieva E, Muller-Hermelink HK, Andrusis M, Greiner A, Wesemeier C, Rath JC, Einsele H, Bargou RC. Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* **2008**;112:3403-11.
292. Takeuchi T, Iinuma H, Kunimoto S, Masuda T, Ishizuka M, Takeuchi M, Hamada M, Naganawa H, Kondo S, Umezawa H. A new antitumor antibiotic, spergualin: isolation and antitumor activity. *The Journal of antibiotics* **1981**;34:1619-21.
293. Umezawa H, Kondo S, Iinuma H, Kunimoto S, Ikeda Y, Iwasawa H, Ikeda D, Takeuchi T. Structure of an antitumor antibiotic, spergualin. *The Journal of antibiotics* **1981**;34:1622-4.

294. Umeda Y, Moriguchi M, Kuroda H, Nakamura T, Inuma H, Takeuchi T, Umezawa H. Synthesis and antitumor activity of spergualin analogues. I. Chemical modification of 7-guanidino-3-hydroxyacyl moiety. *The Journal of antibiotics* **1985**;38:886-98.
295. Umeda Y, Moriguchi M, Ikai K, Kuroda H, Nakamura T, Fujii A, Takeuchi T, Umezawa H. Synthesis and antitumor activity of spergualin analogues. III. Novel method for synthesis of optically active 15-deoxyspergualin and 15-deoxy-11-O-methylspergualin. *The Journal of antibiotics* **1987**;40:1316-24.
296. Komesli S, Dumas C, Dutartre P. Analysis of in vivo immunosuppressive and in vitro interaction with constitutive heat shock protein 70 activity of LF08-0299 (Tresperimus) and analogues. *International journal of immunopharmacology* **1999**;21:349-58.
297. Nadler SG, Tepper MA, Schacter B, Mazzucco CE. Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins. *Science* **1992**;258:484-6.
298. Mazzucco CE, Nadler SG. A member of the Hsp70 family of heat-shock proteins is a putative target for the immunosuppressant 15-deoxyspergualin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1993**;685:202-4.
299. Nadeau K, Nadler SG, Saulnier M, Tepper MA, Walsh CT. Quantitation of the interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin and analogs with Hsc70 and Hsp90. *Biochemistry* **1994**;33:2561-7.
300. Nadler SG, Dischino DD, Malacko AR, Cleaveland JS, Fujihara SM, Marquardt H. Identification of a binding site on Hsc70 for the immunosuppressant 15-deoxyspergualin. *Biochemical and biophysical research communications* **1998**;253:176-80.
301. Thomas FT, Tepper MA, Thomas JM, Haisch CE. 15-Deoxyspergualin: a novel immunosuppressive drug with clinical potential. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1993**;685:175-92.
302. Lebreton L, Annat J, Derrepas P, Dutartre P, Renaut P. Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 1. Structural modifications of the hydroxyglycine moiety. *J Med Chem* **1999**;42:277-90.
303. Fewell SW, Smith CM, Lyon MA, Dumitrescu TP, Wipf P, Day BW, Brodsky JL. Small molecule modulators of endogenous and co-chaperone-stimulated Hsp70 ATPase activity. *J Biol Chem* **2004**;279:51131-40.
304. Wisen S, Androsavich J, Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Chemical modulators of heat shock protein 70 (Hsp70) by sequential, microwave-accelerated reactions on solid phase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**;18:60-5.
305. Rodina A, Vilenchik M, Moullick K, Aguirre J, Kim J, Chiang A, Litz J, Clement CC, Kang Y, She Y, Wu N, Felts S, Wipf P, Massague J, Jiang X, Brodsky JL, Krystal GW, Chiosis G. Selective compounds define Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. *Nature chemical biology* **2007**;3:498-507.
306. Koren J, 3rd, Jinwal UK, Jin Y, O'Leary J, Jones JR, Johnson AG, Blair LJ, Abisambra JF, Chang L, Miyata Y, Cheng AM, Guo J, Cheng JQ, Gestwicki JE, Dickey CA. Facilitating Akt clearance via manipulation of Hsp70 activity and levels. *J Biol Chem* **2010**;285:2498-505.
307. Mamelak D, Lingwood C. The ATPase domain of hsp70 possesses a unique binding specificity for 3'-sulfogalactolipids. *J Biol Chem* **2001**;276:449-56.

308. Liebscher M, Jahreis G, Lucke C, Grabley S, Raina S, Schiene-Fischer C. Fatty acyl benzamido antibacterials based on inhibition of DnaK-catalyzed protein folding. *J Biol Chem* **2007**;282:4437-46.
309. Cellitti J, Zhang Z, Wang S, Wu B, Yuan H, Hasegawa P, Guiney DG, Pellicchia M. Small molecule DnaK modulators targeting the beta-domain. *Chemical biology & drug design* **2009**;74:349-57.
310. Otvos L, Jr., O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **2000**;39:14150-9.
311. Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, Daniels Z, Dokurno P, Drysdale MJ, Foloppe N, Francis GL, Graham CJ, Howes R, Macias AT, Murray JB, Parsons R, Shaw T, Surgenor AE, Terry L, Wang Y, Wood M, Massey AJ. Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design. *J Med Chem* **2009**;52:1510-3.
312. Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, Macias AT, Daniels Z, Geoffroy S, Dopson M, Lavan P, Matassova N, Francis GL, Graham CJ, Parsons R, Wang Y, Padfield A, Comer M, Drysdale MJ, Wood M. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2010**;66:535-45.
313. Leu JI, Pimkina J, Frank A, Murphy ME, George DL. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol Cell* **2009**;36:15-27.
314. Williams DR, Ko SK, Park S, Lee MR, Shin I. An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70. *Angewandte Chemie* **2008**;47:7466-9.
315. Rudiger S, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Bukau B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *The EMBO journal* **1997**;16:1501-7.
316. Hetenyi C, van der Spoel D. Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. *FEBS Lett* **2006**;580:1447-50.
317. Hetenyi C, van der Spoel D. Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2002**;11:1729-37.
318. Cho HJ, Gee HY, Baek KH, Ko SK, Park JM, Lee H, Kim ND, Lee MG, Shin I. A small molecule that binds to an ATPase domain of Hsc70 promotes membrane trafficking of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Journal of the American Chemical Society* **2011**;133:20267-76.
319. Chen XW, Jeong JC. Sequence-based prediction of protein interaction sites with an integrative method. *Bioinformatics* **2009**;25:585-91.
320. Schneider G, Neidhart W, Giller T, Schmid G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angewandte Chemie* **1999**;38:2894-6.
321. Durant JL, Leland BA, Henry DR, Nourse JG. Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery. *Journal of chemical information and computer sciences* **2002**;42:1273-80.

322. Jones G, Willett P, Glen RC. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *Journal of computer-aided molecular design* **1995**;9:532-49.
323. www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.finger.html. Daylight Chemical Information Systems Inc., Aliso Viejo, CA, USA.
324. Burger R, Guenther A, Bakker F, Schmalzing M, Bernard S, Baum W, Duerr B, Hocke GM, Steininger H, Gebhart E, Gramatzki M. Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA* **2001**;2:42-53.
325. GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA.
326. ACD/LogP. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com.
327. Hartung AW. Entwicklung neuartiger pharmakologischer Wirkstoffe als Inhibitoren des HSF-1/HSP70-Systems zur Behandlung des Multiplen Myeloms. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2013**.
328. Zilian DT. Neuartige, empirische Scoring-Modelle für Protein-Ligand-Komplexe und computergestützte Entwicklung von Hsp70-Inhibitoren. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2014**.
329. Forino M, Jung D, Easton JB, Houghton PJ, Pellecchia M. Virtual docking approaches to protein kinase B inhibition. *J Med Chem* **2005**;48:2278-81.
330. Zhang YJ, Wang Z, Sprous D, Nabioullin R. In silico design and synthesis of piperazine-1-pyrrolidine-2,5-dione scaffold-based novel malic enzyme inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**;16:525-8.
331. Böhm HJ, Banner DW, Weber L. Combinatorial docking and combinatorial chemistry: design of potent non-peptide thrombin inhibitors. *Journal of computer-aided molecular design* **1999**;13:51-6.
332. Böhm HJ, Schneider G. Virtual screening for bioactive molecules (Vol. 10 of Mannhold R, Kubinyi H, Timmerman H. Methods and principles in medicinal chemistry). Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
333. Peng H, Huang N, Qi J, Xie P, Xu C, Wang J, Yang C. Identification of novel inhibitors of BCR-ABL tyrosine kinase via virtual screening. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2003**;13:3693-9.
334. www.vcclab.org/lab/alogps/.
335. www.chemaxon.com/products/calculator-plugins/property-predictors/#logp_logd.
336. Worrall LJ, Walkinshaw MD. Crystal structure of the C-terminal three-helix bundle subdomain of *C. elegans* Hsp70. *Biochemical and biophysical research communications* **2007**;357:105-10.
337. Cavasotto CN, Phatak SS. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug discovery today* **2009**;14:676-83.
338. Krieger E, Nabuurs SB, Vriend G. Homology modeling. *Methods of biochemical analysis* **2003**;44:509-23.

339. Epstein CJ, Goldberger RF, Anfinsen CB. The genetic control of tertiary protein structure: studies with model systems. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **1963**;28:439–49.
340. Kaczanowski S, Zielenkiewicz P. "Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures?". *Theoretical Chemistry Accounts* **2010**;125:643–50.
341. Gunther J, Bergner A, Hendlich M, Klebe G. Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using Relibase. *J Mol Biol* **2003**;326:621-36.
342. Lipman DJ, Pearson WR. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **1985**;227:1435-41.
343. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**;215:403-10.
344. Ono Y, Minami A, Noike M, Higuchi Y, Toyomasu T, Sassa T, Kato N, Dairi T. Dioxygenases, key enzymes to determine the aglycon structures of fusicoccin and brassicicene, diterpene compounds produced by fungi. *Journal of the American Chemical Society* **2011**;133:2548-55.
345. Rauh D, Klebe G, Stubbs MT. Understanding protein-ligand interactions: the price of protein flexibility. *J Mol Biol* **2004**;335:1325-41.
346. Teague SJ. Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* **2003**;2:527-41.
347. Wong CF, McCammon JA. Protein flexibility and computer-aided drug design. *Annual review of pharmacology and toxicology* **2003**;43:31-45.
348. Woo HJ, Jiang J, Lafer EM, Sousa R. ATP-induced conformational changes in Hsp70: molecular dynamics and experimental validation of an in silico predicted conformation. *Biochemistry* **2009**;48:11470-7.
349. Ponder JW, Case DA. Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry* **2003**;66:27-85.
350. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JA, Jr., Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA. Gaussian 03, Revision D.01, 2004. Gaussian, Inc., Wallingford, CT.
351. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of molecular graphics & modelling* **2006**;25:247-60.
352. Bayly CI, Cieplak P, Cornell WD, Kollman PA. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. . *The Journal of Physical Chemistry* **1993**;97:10269-80.

353. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry* **2004**;25:1157-74.
354. Onufriev A, Bashford D, Case DA. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins* **2004**;55:383-94.
355. Harvey SC, Tan RK, Cheatham III TE. The flying ice cube: Velocity rescaling in molecular dynamics leads to violation of energy equipartition. *Journal of computational chemistry* **1998**;19:726-40.
356. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **1977**;23:327-41.
357. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics* **1993**;98:10089-92.
358. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* **1996**;14:33-8.
359. Mongan J. Interactive essential dynamics. *Journal of computer-aided molecular design* **2004**;18:433-6.
360. Shida M, Arakawa A, Ishii R, Kishishita S, Takagi T, Kukimoto-Niino M, Sugano S, Tanaka A, Shirouzu M, Yokoyama S. Direct inter-subdomain interactions switch between the closed and open forms of the Hsp70 nucleotide-binding domain in the nucleotide-free state. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **2010**;66:223-32.